



**HAL**  
open science

# Evaluation in vivo de protéines immunorégulatrices dérivées de CTLA-4 et de PD-L1 pour leur capacité à inhiber les réponses immunitaires dans le contexte de la thérapie génique musculaire par AAV

Léa Dupaty

► **To cite this version:**

Léa Dupaty. Evaluation in vivo de protéines immunorégulatrices dérivées de CTLA-4 et de PD-L1 pour leur capacité à inhiber les réponses immunitaires dans le contexte de la thérapie génique musculaire par AAV. Immunologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR133 . tel-02136815

**HAL Id: tel-02136815**

**<https://theses.hal.science/tel-02136815>**

Submitted on 22 May 2019

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

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

## Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	3
LISTE DES TABLEAUX.....	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
RESUME.....	3
I-INTRODUCTION.....	4
<b>A. Thérapie génique et vecteurs de gènes</b> .....	4
A.1. Définition de la thérapie génique.....	4
A.2. Emergence du concept de thérapie génique.....	5
A.3. La thérapie génique : critères influençant son efficacité.....	7
A.3.1. Choix du gène thérapeutique.....	7
A.3.2. Choix de la méthode de transfert.....	8
<b>B. Le rAAV: un vecteur de choix en thérapie génique</b> .....	14
B.1 Biologie de l'AAV sauvage.....	14
B.1.a. Description de l'AAV sauvage.....	14
B.1.b. Génome des AAV sauvages et recombinants.....	16
B.1.c. Capside de l'AAV et les sérotypes.....	18
B.1.d. Synthèse de nouveaux variants d'AAV recombinants.....	20
B.2. Cycle viral et trafic intracellulaire de l'AAV recombinant.....	21
B.2.1. Amarrage des AAV à la cellule hôte et endocytose.....	22
B.2.2. Trafic endosomal, lysosomal et cytoplasmique.....	23
B.2.3. Entrée dans le noyau et expression du génome.....	23
B.2.4. Production des rAAV en laboratoire.....	25
<b>C. Système immunitaire et immunogénicité multifactorielle des vecteurs de type rAAV</b> .....	27
C.1. rAAV et réponses immunitaires innées.....	28
C.1.1. Le système immunitaire inné : introduction.....	28
C.1.2. Les réponses immunitaires innées induites le rAAV.....	29
C.2. Système immunitaire adaptatif : introduction.....	33
C.2.1. Immunité cellulaire : activation des lymphocytes T.....	33
C.2.2. Les réponses cellulaires anti-rAAV engendrées par les lymphocytes T.....	35
C.2.3. Immunité humorale : activation des lymphocytes B.....	40
C.3. Les réponses humorales anti-AAV engendrées par les lymphocytes B.....	42
<b>D. La tolérance immunologique</b> .....	45
D.1. La tolérance centrale.....	46
D.1.a. Tolérance centrale des lymphocytes T aux antigènes du soi dans le thymus.....	46

D.1.b. Tolérance centrale des lymphocytes B.....	48
D.2. La Tolérance périphérique .....	49
D.2.1. Tolérance périphérique : mécanismes passifs .....	49
D.2.2. Tolérance périphérique : mécanismes actifs .....	50
<b>E. Modulation des Réponses immunitaires médiées spécifiquement par CTLA-4 et PD-L1 .....</b>	<b>57</b>
E.1 CTLA-4, molécule primordiale pour l'acquisition et le maintien de la tolérance immunitaire.....	57
E.1.a. Expression de CTLA-4 .....	59
E.1.b. Mécanismes d'inhibitions médiés par CTLA-4.....	61
E.1.c. Développement clinique de molécules ciblant la signalisation passant par CTLA-4/CD28/B7 .	65
E.2. PD-L1, molécule essentielle dans l'acquisition et le maintien de la tolérance périphérique .....	69
E.2.1. Présentation et rôles de PD-L1.....	69
E.2.2. Les ligands de PD-L1 .....	69
E.3. PD-L1/Ig et anti-PD-L1, outils d'étude de l'axe PD-1/PD-L1 .....	76
E.4. PD-L1 et auto-immunité.....	77
<b>F. Immunomodulation et induction de tolérance immune dans le contexte de thérapie génique par AAV.....</b>	<b>78</b>
F.1 Principaux défis cliniques pour éviter les réponses anti-protéine transgénique.....	78
F.2 Utilisation d'immunosuppresseurs dans les réponses anti-rAAV .....	79
F.3. Immunomodulation .....	80
F.4. Induction d'une tolérance immunologique sans immunosuppression.....	81
<b>II-OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>83</b>
<b>III-RESULTATS.....</b>	<b>85</b>
A. Etude de l'immunogénicité d'une protéine transgénique modèle en fonction de sa compartimentation cellulaire après transfert musculaire d'AAV.....	85
Contexte de l'étude.....	85
METHODES .....	85
RESULTATS.....	85
CONCLUSION .....	86
B.1. Evaluation de nouvelles molécules bi-fonctionnelles fusionnées à un Fc combinant les domaines fonctionnels de CTLA-4 et de PD-L1 su l'inhibition des réponses immunitaires dans un contexte de thérapie génique musculaire par rAAV.....	87
Contexte de l'étude.....	87
METHODES .....	88
RESULTATS.....	88
CONCLUSION .....	91
B.2. Evaluation de nouvelles molécules dérivées de PD-L1/Fc sur l'inhibition des réponses immunitaires dans un contexte de thérapie génique musculaire par rAAV. ....	92

Contexte de l'étude .....	92
METHODES .....	92
RESULTATS .....	92
<b>IV- DISCUSSION .....</b>	<b>121</b>
A-La thérapie génique par AAV : les principaux défis actuels .....	121
B-Travaux sur les protéines bifonctionnelles combinant les domaines fonctionnels de CTLA-4 et de PD-L1 .....	122
B.1. Avantages de la stratégie VIR.....	123
B.2. Limites de la stratégie VIR .....	124
C-La localisation cellulaire de la protéine transgénique impacte-t-elle l'intensité des réponses immunitaires ? .....	124
D-Effets immunomodulateurs de CTLA-4/Fc .....	125
E- Effets immunomodulateurs de PD-L1/Fc.....	126
F- Effet synergique de CTLA-4 et PD-L1 .....	127
G-Les nouvelles constructions dérivées de PD-L1/Fc .....	127
<b>V- CONCLUSION.....</b>	<b>130</b>
<b>VI- ANNEXES.....</b>	<b>132</b>
<b>VII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>181</b>

## LISTE DES FIGURES

---

- Figure 1.** Evolution de la fréquence d'utilisation des vecteurs de thérapie génique en 2007 vs. 2017
- Figure 2.** Schéma récapitulatif de l'impact de la voie d'injection sur les réponses immunitaires dirigées contre les AAV.
- Figure 3.** Topologie de l'AAV1.
- Figure 4.** Le génome de l'AAV et de l'AAVr.
- Figure 5.** Représentation du génome simple-brin et double brin.
- Figure 6.** Représentation schématique du trafic intracellulaire de l'AAV.
- Figure 7.** Signalisation par les TLR. Exemple du TLR9.
- Figure 8.** Signaux 1 et 2 de costimulation d'un lymphocyte
- Figure 9.** Les réponses immunitaires adaptatives engendrées par l'expression de la protéine transgénique. Exemple d'une protéine transgénique sécrétée après transduction musculaire des AAV.
- Figure 10.** Mécanismes suppresseurs médiés par les Tregs
- Figure 11.** Mécanismes d'inhibition médiés par CTLA-4
- Figure 12.** Détail de l'impact sur la signalisation passant par le TCR.
- Figure 13.** Signalisation passant par l'axe PD-1/PD-L1.
- Figure 14.** Les anticorps bloquant CTLA-4 et PD-1 réactivent les lymphocytes T.
- Figure 15.** Effet des protéines bi fonctionnelles sur la réponse immunitaire.
- Figure 16.** Schéma récapitulatif des hypothèses du travail sur les mécanismes d'inhibitions de CTLA-4/Fc et PD-L1/Fc.

## LISTE DES TABLEAUX

---

- Tableau 1.** Synthèse des récepteurs et corécepteurs d'AAV connus.

## LISTE DES ABREVIATIONS

### A

A<sub>2</sub>AR : récepteur à l'adénosine  
AAP : *assembly activating protein*  
AAT :  $\alpha$ -1-antitrypsine  
AAV : *adeno-associated virus*  
ADA : adénosine désaminase  
ADCC : *antibody-dependant cell cytotoxicity*  
ADN : acide désoxyribonucléique  
AIRE : *autoimmune regulator*  
ALD : adrénoleucodystrophie  
ALPS : *Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome*  
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARN : acide ribonucléique

### B

BAb : *binding antibody*  
Bcl-xL : *B cell lymphoma extra large*  
BCR : *B-cell receptor*  
Blimp-1 : *B lymphocyte-induced maturation protein-1*

### C

CAR : *chimeric antigen receptor*  
CHC : carcinome hépato-cellulaire  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CD : cluster de différentiation  
CPA : *cellule présentatrice d'antigène*  
CTLA-4 : *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*

### D

Da : Dalton  
DC : cellule dendritique

### E

EAE : *experimental autoimmune encephalomyelitis*

### F

F(IX) : facteur (IX)  
Fc : fragment cristallisable  
FLT3 : *Fms-like tyrosine kinase 3*  
FoxP3 : *forkhead box P3*

### G

GITR : *glucocorticoid-induced TNFR-related*  
grz : granzyme  
gv : génome viraux

### H

HEK : human embryony kidney

### I

ICOS : *induced costimulator*  
IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase  
IFN : interféron  
Ig : immunoglobuline  
IL : interleukine  
IM : intra-musculaire  
IRF : *interferon regulator factor*  
iTr : *induced regulatory T cell*  
ITR : *inverted terminal repeat*  
IV : intra-veineux

### K

Kb : kilo base  
KO : *knock-out*

### L

LAG-3 : *lymphocyte-activation gene 3*  
LB : lymphocyte B  
Lck : *lymphocyte cell-specific tyrosine kinase*  
LCMV : *lymphocytic choriomeningitis*  
LPL : lipoprotéine lipase  
LAP : *latency associated peptide*  
LT : Lymphocytes T

### M

mTOR : *mammalian target of rapamycin*  
MyD88 : *myeloid differentiation primary response 88*  
mir : micro-RNA

### N

Nab : *neutralizing antibody*  
NF- $\kappa$ B : *nuclear factor-kappa B*  
NIH : *National institutes of Health*  
NK : *natural killer*  
NOD : *non-obese diabetic*  
NPC : complexe du pore nucléaire

### O

ORF : *open-reading frame*

Ova : Ovalbumine

## **P**

PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Pattern*

pb : paire de base

pDC : *plasmacitoid DC*

PD-1 : *programmed death-1*

PD-L : *programmed death ligand 1*

PEG : polyéthylène glycol

PI3K : phosphoinositol 3 kinase

PKC : protéine kinase C

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

## **R**

R : récepteur

rAAV : AAV recombinant

## **S**

sc : *self-complementary*

SCID : *Severe Combined ImmunoDeficiency*

SHP2 : *Src Homology 2*

SIA : Système immunitaire adaptatif

SII : Système immunitaire inné

SNC : système nerveux central

ss : single stranded

STAT1 : *Signal transducer and activator of transcription 1*

## **T**

LB : lymphocyte B

LT : lymphocyte T

TCR : T-cell receptor

TDO : tryptophane 2,3 dioxygénase

TEC : thymique epithelial cell

Teff : T effecteur

TGF : tumor growth factor

Th : T helper (auxiliaire)

TIGIT : *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*

TIL : *tumor infiltrating lymphocytes*

TNF : *tumor necrosis factor*

Treg : T régulateur

## **V**

VP : *viral particule*

## RESUME

---

La thérapie génique consiste à introduire du matériel génétique dans des cellules dans l'objectif de traiter une pathologie. Le plus souvent, la thérapie génique s'effectue au moyen d'un vecteur viral, transportant le gène jusque dans les cellules cibles. Dans le cas des maladies monogéniques, l'*adeno-associated virus* (AAV) s'est imposé progressivement comme un vecteur de choix. Son absence de pathogénicité, son large tropisme et sa capacité à transduire des cellules quiescentes sont autant d'avantages comparés à d'autres vecteurs utilisés en thérapie génique.

L'utilisation d'AAV est approuvée en Europe pour le traitement d'un déficit rare en lipoprotéine lipase et vient récemment d'être approuvé par les autorités américaines pour le traitement d'un déficit de la vision. Toutefois, les essais de thérapies géniques se heurtent souvent aux réponses immunitaires dirigées contre l'AAV. En effet, les différents composants de ce vecteur viral ont été identifiés comme pouvant déclencher des réponses immunitaires s'opposant à l'efficacité à long terme de la thérapie génique. De plus, la protéine transgénique peut s'avérer immunogène, ce qui conduit au déclenchement de réponses immunitaires, à la destruction des cellules transduites et *in fine* à l'échec de la thérapie génique. En clinique, des immunosuppresseurs sont utilisés pour palier à ses effets indésirables. Toutefois, de par leurs effets secondaires infectieux et tumorigènes, des stratégies visant plutôt à induire de la tolérance vis-à-vis de la protéine transgénique, associées à un bénéfice pour la santé des patients, se sont développées.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'implémenter une nouvelle stratégie visant à étudier l'effet de protéines de fusion immunorégulateur et tolérogène de molécules dérivées de CTLA-4/Fc et de PD-L1/Fc. Pour cela, nous avons utilisé un modèle murin récapitulant les réponses immunitaires induites par l'expression d'une protéine transgénique immunogène, l'ovalbumine (Ova). Ensuite, des AAV codant pour les protéines au potentiel immunorégulateur ont été synthétisées. Cette stratégie d'immunorégulation vectorisée (VIR) nous a permis d'évaluer la capacité de chacune des protéines à moduler les réponses immunitaires dirigées contre l'Ova directement *in vivo*.

Au total, ce travail a permis de mettre en évidence i) l'intérêt et les limites de la stratégie VIR, ii) et celui du rôle délétère de CTLA-4/Fc au long terme, sur les lymphocytes Tregs CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, périphériques et centraux, iii) et de démontrer l'intérêt de nouvelles molécules dérivées PD-L1/Fc sur la persistance de l'Ova

## I-INTRODUCTION

### A. Thérapie génique et vecteurs de gènes

#### A.1. Définition de la thérapie génique

La thérapie génique englobe un large ensemble de méthodes visant à introduire du matériel génétique chez un hôte dans une finalité thérapeutique préventive ou interventionnelle. Un médicament de thérapie génique doit répondre à au moins 2 critères (i) contenir une séquence d'acides nucléiques capable de réguler, réparer, remplacer, ajouter ou déléter une séquence génétique chez le receveur et (ii) induire un effet thérapeutique lié à l'introduction et l'expression du matériel génétique. Le matériel génétique peut être injecté sans enveloppe, on parle ainsi de matériel « nu ». Néanmoins, le plus souvent, des véhicules de ces gènes appelés vecteurs, permettent un transfert de gènes efficace et ciblé vers les cellules, tissus ou organes, à traiter.

Par ailleurs, un médicament de thérapie génique peut être administré

- (i) Directement au patient (*in vivo*) c'est le cas du Glybera (Alipogène Tiparvovec) qui est un *adeno-associated virus* (AAV) codant pour la lipoprotéine lipase (LPL) administré en une seule série d'injections intramusculaires.
- (ii) Dans d'autres cas, la thérapie peut s'effectuer *ex vivo*, en récupérant des cellules du patient pour les transduire (c'est-à-dire transférer du matériel génétique au moyen d'un vecteur) en laboratoire avant de réadministrer les cellules modifiées. A titre d'exemple, l'essai clinique mené par Alain Fischer dont l'équipe avait modifié *ex vivo* des cellules de moelle osseuse d'enfants atteint d'un déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (SCID-X1) au moyen d'un rétrovirus codant pour le gène  $\gamma_c$ , commun à plusieurs récepteurs de cytokines (Cavazzana-Calvo et al., 2000).

En 2017, *The journal of gene medicine* rapportait que l'essentiel, soit 65% (n= 1688) des essais cliniques de thérapie génique étaient consacrés au cancer, qui fait partie des principales causes de mortalité chez l'Homme. Les maladies monogéniques, associées

au dysfonctionnement d'un seul gène, occupent la seconde place du classement avec 11% des essais clinique (n=287) et ce manuscrit est centré sur cette catégorie de maladies (Wiley, *journal of gene medicine*, 2017).

## A.2. Emergence du concept de thérapie génique

Dans les années 1970, de nouvelles données dans deux domaines biologiques, à savoir la génétique et la vectorologie ont permis l'émergence de la notion de thérapie par transfert de gènes. A l'époque, l'ambition était principalement de traiter des patients atteints de maladies monogéniques.

En 1980, l'hématologue américain Martin Cline conduisit clandestinement et en dehors des Etats-Unis (où la législation l'interdisait), le premier essai clinique de thérapie génique pour deux patients atteints de  $\beta$ -thalassémie, sans effet thérapeutique. Cet essai déclencha de violentes critiques par la communauté scientifique, par son manque de bases scientifiques solides et son éthique douteuse.

Le premier essai de thérapie génique à proprement parler, a été autorisé au sein du National Institutes Health (NIH) en 1989, et mené par l'oncologue Steven Rosenberg. Il a montré aux côtés de son équipe qu'une immunothérapie utilisant des lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) était capable de détruire des cellules tumorales de mélanomes chez l'Homme.

C'est au début de l'année 1990 que le NIH accorda le premier essai clinique pour un déficit génétique. Sous la supervision de Michael Bleas et William French Anderson, deux patients pédiatriques atteints d'un déficit en adénosine désaminase (ADA) causant un déficit immunitaire sévère (et déjà traité au PEG-ADA) reçurent *ex vivo*, dans leur lymphocyte T, un  $\gamma$ -rétrovirus codant pour l'ADA. En dépit d'une amélioration remarquable des patients, l'efficacité de cet essai demeura limitée. En effet, les patients avaient dû continuer une thérapie protéique en ADA.

A cette même période, une série d'événements viennent entacher les espoirs fondés par la communauté scientifique autour de la thérapie génique. D'abord, les difficultés à développer des vecteurs de gènes efficaces et sûrs. Plus tard, un scepticisme de plus grande ampleur envahi les chercheurs, principalement dû aux effets secondaires graves dans différents essais cliniques. A Philadelphie, un jeune patient traité pour un

désordre métabolique héréditaire causé par un déficit en ornithine transcarbamylase, décéda peu après l'administration veineuse d'un vecteur adénoviral (Raper et al., 2003). Plus tard encore, à Paris et à Londres l'enthousiasme revient avec le franc succès du traitement de 9 patients pédiatriques traités par rétrovirus pour un syndrome d'immunodéficience combiné sévère (SCID-X). Le suivi de ces patients a révélé moins de 5 ans plus tard, que 2 des 9 enfants avaient développé une leucémie due à l'insertion aléatoire du transgène proche d'un oncogène, ce qui causa le décès de l'un d'entre eux. Au total des 2 études menées simultanément à Paris et Londres, 18 sont guéris, 5 cas de leucémie ont été diagnostiqués et traités et 4 enfants ont survécu après l'allogreffe de moelle. Cet essai thérapeutique reste un succès, compte tenu de la gravité de la maladie, et de l'absence de traitement efficace, hormis cette thérapie génique.

Nonobstant les difficultés liées d'une part à l'immunogénicité des vecteurs et au risque de mutagenèse insertionnelle, la thérapie génique a plus récemment permis des avancées significatives. L'attention générale s'est progressivement focalisée sur l'utilisation des vecteurs dérivés de l'AAV, particulièrement pour les traitements des maladies monogéniques. Des résultats très encourageants ont été obtenus notamment pour le traitement d'une forme de cécité héréditaire, appelé amaurose de Leber ou encore pour la maladie de Parkinson et celle d'Alzheimer. Après presque trente ans de recherche dans ce domaine, la discipline est encore jeune. Basée sur l'utilisation principalement de virus modifiés, ces outils non conventionnels font continument l'objet de recherches pour améliorer leur efficacité et leur innocuité. La thérapie génique continue de représenter à ce jour l'unique espoir thérapeutique pour certaines pathologies fortement invalidantes, dont les myopathies héréditaires.

Depuis 2015, deux médicaments de thérapie génique traitant des maladies monogéniques ont reçu une autorisation de mise sur le marché AMM. En Europe, le Glybera, un AAV permet le traitement d'un déficit pour la lipoprotéine lipase (LPL) (injectable *in vivo* par voie intramusculaire (IM)) et du Strimvelis, un lentivirus traitant un déficit en ADA. Aux Etats-Unis, la firme Sparks a développé un AAV recombinant (Luxturna) qui a passé avec succès l'ensemble des phases d'essai clinique et vient de recevoir une autorisation sanitaire pour le traitement de l'amaurose de Leber.

### A.3. La thérapie génique : critères influençant son efficacité

Cette section décrit les critères à prendre en compte et à étudier lors du développement d'une thérapie génique. Notamment, l'expression du transgène doit induire un effet thérapeutique, la technique même de transfert du gène doit permettre de délivrer efficacement et dans les cellules ciblées le gène d'intérêt et finalement la voie d'administration sont autant de critères à évaluer pour que la thérapie soit efficace.

#### A.3.1. Choix du gène thérapeutique

Le choix du transgène est lié à l'objectif thérapeutique. Le gène « thérapeutique » peut coder pour une protéine faisant défaut ou anormalement produite chez un patient. Dans ce cas, de l'ADN est le plus souvent utilisé. L'utilisation d'ARN messager (ARNm) peut également être envisagée, mais plus rare, car l'ARNm est sensible à la dégradation intra-cellulaire et l'expression de la protéine transgénique est seulement transitoire.

Des études rapportent l'utilisation de *small-interfering* RNA (siRNA) ou leur précurseur de type *short-hairpin* RNA (shRNA) et microRNA (miRNA). Les stratégies thérapeutiques utilisant ce type de matériel trouvent notamment des applications pour le traitement de maladies infectieuses virales, où des siRNA ciblant l'inhibition des mRNA de *tat* et *rev* ont été construits dans le cadre d'une thérapie génique pour traiter le VIH (Bobbin 2015). Par ailleurs, des stratégies similaires faisant intervenir des ARN interférents ont également été décrites dans le cadre d'essais sur le cancer ou encore dans les traitements de maladies monogéniques (Mettananda et al., 2015; Zhang et al., 2016)

Une autre stratégie est basée sur l'utilisation de gènes suicide. Cela consiste à introduire du matériel génétique d'origine bactérien ou viral dans des cellules cibles afin de les rendre sensibles à une drogue susceptible d'induire alors leur mort cellulaire. Dans cette situation, le gène code généralement pour une enzyme capable de transformer une pro-droge non-toxique en un produit pro-apoptotique. Notamment, la cytosine déaminase d'*Escherichia coli*, peut convertir la 5-Fluorocytosine en 5-Fluorouracile, elle-même cytotoxique. Encore, la thymidine kinase appartenant au virus de l'herpès, qui peut convertir le ganciclovir (analogue nucléosidique bloquant la réplication virale), en ganciclovir-monophosphate, qui, à son tour converti par les cellules cibles en ganciclovir

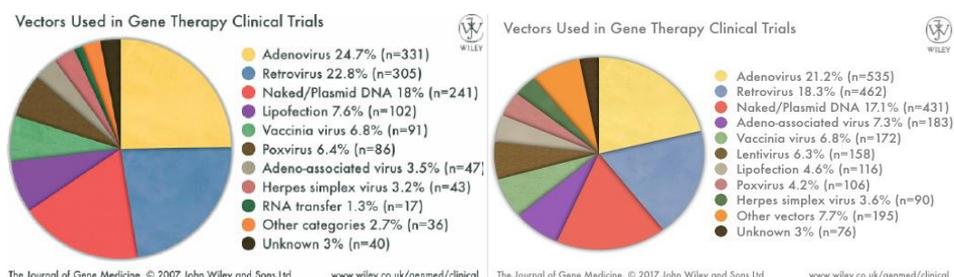
triphosphate conduit à un arrêt de cycle cellulaire et provoque des dommages mitochondriaux.

Plus récemment, l'émergence de la technologie CRISPR/Cas9 utilisant des *short-guide* RNA (sgRNA) a permis des modifications très ciblées du génome pour des applications en thérapie génique. La technologie fait ses preuves, cette année (2018) la FDA a autorisé le premier essai clinique mené par *CRISPR therapeutics*, pour traiter des patients atteint de  $\beta$ -thalassémie qui devrait démarrer cet hiver. Un autre essai utilisant aussi la technologie CRISPR est également en cours de recrutement de patients pour le traitement d'un myélome (source Nature Biotech, Eric Smalley, issue Juillet 2018).

### A.3.2. Choix de la méthode de transfert

Le choix du vecteur de thérapie génique est lié au tissu cible, à la pathologie à traiter, et la durée de persistance du transgène souhaitée (stable ou transitoire).

#### A.3.2.a. Les vecteurs d'origine non virale et matériel nu



**Figure 1. Evolution de la fréquence d'utilisation des vecteurs de thérapie génique en 2007 vs. 2017** d'après The journal of gene medicine. ([www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical))

Les vecteurs non-viraux sont des composés chimiques facilitant le transport d'un matériel génétique d'intérêt. Ils présentent l'avantage d'être facile à produire, peu immunogènes, sans limite vis-à-vis de la taille du transgène. Bien qu'ils soient très efficaces pour le transfert des gènes, ils présentent l'inconvénient de ne pas persister au long-terme d'un transgène avec ce type de vecteurs, ce qui limite leur utilisation dans un grand nombre d'applications en thérapie génique. Les acides nucléiques sont des molécules de haut poids moléculaire, chargées négativement et hydrophobe, donc ne franchissant pas les bicouches lipidiques. Parmi les méthodes de vectorisation

n'impliquant pas les vecteurs viraux, on trouve le polyéthylèneimine (PEI) : molécule chargée positivement, capable de se lier aux acides nucléiques de charge inverse et de former un ensemble qui sera endocyté par la cellule (Boussif, PNAS 1995). De nombreux protocoles utilisant la technologie des polycations, ou des molécules similaires complexées avec de l'ADN plasmidique, se sont développées à des fins cliniques (Bhatt et al., 2015; Oishi et al., 2005). Sur le même principe, la technologie des liposomes repose sur l'utilisation de lipides amphiphiles, composés d'une extrémité hydrophile et d'une partie lipidique hydrophobe capable de former des micelles complexées à des acides nucléiques.

L'utilisation d'acides nucléiques nus (*naked-DNA*) arrive en 3<sup>e</sup> à la place des moyens les plus utilisés pour le transfert de gène dans les essais cliniques (Figure.1), notamment par l'injection intramusculaire d'ADN viral dans le cadre de vaccination (Ulmer vaccine 1994). D'autres protocoles ont démontré l'intérêt que l'injection soit (i) dans le site tumoral pour délivrer des cytokines ou des gènes suicides sous forme plasmidique, (ii) en systémique sous forme de nucléotides anti-sens capables d'induire un saut-d'exon (Siva et al., 2014). D'autres méthodes, comme l'électroporation sont toujours très utilisées notamment dans des études sur le « *genome-editing* » utilisant la technologie CRISPR/Cas9 où des « *short-guide-RNA*, sgRNA » sont électroporés *ex vivo* en présence de la caspase 9.

#### A.3.2.b. Les vecteurs viraux

Les virus ont naturellement évolué pour transmettre du matériel génétique de façon efficace et déjouer le système immunitaire. Ils correspondent aux outils les plus utilisés et les plus efficaces dans les essais de thérapie génique, pour le traitement des maladies monogéniques. En 2017, le *journal of gene medicine* rapportait l'utilisation de vecteurs viraux dans 75% des essais en cours (Figure 1).

##### A.3.2.b.1 Les adénovirus

L'adénovirus recombinant est le vecteur viral le plus utilisé dans les essais thérapeutiques. Il est notamment utilisé dans des protocoles cliniques pour le traitement du cancer, qui est le champ d'application le plus commun. Son efficacité de transduction le place en haut du classement. Néanmoins, c'est un vecteur immunogène Il est important

de rappeler que l'issue tragique d'un essai clinique utilisant des adénovirus à contribuer aux améliorations du vecteur adénoviral (Raper et al., 2003). Outre son immunogénicité, deux études ont rapporté que la plupart des individus possédaient une immunité pour le sérotype Ad5 rendant l'utilisation de l'adénovirus peu efficace dans cette population. Pour éviter l'activation du système immunitaire, une forme dite « *gutless* » (sans séquence virale) limitant l'immunogénicité du vecteur, mais également des modifications évolutives par chimérisme de l'enveloppe virale (c'est-à-dire construire des capsides virales aux moyens de gènes provenant de capsides de différents sérotype) ont permis sa plus vaste utilisation. De façon intéressante, les propriétés inflammatoires de l'adénovirus ont été exploitées, dans l'objectif de stimuler et renforcer les réponses anti-tumorales pour le traitement de cancer. Après modifications génétiques, certains vecteurs dérivés des adénovirus ont des propriétés oncolytiques avec des résultats encourageants (Kaufman et al., 2015).

#### A.3.2.b.2 Les rétrovirus

En seconde position des virus des plus utilisés, on retrouve les rétrovirus (principalement les  $\gamma$ -rétrovirus et les lentivirus). Il est important de noter que l'utilisation des  $\gamma$ -rétrovirus est en diminution et concernait 18% des essais de thérapie génique en 2017 vs. 23% en 2007 alors que l'utilisation des lentivirus est en hausse 7,3% en 2017 vs. 2,9% en 2012 (leur profil de sécurité ayant été amélioré). A ce jour, les rétrovirus sont notamment utilisés pour la génération de récepteurs chimériques à l'antigène par transduction *in vitro* de lymphocytes T (CAR-T cells) dans les thérapies anti-cancéreuses. Depuis une vingtaine d'années les  $\gamma$ -rétrovirus et lentivirus ont permis de traiter plus de 150 patients atteints de déficits immunitaires sévères. L'inconvénient de ce type de vecteur est leur caractère intégratif au sein des cellules transduites. Dans certains cas le transgène s'insère à proximité d'un proto-oncogène, ce qui a entraîné chez 5 patients des leucémies (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). L'usage d'un lentivirus a également permis de soigner deux enfants atteints d'adrénoleucodystrophie lié à l'X (*X-linked ALD*) ou encore pour le syndrome de Wiskott-Aldrich par transduction *ex vivo* de cellules souches. L'amélioration de la capside virale en laboratoire d'une part et d'autre part une meilleure maîtrise de l'insertion du génome viral dans le génome de l'hôte a permis l'obtention d'une AMM en Europe pour Strimvelis, un lentivirus ayant été testé en thérapie génique pour le déficit en ADA.

## A.3.2.b.3 Les virus adéno-associés

Dans le laboratoire U1234 où j'ai effectué ma thèse, j'ai étudié et utilisé l'AAV comme virus modèle de vecteur de gène. Une description approfondie de ce virus fait l'objet du chapitre B de ce manuscrit.

La forme recombinante de l'AAV (rAAV) s'est progressivement imposée comme un vecteur de choix pour le développement de stratégies thérapeutiques des maladies monogéniques. En 5 ans, le nombre d'essais cliniques utilisant le rAAV a doublé passant de 92 à 183 (selon *the Journal of gene therapy*) (Figure.1). Sa capacité d'encapsulation modérée (4.7 kilo bases (Kb)) est souvent critiquée, pourtant seul 6% des protéines du génome nécessiteraient d'être codés par un ADN complémentaire supérieur à 4Kb. Les nombreux sérotypes existants de l'AAV ainsi que le développement de technologies permettant la génération de nouvelles capsides permettent de cibler un grand nombre de cellules différentes très efficacement. Sa faible immunogénicité comparativement aux autres formes recombinantes de vecteurs viraux utilisés en thérapie génique lui confère une caractéristique intéressante pour le traitement des maladies monogéniques

Les essais cliniques ayant utilisés des rAAV ont démontré qu'il était possible de cibler des tissus aussi différents que le foie, le cœur, le cerveau, l'œil ou le muscle squelettique. Le rAAV est considéré comme un vecteur sûr. L'utilisation de l'AAV par voie systémique a été associée à une élévation asymptomatique des enzymes hépatiques sans conséquence pour les patients (Manno et al., 2006) Toutefois, de récentes études ont posé la question d'un éventuel lien de causalité entre l'infection à l'AAV sauvage et le développement de carcinome hépatocellulaire (CHC). Une étude menée par Nault et collaborateurs en 2015 a regroupé 193 patients atteints de CHC. Les auteurs ont étudié un potentiel lien corrélatif entre infection aux AAV (sauvages) et cancer (Nault et al., 2015). Il a été retrouvé chez un peu moins de 6% des tumeurs de cette cohorte l'insertion de l'AAV2 sauvage, l'auteur conclue la publication en mettant en garde sur le potentiel néoplasique de l'AAV2. Toutefois, une autre étude chez l'Homme mené par Park et collaborateurs, regroupant 289 patients atteints également de CHC <1% des patients possédaient de l'ADN provenant de l'AAV2 et concluait négativement entre un éventuel lien entre AAV sauvage et cancer (Park et al., 2016). De plus, une revue récente par Srivastava et Carter reprend les études ayant démontré l'effet bénéfique des AAV contre

certains cancers. Ainsi, il semble que l'AAV2 a un potentiel inhibiteur du papillomavirus associé au cancer du col de l'utérus. Les femmes séropositives pour l'AAV2 étant moins susceptibles à ce type de cancer que les femmes séronégatives (Hermonat, 1994) et (Ogston et al., 2000).

### A.3.3 La voie d'administration : exemple de l'AAV

La voie d'administration influence l'efficacité de transduction et l'immunogénicité qui en résulte. C'est une voie peu immunogène, car les vecteurs vont transduire majoritairement le foie, un organe enclin à l'établissement de tolérance immunitaire. En effet, il est maintenant bien documenté que l'utilisation d'AAV mais aussi d'autres vecteurs injectés par voie systémique permettent l'induction de mécanismes de tolérance vis-à-vis du transgène (LoDuca et al., 2009).

Le muscle squelettique est un organe abondant du le corps humain, puisqu'il représente 30-50% de notre masse. Le muscle possède un rôle moteur et un rôle dans le métabolisme et le stockage de l'énergie. Les muscles possèdent une immunité particulière. Les fibres musculaires sont notamment capables d'exprimer le CMH-I en cas d'inflammation. Les maladies du muscle (dystrophies, myopathies) déclenche des réactions inflammatoires, siège de réponses immunes pouvant être délétères à la transduction et à l'expression de la protéine transgénique. En effet, en contexte inflammatoire, les fibres musculaires peuvent exprimer des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), ce qui facilite le recrutement des cellules immunitaires et déclenche une réponse immune. Par ailleurs, l'état inflammatoire d'un tissu, notamment du muscle, peut diminuer significativement l'efficacité de transduction. Ainsi, une étude réalisée sur des souris dystrophiques a montré que l'inhibition de la voie *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) permettait une amélioration de la régénération musculaire après transfert d'AAV codant pour une dystrophine (Tang et al., 2010). Des résultats similaires ont aussi été observés chez des souris déficientes en  $\alpha$ -sarcoglycan, dans un modèle de souris dystrophiques (Cordier et al., 2000).

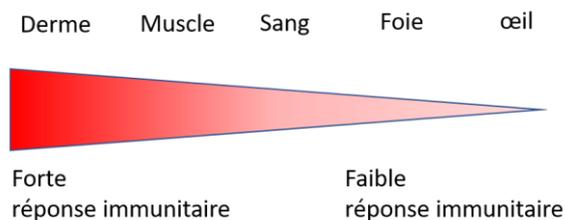
Récemment, la voie intra-dermale a également été identifiée comme une voie induisant des réponses immunitaires d'intensité supérieure à une injection intramusculaire. Les auteurs ont décrit que ces résultats étaient liés à une particularité du derme qui contient des cellules dendritiques présentant les antigènes viraux *via cross*

présentation (Ghenassia et al., 2017). Cette étude démontre le potentiel de l'AAV dans une perspective vaccino-logique.

Les organes immunoprivilégiés présentent l'avantage d'induire moins de réponses immunitaires. En décembre 2017, une thérapie génique par AAV a pour la 2<sup>e</sup> fois en clinique été couronnée de succès après l'approbation par la FDA du verotigène neparvovec-rtzyl.

L'AAV9 a récemment fait son entrée en clinique pour le traitement de désordres neurologiques tels que l'atrophie musculaire spinale ou encore la maladie de Sanfilippo démontrant que ce sérotype est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique efficacement (Mendell et al., 2017a) et *globenewswire* website.

Une revue récente publiée par Santiago-Ortiz et Schaffer synthétise les récentes avancées de l'utilisation d'AAV délivré directement dans les tumeurs (pour des approches anti-tumorales) (Santiago-Ortiz and Schaffer, 2016). De nombreuses études sont en cours avec des effets très encourageants chez la souris et à ce jour quelques essais cliniques (4) ont démarré.



**Figure 2. Schéma récapitulatif de l'impact de la voie d'injection sur les réponses immunitaires dirigées contre les AAV.** De gauche à droite les voies d'injection les plus immunogènes. Cette figure est une création originale.

## B. Le rAAV: un vecteur de choix en thérapie génique

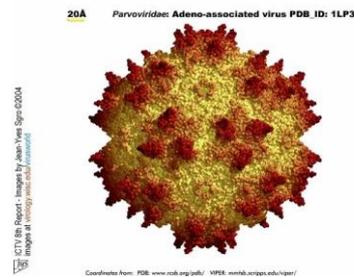
### B.1 Biologie de l'AAV sauvage

#### B.1.a. Description de l'AAV sauvage

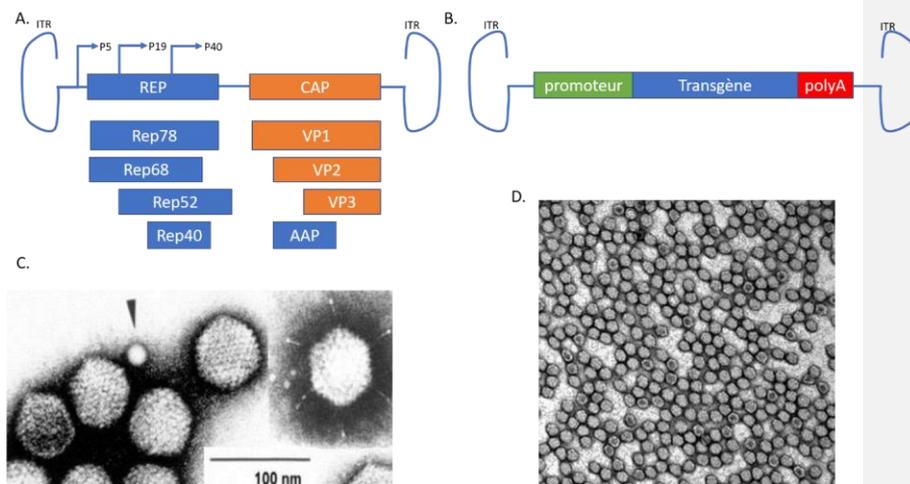
Découvert il y a plus de 50 ans par Atchison comme un contaminant des préparations d'adénovirus (Atchison, 1965) ; l'AAV est un parvovirus dont il existe de multiples sérotypes naturels différents, qui infectent asymptomatiquement une grande majorité des humains et des primates non-humains. L'AAV est classé dans le genre des Dependovirus car sa réplication dépend de la présence d'autres virus, dits auxiliaires. Parmi ces virus auxiliaires l'adénovirus (Atchison et al., 1965), le virus de l'herpès (Buller et al., 1981), le virus de l'hépatite B (Hösel et al., 2014) , le virus de la vaccine (Schlehofer et al., 1986) ou encore le papillomavirus (Ogston et al., 2000) sont autant de virus capable de rompre la latence des AAV.

Chaque virion d'AAV est une particule icosaédrique d'un diamètre moyen de 25 nm, non-enveloppée contenant un ADN simple brin de 4.7 kB. Le génome de l'AAV sauvage est peu complexe : Il possède deux cadres de lectures (*open reading frames (ORF)*), *rep* et *cap*. Le cadre *rep* permet l'expression de 4 protéines impliquées dans la réplication virale et dont le nom indique le poids moléculaire : Rep78, Rep68, Rep52, Rep40 (Figure 4.).

La réplication de l'AAV dépend de *Rep78* et *Rep68* qui ont des activités respectivement d'hélicase et d'endonucléase simple-brin. Quant à Rep52 et Rep40, outre leur activité d'hélicase, leur importance a surtout été démontrée dans l'assemblage des particules virales lors de l'encapsidation. Ces quatre protéines sont exprimées sous la dépendance des 2 promoteurs p5 et p19 situés dans cadre rep. (Figure 4.)



**Figure 3. Topologie de l'AAV1.** Décrite par Nicholas Muzyczka (illustration provenant de <http://www.virology.wisc.edu/>). En rouge les zones les plus éloignées du centre, en rose intermédiaires et en jaune, les plus proches.



**Figure 4. Le génome de l'AAV et de l'AAVr.** **A.** Représentation du génome de l'AAV sauvage avec les détails des promoteurs et des différents gènes exprimés. **B.** Représentation du génome recombinant dépourvu de l'ensemble des gènes viraux, remplacés par une cassette transgénique insérée entre les ITR. **C et D.** Images obtenues par microscopie électronique d'AAV sur le website [http://www.openoptogenetics.org/index.php?title=Adeno-Associated\\_Viruses](http://www.openoptogenetics.org/index.php?title=Adeno-Associated_Viruses). **C.** La flèche montre l'AAV contaminant une préparation d'adénovirus. **D.** Aspect d'une production d'AAV.

Un 3<sup>e</sup> promoteur p40 (présent également dans le cadre *rep*), peut initier la transcription de deux ARN épissés alternativement dans le cadre de *cap*. Cette partie du génome de l'AAV code pour 3 protéines de capsides VP1 (87 kDa), VP2 (73 kDa) et VP3 (61 kDa) et d'une protéine servant à leur assemblage *assembly activating protein* (AAP). La séquence de VP1 occupe l'intégralité du cadre de *cap*. Un épissage alternatif permet

l'expression de VP2 et AAP par 2 codons initiateurs non-conventionnels (ACG et CTG respectivement). L'expression de VP3 est initiée par un codon ATG en aval de CTG. Les protéines de la capsidie s'assemblent selon un ratio de 1 VP1 : 1 VP2 : 10 VP3 (*viral protein* (VP)).

Les *inverted-terminal-repeats* (ITR) sont deux régions en épingles à cheveux de 145 paires de bases (pb) encadrant le génome. Ils sont souvent décrits comme les seuls éléments en *cis* nécessaires à l'expression du génome viral. Décrites en 1980 (Lusby et al., 1980), ces régions sont également indispensables à la réplication virale, la circularisation du génome (Yan et al., 2005), mais également à l'encapsidation. Les génomes des AAV recombinants développés en laboratoires ne conservent du génome viral sauvage que ces régions ITRs. Les régions *rep* et *cap* sont remplacés par la cassette d'expression du gène thérapeutique. Le rôle de AAP dans l'assemblage des capsides a été récemment remis en question dans une étude menée par le groupe de D. Grimm démontrant qu'il était possible de produire des capsides synthétiques sans la protéine AAP, ce qui signifie qu'au moins pour la construction de certain sérotypes cette protéine n'est pas requise pour l'assemblage de la capsidie bien que AAP consolide la structure icosaédrique (Ferreira et al., 2014) (Herrmann et al., 2018) (Earley et al., 2017).

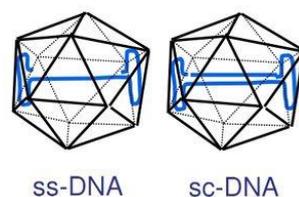
#### B.1.b Génome des AAV sauvages et recombinants

Le génome de l'AAV sauvage est schématisé dans la figure 4.A. Il est maintenant bien établi que le génome des virus sauvages demeure majoritairement sous forme épisomale, bien qu'il puisse également s'intégrer dans le génome de son hôte (Schnepp et al., 2009).

Classiquement, le génome d'un AAV recombinant comprend une cassette d'expression génique (promoteur/gène d'intérêt/séquence de polyadénylation) encadrée des séquences ITR empruntées à l'AAV sauvage (Figure 4.B.). Les protéines de la capsidie ainsi que les protéines auxiliaires nécessaires à la synthèse des particules virales doivent être apportées en *trans* dans des cellules transfectées pour la production de vecteurs recombinants. Les protéines *rep* sont également requises pour l'encapsidation du virus. Ainsi, il est possible de construire des AAV dont la capsidie possède un sérotype différent de celui du génome des régions ITR : On parle alors de pseudotypage (Rabinowitz and Samulski, 2000). Les AAV recombinants issus de

pseudotypage sont désignés communément selon la nomenclature AAV [nombre 1] / [nombre 2], où le nombre 1 désigne le génome de l'ITR et le nombre 2 désigne la capsid. Dépourvue des séquences rep et cap, la forme recombinante d'un vecteur AAV perd sa capacité d'intégration dans le génome de l'hôte et le génome viral persiste donc dans la cellule sous forme épisomale (Miao et al., 1998) (Schnepp et al., 2003) (Nowrouzi et al., 2012). Cette propriété intéressante limite les événements de mutagénèse insertionnelle. Cet avantage a été remis en question dans des études montrant que l'AAV pouvait s'intégrer au génome de la cellules transduites, dans un contexte de transduction hépatique néonatale ou dans celui d'une prolifération de cellules hépatiques (Kattenhorn et al., 2016).

Les *self-complementary* (sc) AAV (figure 5.) diffèrent des *single-stranded* vecteurs par leur cassette d'expression composée d'ADN double brin (complémentaire) (McCarty, 2008a). Les scAAV sont produits par la mutation d'un des deux ITR, ce qui empêche la fixation de la protéine Rep sur cette région et d'induire la réplication d'un second brin d'ADN. Ce génome complètement double brin présente l'avantage d'exprimer les protéines transgéniques avec une meilleure efficacité et surtout plus rapidement comparativement à un génome simple brin (McCarty, 2008b) (Nathwani et al., 2006). En effet, le brin complémentaire étant déjà synthétisé la traduction peut avoir lieu dès la décapsidation achevée. En revanche, ils présentent deux inconvénients comparativement aux AAV simple brin : *primo* celui d'induire de plus fortes réponses immunitaires innées (activation des TLR9 reconnaissant les motifs d'ADN double brin (Martino et al., 2011a). *Secundo*, ils induisent également des réponses cellulaires plus fortes à quantité de vecteurs injectée égale (Rogers et al., 2015). Le second inconvénient est leur capacité d'encapsidation de 4,7kB pour un ssAAV vs. 2,3kB pour un scAAV).



**Figure 5. Représentation du génome simple-brin et double brin.** Abreviations : ss= *single-stranded DNA* (ADN-simple brin) et sc=*self-complementary*.

### B.1.c. Capside de l'AAV et les sérotypes

Le sérotype est une propriété antigénique qui permet de distinguer les AAV selon leur différence de capsid (la définition est valable pour d'autres entités biologiques également). Douze sérotypes d'AAV différents (AAV1 à AAV12) et plus d'une centaine de variants ont été identifiés chez l'Homme et les primates non-humains à ce jour (Gao et al., 2005) (Balakrishnan and Jayandharan, 2014). Parmi eux, l'AAV2 est le premier sérotype découvert, le plus étudié et également le premier à avoir été utilisé en tant que vecteur de transfert de gène. Chaque sérotype présente un tropisme préférentiel pour des cellules ou un tissu. Basé sur des études de réactivité sérologique croisée, ces sérotypes sont classés dans 8 groupes monophylétiques (clades) distincts. Un remarquable travail effectué par Gao et collaborateurs en 2002 (Gao et al., 2002) a permis de montrer que ces clades partagent 60 à 99% d'homologie de séquence entre eux et qu'il existe de nombreux variants au sein de chaque clade, apportant aux chercheurs un éventail de possibilités important. Tous les rôles joués par la capsid de l'AAV ne sont pas encore élucidés, toutefois l'identification d'un grand nombre de sérotypes (AAV1, AAV2, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8) et de capsides modifiées en laboratoire (AAVrh32.33 et AAV-DJ) a contribué à la compréhension de la notion de tropisme.

La comparaison de la structure des capsides d'AAV montre que chaque protéine de capsid VP se compose d'une structure en tonneau formée de 8 feuillets  $\beta$ , d'une hélice  $\alpha$ , hautement conservée entre les différents sérotypes et également au sein des parvovirus. Des régions variables (RV) connectant les feuillets  $\beta$  permettent toutefois de distinguer les différents sérotypes viraux d'AAV et leur tropisme intrinsèque. Ces RV créent des différences structurales entre les capsides et définissent la liaison à différents récepteurs.

Il est maintenant établi que la liaison à des récepteurs cellulaires conditionne l'efficacité d'entrée et de transduction des particules virales dans les cellules cibles. A ce jour, 23 différents glycanes ont été identifiés comme récepteurs primaires des AAV.

Le plus souvent, la liaison à un récepteur primaire est insuffisante pour que la transduction soit efficace et des corécepteurs sont requis. A ce jour, certains récepteurs et corécepteurs d'AAV demeurent encore inconnus.

sérotype	Récepteur primaire	co-récepteur	Tropisme
AAV1	acide sialique N-lié	?	MS, SNC, rétine, pancréas
AAV2	HSPG	FGFR1, CIVb5,a5b1,HGFR,LamR,CD9	MS, SNC, foie, rein
AAV3	HSPG	FGFR1, HGFR, LamR	Hépatocarcinome, MS
AAV4	acide sialique O ou N-lié	?	SNC, rétine
AAV5	acide sialique O ou N-lié	PDGFR	MS, SNC, rétine, poumons
AAV6	HSPG, acide sialique N-lié	EGFR	MS, rétine, SNC
AAV8	?	LamR	Foie, MS, SNC, rétine, pancréas, coeur
AAV9	Galactose	LamR	foie, coeur, cerveau, MS, poumons, pancréas, rein
AAV13	HSPG	?	

**Tableau 1. Synthèse des récepteurs et corécepteurs d'AAV connus.**

Ainsi, l'AAV8 est un bon candidat pour la transduction hépatique (Nathwani et al., 2011a), ou pour celle de la rétine (Smith et al., 2003), l'AAV1 a quant à lui démontré une meilleure efficacité de transduction que l'AAV2 pour les cellules musculaires (Zincarelli et al., 2008) et équivalente à celle de l'AAV8 après injection intramusculaire (Adriouch et al., 2011). Ainsi l'AAV1 a été utilisé dans de nombreux essais cliniques incluant le traitement pour la déficience en  $\alpha$ 1-antitrypsine (Brantly et al., 2009), celle en LPL (Mingozzi et al., 2009), et un type de dystrophie musculaire rare (Mendell et al., 2017b). L'AAV1 est par ailleurs, le sérotype ayant obtenu une AMM Européenne.

En 2016, une étude approfondie faite sur une lignée cellulaire haploïde (HAP1) par une méthode appelée « gene-trapping » décrite en 2006 (De-Zolt et al., 2006) a permis d'invalider tous les gènes « non-essentiels » au génome humain et d'identifier une protéine transmembranaire, dont l'invalidation génétique empêchait la transduction de nombreux sérotypes d'AAV (AAV1, AAV2, AAV3b, AAV5, AAV6, AAV8, et AAV9) que les auteurs ont nommé AAV Receptor (AAVR) (Pillay et al., 2016). L'AAVR est codé par le gène KIAA0319L. Le gène et la protéine pour laquelle il code sont peu connus. Une étude révèle une implication de la protéine dans la guidance des axones notamment pour la dyslexie (Poon et al., 2011). Des études complémentaires sont nécessaires pour préciser l'importance de ce récepteur dans le transport et la transduction virale. Dans une autre publication, la même équipe rapportait de façon surprenante que les domaines d'interaction des AAV qui interagissaient avec l'AAVR différaient en fonction du sérotype. De plus vastes investigations sont nécessaires pour élucider l'ensemble des mécanismes nécessaires à la transduction. Très récemment, Pillay rapportait qu'au moins deux sérotypes (AAV4 et AAVrh32.33) étaient capables de transduire efficacement des cellules *in vitro* en l'absence de ce récepteur. Finalement « l'universalité » du récepteur semble discutable.

#### B.1.d. Synthèse de nouveaux variants d'AAV recombinants

Dans le cadre de la thérapie génique, l'objectif de synthétiser de nouveaux variants, c'est-à-dire des capsides modifiées est double. Cela permet de modifier dans certain cas le tropisme même des particules mais aussi d'éviter la survenue d'une réponse immunitaire mémoire qui soit délétère à la thérapie génique. L'AAV sauvage infectant naturellement plus de 70% des Hommes, il en résulte souvent une immunité humorale mémoire dirigée contre la capside qui rationalise le besoin de nouveaux variants pour la thérapie génique. La conception de nouveaux variants permet donc « d'affuter » le tropisme des AAV pour les restreindre très spécifiquement à certains types cellulaires. Ainsi en 2016, l'AAV2g9 a été démontré comme possédant un profil unique de transduction pour le système nerveux central (SNC). Initialement décrit par Shen (Shen et al., 2013), comme permettant une meilleure transduction hépatique et cardiaque. Plus tard, l'injection intracrânienne de cet AAV, avait permis l'expression d'un sgRNA ciblant le mir137 après transduction des cellules cérébrales, permettant la délétion de ce gène spécifiquement dans le cerveau sans que d'autres organes (en particulier le foie) soient ciblés. (Murlidharan et al., 2016).

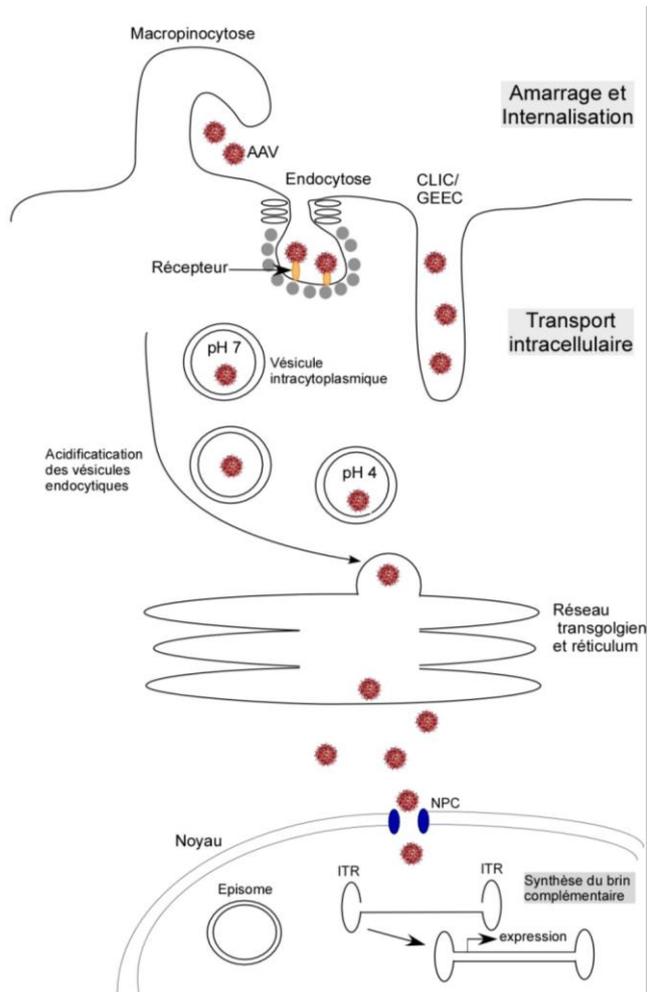
Cette année-là une autre équipe décrivait une méthode innovante appelée *Cre recombination-based AAV targeted evolution* (CREATE) permettant de sélectionner de nouvelles capsides qui transduisent efficacement uniquement les cellules exprimant des astrocytes de souris exprimant la Cre. C'est une technique ingénieuse consistant à générer en premier lieu une librairie de vecteurs synthétisés à partir de séquences de capside aléatoirement modifiées. Afin de pouvoir identifier la séquence de capside améliorant la transduction, le génome de ces AAV possède la même séquence de capside modifiée. Cette séquence transgénique contient aussi un 1<sup>er</sup> site de liaison d'un primer de PCR. Le 2<sup>e</sup> site de fixation de primer de PCR se situe dans la partie polyadénylation du génome entre 2 lox de telle sorte que les vecteurs ayant transduits les cellules exprimant la Cre vont subir une recombinaison homologe de leur génome. C'est l'inversion de cette séquence qui va orienter le primer dans un sens permettant l'amplification d'un fragment. Cela permet de retrouver la séquence d'intérêt après séquençage. L'AAV-PHP.B généré par cette méthode transduit ainsi 40 fois mieux les cellules du SNC que l'AAV9. D'autres variants transduisant mieux le muscle (Choudhury et al., 2016) ou le foie (Lisowski et al., 2014) ont également été conçus.

## B.2. Cycle viral et trafic intracellulaire de l'AAV recombinant

Le cycle infectieux de l'AAV englobe l'ensemble des étapes permettant au virus de se répliquer ou dans le cas du virus recombinant d'exprimer la protéine transgénique. Il est admis que 3 étapes sont cruciales dans son cycle :

- i) L'entrée dans la cellule cible *via* des récepteurs
- ii) Le trafic intracellulaire
- iii) Le passage de l'AAV dans le noyau et l'expression intranucléaire du génome viral.

Chaque étape du cycle infectieux fait l'objet d'abondantes discussions au sein de la communauté scientifique et ne seront décrites que les données faisant consensus.



**Figure 6. Représentation schématique du trafic intracellulaire de l'AAV.** Après liaison à un récepteur, les AAV peuvent être internalisés selon 3 modes : macropinocytose, endocytose ou par le système CLIC/GEEC. Ils transitent jusqu'au noyau cellulaire dans des vésicules d'endocytose dont l'acidification progressive modifie les propriétés physico-mécaniques de la capsid. Les AAV passent la membrane nucléaire où ils sont décapsidés et leur génome peut s'exprimer. (Création originale avec Canvas)

### B.2.1. Amarrage des AAV à la cellule hôte et endocytose

Il est admis qu'après liaison à des récepteurs cellulaires membranaires, l'AAV est internalisé avec l'aide de corécepteurs. Résumés dans le tableau 1, ces récepteurs et corécepteurs peuvent varier d'un sérotype à l'autre.

Après son amarrage à la membrane, l'AAV est endocyté. Les travaux à ce sujet ont d'abord décrit des vésicules recouvertes de clathrine ou de cavéoline comme intermédiaire de vésicule de transport cytoplasmique, mais d'autres mécanismes indépendants comme la macropinocytose (Bartlett et al., 2000) (Douar et al., 2001) ainsi que la voie *clathrin-independent carrier and GPI-enriched endocytic compartment* CLIC/GEEC ont également été décrites (Nonnenmacher and Weber, 2011) (Figure 6.). Bien que cet aspect reste à clarifier, l'AAV semble pouvoir emprunter différentes voies d'entrée.

### B.2.2. Trafic endosomal, lysosomal et cytoplasmique

Le trafic endosomal des AAV est une étape clé qui permet le transit des virus depuis les vésicules d'endocytose jusqu'au noyau cellulaire. Au cours de leur transport, l'acidification progressive des endosomes contenant les AAV entraîne des modifications conformationnelles de la capsidie nécessaire à l'échappement des virus du compartiment endoplasmique (Figure 6.). Par ailleurs, il a récemment été rapporté que ces modifications de la capsidie étaient probablement aidées par le récepteur « universel » AAVR (Summerford and Samulski, 2016). Les AAV transitent ensuite par l'appareil de Golgi. L'utilisation de Brefeldine A (un golgicide connu pour interrompre la synthèse protéique) a démontré l'importance de l'appareil de ce compartiment dans la progression des virus jusqu'au noyau.

Un autre aspect intéressant du trafic intracellulaire de l'AAV (au moins pour les sérotypes 1, 2, 5 et 8) est que des inhibiteurs du protéasome dont le Bortezomib, une molécule autorisée sous le nom de Velcade® augmente significativement l'efficacité de transduction *in vitro* et *in vivo* dans différents modèles animaux (Monahan et al., 2010). Cela traduit l'implication directe dans le processus d'ubiquitylation.

Pour pénétrer dans le noyau, les AAV doivent échapper à leur séquestration endosomale. Le domaine phospholipase A2 situé sur VP1, a été décrit comme indispensable à l'échappement endosomal précédent l'entrée dans le noyau (Zhang et al., 2016)(Grieger J virol 2005).

### B.2.3. Entrée dans le noyau et expression du génome

Le mécanisme d'entrée dans le noyau des cellules par l'AAV est sujet à controverses. Si certaines études rapportent que dans le cas de l'AAV2, le transport nucléaire se fait au travers du complexe protéique du pore nucléaire par un transport actif qui nécessite notamment des importines (Kelich et al., 2015; Nicolson and Samulski, 2014), d'autres ont observé que les AAV peuvent traverser l'enveloppe nucléaire au travers des pores nucléaires passivement, voire même indépendamment du NPC (Hansen et al., 2001). De façon intéressante, Xiao et collègues, ont détecté que la translocation nucléaire de l'AAV2 sauvage était bien plus rapide en présence d'un virus auxiliaire, en l'occurrence d'adénovirus (Xiao et al., 2002). Étonnamment, les auteurs décrivent que ce phénomène est conservé avec la seule présence de capsides adénovirales vides. De plus, cette étude révèle que l'utilisation de Thapsigargin (une drogue bloquant le passage active par le NPC) permettait tout de même la translocation efficace des virus dans le compartiment nucléaire en cas de co-infection. Ainsi, l'AAV, dont le diamètre (environ 25nm) est plus petit que celui d'un pore nucléaire (environ 45nm) semble pouvoir emprunter diverses voies d'entrée dans le noyau. Les raisons de l'emprunt d'une voie plutôt qu'une autre, sont encore mal connues.

Afin que le génome de l'AAV se réplique ou, dans le cas d'un vecteur recombinant, que le transgène puisse être exprimé, le matériel génomique doit être décapsidé. Sur ce point, la littérature converge majoritairement vers un phénomène intranucléaire. À l'intérieur du noyau, l'ADN simple brin doit d'abord décapsidé et avant d'être converti en ADN double brin pour être traduit. Ces étapes sont considérées comme limitantes à l'efficacité de transduction.

La fabrication d'AAV recombinants possédant un génome double brin (*self-complementary* (scAAV)) a été réalisée dans l'objectif de palier à l'une de ces étapes limitantes ; la synthèse d'un brin complémentaire et permet d'améliorer considérablement l'efficacité de transduction (McCarty, 2008b). En effet, la synthèse d'un ADN double brin dans la cellule hôte est une étape pouvant diminuer considérablement l'efficacité de transduction du vecteur. De plus, la cinétique d'expression est plus rapide par la disponibilité immédiate de la molécule bicaténaire. Le principal inconvénient du scAAV est de ne pouvoir encapsider que la moitié de la taille maximale du génome (c'est à dire  $4,7\text{kb}/2=2,35\text{ kb}$ ) (McCarty, Monahan, et Samulski 2001). Ce type de vecteur est

par ailleurs utilisé dans 6 essais cliniques dont 5 en phase active de recrutement recensés sur ClinicalTrials.gov.

#### B.2.4. Production des rAAV en laboratoire

##### B.2.4.a. Production des vecteurs rAAV dans des HEK293

En laboratoire, sans objectif industriel, la transfection transitoire de cellules HEK-293 en culture représente le protocole de production de rAAV le plus largement utilisé. La transfection est réalisée avec un plasmide contenant un transgène d'intérêt, et un ou deux autres plasmides codant pour des protéines de la capsid ainsi que des fonctions auxiliaires du virus. Quant aux fonctions auxiliaires, elles sont constitutivement exprimées par les HEK-293. C'est un système de production relativement rapide qui permet la synthèse de tous les sérotypes mais également des pseudotypes divers. Ce système trouve sa limite dans la quantité de virus qu'il est raisonnablement possible de produire par lot, incompatible avec une approche clinique de production à grande échelle. Cependant, des équipes ont montré qu'il était possible de faire pousser les HEK293 en suspension (HEK Freestyle), avec des rendements qui sont désormais équivalents à ceux des cellules adhérentes ( $10^5$  génomes viraux(gv)/ cellules) bien que ceux-ci aient été obtenus dans des bioréacteurs de 20L, ce qui reste largement insuffisant pour une production industrielle où des réservoirs >2000L sont utilisés, notamment développé pour Mydicar, un AAV1 codant pour SERCA1 et visant à traiter une pathologie cardiaque (Hajjar et al., 2008).

##### B.2.4.b. Production de vecteurs rAAV dans des cellules d'insectes Sf9 et autres types cellulaires

Les cellules d'insectes sont fréquemment utilisées pour l'expression de protéines hétérologues. Pour produire des AAV, les cellules Sf9, (une lignée immortalisée provenant de cellules d'ovaires de *Spodoptera frugiperda*) sont souvent utilisées. Ces cellules ont l'avantage de pousser en suspension, augmentant les rendements protéiques. Dans l'objectif de fabriquer des vecteurs AAV, des cellules Sf9 ont été infectées avec des baculovirus exprimant les gènes *rep* et *cap* et permettant d'obtenir des capsides d'AAV normalement conformés coinfecté avec un autre baculovirus contenant le transgène d'intérêt. De multiples optimisations ont permis de produire jusqu'à  $10^{16}$  gv dans des

bioréacteurs de 200L (Cecchini et al., 2011). C'est ce même système qui a permis à la firme uniQure la production du Glybera®.

#### B.2.4.c. Purification et *downstream process*

Le processus de purification est primordial pour que les lots de virus produits soient rigoureusement identiques afin de réduire ou d'éliminer les éventuels contaminants qui peuvent se révéler pro-inflammatoire et ainsi de minimiser la variabilité inter-lots. Les paramètres de purification peuvent radicalement influencer la réponse immunitaire et notamment par la présence de capsides vides. Deux protocoles sont classiquement utilisés en laboratoires pour purifier le lysat cellulaire clarifié contenant les rAAV, **(i)** l'un consiste à utiliser une ultracentrifugation et la formation d'un gradient de chlorure de césium et **(ii)** l'autre consiste à utiliser un gradient discontinu d'iodixanol, suivi là encore d'une ultracentrifugation. Ces étapes peuvent être ensuite complétées par une chromatographie d'affinité permettant l'obtention d'un produit final purifié avec moins 20% de contamination des lots par des capsides vides, ciblées par le système immunitaire (Grieger et al., 2016).

Les différences de protocoles de production et de purification des AAV peuvent entraîner des différences importantes dans l'efficacité de transduction d'une part, et dans l'immunogénicité du produit final d'autre part. Cet aspect-là n'a pas encore été clairement établi dans la littérature actuelle.

## C. Système immunitaire et immunogénicité multifactorielle des vecteurs de type rAAV

Son absence de pathogénicité, son tropisme large, son efficacité de transduction et ont permis en un demi-siècle à l'AAV recombinant de s'imposer au rang de vecteur de choix pour le traitement des maladies monogéniques par thérapie génique. L'obtention d'une AMM pour le Glybera a largement contribué à démontrer l'intérêt clinique pour ce type de vecteur. Actuellement, le frein principal au développement de plus larges approches thérapeutiques sont les réponses immunitaires déclenchées par l'hôte recevant les rAAV.

Ce chapitre a pour objectif de proposer une vue d'ensemble de la complexité des réponses immunitaires déclenchées par le rAAV, des stratégies déjà employées pour essayer de les contourner et celles qui sont en cours d'élaboration. Les fondements des réponses immunitaires seront d'abord introduits avant d'explorer plus particulièrement les données concernant les réponses immunitaires déclenchées par les vecteurs AAV.

Le système immunitaire comprend l'ensemble des structures biologiques assurant la défense de l'organisme contre les éléments extérieurs, en particulier les agents infectieux assurant ainsi sa survie. Chez les mammifères, les organes lymphoïdes sont de 2 types ; on appelle organe lymphoïde primaire, la moelle osseuse, berceau de l'hématopoïèse, et le thymus, lieu de maturation des lymphocytes T (LT). Les organes lymphoïdes secondaires comprennent la rate, les ganglions lymphatiques et les formations lymphoïdes associées aux muqueuses.

Sur le plan fonctionnel, le système immunitaire est historiquement divisé en un système immunitaire dit « inné » considéré comme non-spécifique de l'antigène mais capable de répondre immédiatement aux infections et un système immunitaire « adaptatif », spécifique d'un antigène donné et doué d'une mémoire immunologique agissant cependant dans un temps postérieur à l'immunité innée.

Les premières études ayant comparé l'immunogénicité de l'AAV à celle l'adénovirus, ont démontré que l'AAV était très faiblement immunogène (Zaiss et al., 2002). Les premiers essais cliniques utilisant les rAAVs ont rapidement révélés que les rAAVs déclenchaient des réponses immunitaires dirigées à la fois contre la capsid virale

mais également contre le transgène ou protéine transgénique. Ces réponses immunes s'opposaient à la pérennité du transgène dans les organes transduits et de fait, à l'efficacité de la thérapie génique au long-terme. Ainsi, de nombreuses études visant à comprendre la nature de ces réponses indésirables afin de développer des stratégies pour les contrôler et y palier se sont développées au cours des deux dernières décennies et c'est également l'objet de ce travail doctoral.

### C.1. rAAV et réponses immunitaires innées

#### C.1.1. Le système immunitaire inné : introduction

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense qu'un pathogène peut rencontrer dans la temporalité d'une réponse immunitaire. Les différents acteurs cellulaires du système immunitaire inné sont les monocytes, macrophages, qui, outre leur implication dans les mécanismes de phagocytose et dans l'initiation des processus inflammatoires sont également capables de présenter des peptides antigéniques aux cellules du système adaptatif. On notera également, les lymphocytes du système immunitaire inné (*innate lymphoid cells* (ILC)) dont la littérature compare, de par la nature des cytokines produites, la fonctionnalité des ILC1, ILC2 et ILC3 à celle des lymphocytes Th1 (helper), Th2 et Th17 respectivement, alors que celle des lymphocytes *natural killers* (NK) ressemblent plutôt aux CD8 cytotoxiques de par leur fonction cytotoxique (Björkström et al., 2013). Parmi les cellules mononuclées, on compte également les polynucléaires basophiles, neutrophiles et éosinophiles. Le complément, système multiprotéique complexe est également catégorisé parmi les *armes* du système immunitaire inné et permet l'opsonisation de divers pathogènes ou la lyse de certaines cellules ou bactéries par formation du complexe d'attaque membranaire.

Dans sa théorie des motifs moléculaires, Charles A. Janeway établie que le système immunitaire inné fonctionne notamment par reconnaissance de motifs moléculaires stéréotypiques associés au non-soi. Ces motifs qu'il nomme *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) (Janeway, 1989) peuvent se lier à des senseurs biologiques appelés *pattern recognition receptor* (PRR) à la surface de cellules du système immunitaire inné et adaptatif. On retrouve également des PRR à la surface des cellules

non-immunologiques tels que les hépatocytes, les cellules épithéliales endothéliales et musculaires qui contribuent à l'intégrité des tissus en cas d'inflammation.

Cette liaison PAMPs-PRR entraîne des cascades moléculaires et la modification de l'expression génique conduisant à la sécrétion de chimiokines et cytokines capables d'induire une réponse inflammatoire immédiate d'intensité proportionnelle à l'atteinte, et d'initier et de sensibiliser le système immunitaire adaptatif.

Les PRR sont des récepteurs de défense acquis très anciennement au cours de l'évolution, on les retrouve notamment chez les invertébrés et les plantes. Ces récepteurs sont codés par des gènes présents dans la lignée germinale, ce qui les distingue des récepteurs du système immunitaire adaptatif (SIA), qui eux, sont acquis au cours de la vie des individus.

Les PRR sont classiquement subdivisés en quatre familles, les Toll-like receptors (TLR) qui constituent une famille de 13 membres, les récepteurs NOD-like, les récepteurs RNA helicase RIG-like et les récepteurs aux lectines de type ainsi que la voie cGas-STING. Ils détectent divers motifs retrouvés sur les pathogènes ou les cellules infectées ou mortes et induisent diverses cascades de signalisation. Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) perçoivent leur environnement antigénique via ces PRR. Pendant l'inflammation, les CPA ayant captés les antigènes migrent dans les organes lymphoïdes secondaires où ils présentent les antigènes aux lymphocytes T. Les CPA induisent également des cytokines pro ou anti-inflammatoires (cf. paragraphe D.2.1.d) et expriment des molécules de costimulations qui polarisent les lymphocytes T et déclenchent des réponses immunitaires adaptatives.

Plus récemment Pradeu et Vivier ont proposé la « théorie de la discontinuité de l'immunité », qui suggère qu'une réponse immunitaire survient lorsqu'une perturbation de l'environnement immunologique d'un individu parvient à un seuil d'intensité suffisamment important mais également de manière brève pour activer le système immunitaire. A l'inverse, une stimulation continue et notamment à bas bruit va plutôt entraîner des mécanismes inducteurs de tolérance. (Pradeu et Vivier, 2016). Cette vision plus généraliste, vise à récapituler l'ensemble des théories actuelles autour de l'immunité.

### C.1.2. Les réponses immunitaires innées induites le rAAV

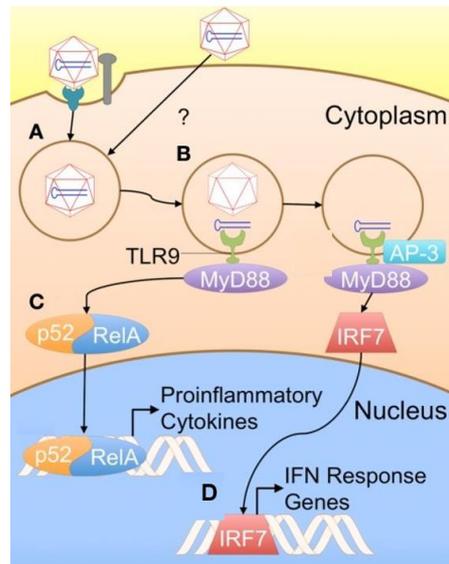
Bien que considérés initialement comme faiblement immunogènes, les modèles animaux et les essais cliniques ont démontré que les AAV sont capables de déclencher des réponses immunitaires. Concernant les réponses induites par le système immunitaire inné le **TLR2** et le **TLR9** ont été identifiés comme senseurs des rAAV (Hösel et al., 2012; Rogers et al., 2015; Zhu et al., 2009). Ces deux récepteurs sont largement exprimés sur les cellules du système immunitaire inné. Toutefois, certains TLR sont également exprimés sur les LT et peuvent moduler les réponses immunes. Les deux facteurs de transcription principalement activés après activation des TLR sont le NF- $\kappa$ B qui promeut l'expression de diverses cytokines inflammatoires et facteurs d'adhésion et l'*interferon response factor-3* (IRF-3) qui stimule la production d'interférons.

Le TLR9 est le premier senseur d'ADN à avoir été décrit. C'est un senseur intracellulaire de l'ADN situé dans les endosomes capable de détecter les îlots CpG non méthylés de l'ADN. L'ADN des hôtes viraux possède principalement de l'ADN méthylé, contrairement à l'ADN microbien. Ainsi, le TLR9 détecte l'ADN bactérien ou viral à la fois par sa composition et aussi par sa localisation. L'interaction avec MyD88 entraîne l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires déclenchant la transcription de facteur régulateur d'interféron (IFN)(IRF7)-7 et de NF- $\kappa$ B, qui finissent par déclencher la transcription d'IFN-I et des cytokines pro-inflammatoires (Honda et al., 2005). Les IFN-I participent au renforcement des réponses immunitaires innées et contribuent à l'activation des réponses adaptatives en permettant l'activation de lymphocytes naïfs, en réactivant des lymphocytes mémoires.(Zhu et al., 2009) (Figure 7.).

Le TLR9 a été identifié comme senseur du génome des rAAV dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) qui l'expriment chez l'Homme et la souris (Gilliet et al., 2008). Par ailleurs, des études invalidant le TLR9 ou la protéine adaptatrice *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88, qui est une protéine recrutée par la plupart des TLR) a démontré l'implication de cette voie dans le déclenchement de réponses humorales et cytotoxiques induites par l'injection des rAAV (Zhu et al., 2009). Récemment une étude a démontré que l'inactivation du *Tlr9* chez la souris entraînait une faible formation de CD8<sup>+</sup> spécifiques du transgène alors que celle de MyD88 entraînait la production d'IgG1 anti-transgène. Le génome des scAAV semble induire de plus fortes réponses immunitaires induites par la voie du TLR9 (Faust et al., 2013; Martino et al., 2011b).

De façon surprenante, les AAV sauvages et d'autres parvovirus ne déclenchent pas l'activation des TLR9, possiblement en lien avec l'existence de mécanismes nécessaires à l'échappement immunologique qui seraient alors perdus lors de la co-infection de vecteurs recombinants. A ce jour, la part des régions ITR dans l'immunogénicité médiée par le TLR9 n'a pas complètement été élucidée, et aucune étude publiée ne semble avoir tenté de modifier cette région pour éventuellement en diminuer l'immunogénicité.

L'optimisation des séquences d'ADN transgénique et en particulier l'élimination des séquences CpG (reconnu par le TLR9) dans le génome l'AAVrh32.33 connu pour déclencher de fortes réponses immunitaires permet de réduire ces réponses et conduit à la persistance de la protéine transgénique. Les auteurs de cette étude ont observé que les souris recevant par voie IM l'AAVrh32.33 déplété des séquences CpG, limitait l'infiltrat de cellules immunitaires (Faust et al., 2013). Une autre étude a décrit que les motifs CpG contenus dans la cassette transgénique induisaient des réponses anti-capside et anti-transgène après transfert d'AAVrh32.33 dans le muscle de souris alors qu'un AAV8 contenant le même transgène, induisaient des réponses de moindre importance (Lin et al., 2009). Bien que les auteurs n'aient pas commenté ce résultat, il est possible que la capsid artificielle rh32.33 ait également un rôle à jouer dans les réponses innées déclenchées par les AAV. Toutefois, cette étude ne compare pas l'efficacité de transduction de chacun de ces vecteurs ni le degré de transduction hépatique, ce qui induit un biais dans la comparaison des réponses immunitaires.



**Figure 7. Signalisation par les TLR. Exemple du TLR9. Modèle proposé par Rogers et collègues décrivant les réponses immunitaires induites par l'AAV. A.** Après endocytose des particules virales, **B.** les particules virales pourraient être décapsider dans le cytoplasme exposant ainsi l'ADN viral au TLR9. **C.** Cela a pour conséquence d'activer la cascade de signalisation médiée par MyD88 activant la voie NF-κB. **D** en entrant dans le noyau cellulaire, NF-κB déclenche la transcription d'interférons. Adapté de (Rogers et al., 2011)

Le TLR2, une molécule membranaire indispensable à la détection des lipoglycane viraux, a été identifié comme un senseur de la capsid virale des rAAV. Observés sur les macrophages résidents dans le foie l'exprimant (cellules de Kupffer) mais également à la surface des cellules endothéliales hépatiques (Hösel et al., 2012). L'interaction entre les TLR2 et la capsid de l'AAV induit une activation de la voie NF-κB de façon dose-dépendante (Mingozzi and Büning, 2015; Tang et al., 2010). La voie NF-κB permet à son tour le déclenchement d'une cascade moléculaire aboutissant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire.

Certains éléments du sang peuvent également être impliqués dans l'immunité innée anti-AAV. C'est le cas de iC3b une protéine appartenant au système du complément qui a été démontrés comme favorisant la phagocytose des AAV par les macrophages (Zaiss et al., 2002). Denard et collaborateurs ont également démontré que la galectine-3-phosphate humaine contenu dans le sérum était capable d'agrégier les rAAV6 ce qui limite l'efficacité de transduction pour ce type de vecteurs (Denard et al., 2013).

Ainsi le système immunitaire inné représente une première barrière s'opposant à l'efficacité de la thérapie génique. En produisant des signaux inflammatoires, le système immunitaire inné déclenche les premières étapes nécessaires à l'initiation de réponses adaptatives qui, dans certains cas, peuvent aboutir à la destruction des cellules transduites et contribuent à l'échec de la thérapie génique.

## C.2. Système immunitaire adaptatif : introduction

Le système immunitaire adaptatif (SIA) constitue la deuxième ligne de défense dans la temporalité d'une réponse immunitaire. Les récepteurs cellulaires du SIA sont acquis au cours de l'ontogénie des organismes vertébrés. Durant le développement d'un individu, des mécanismes somatiques de recombinaison des fragments de gène vont générer un répertoire clonal aléatoire de récepteurs qui vont être distribués sur les lymphocytes T et B, acteurs majoritaires de ce système. Ces récepteurs doivent être non-spécifiques du soi pour engendrer une réponse immunitaire efficace contre divers pathogènes.

### Le CMH :

Peter Gorer fit, sans le savoir, la première description du CMH en 1936. (Klein 1986 Immunogenetics). C'est après 50 ans de recherches que, le locus du gène codant pour CMH fut découvert, travaux récompensés par un prix Nobel en 1980 partagé entre Jean Dausset, Georges Snell et Baruj Benacerraf.

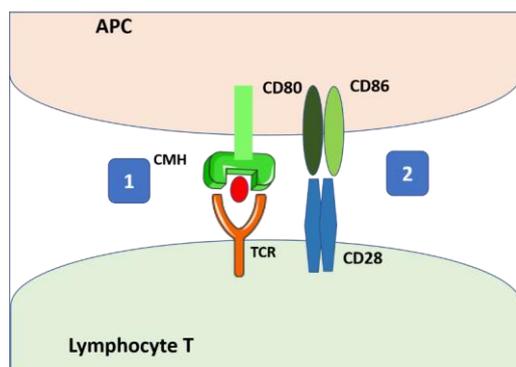
Chez l'Homme on parle de système HLA (human leucocyte antigen) et H2-k chez la souris.

C'est un système de reconnaissance de toutes entités ne portant pas les stigmates du soi, exprimé par divers types cellulaires, et conférant aux vertébrés qui l'expriment une immunité spécifique et unique à chaque individu.

### C.2.1. Immunité cellulaire : activation des lymphocytes T

L'activation lymphocytaire T résulte d'une somme de signaux reçus après rencontre d'une cellule présentatrice d'un antigène (CPA) présentant l'antigène *via* des récepteurs nommés complexe majeur d'histocompatibilité (Cf. l'encadré ci-dessus) qui est la première étape (**signal 1**). Pour que le lymphocyte s'active, un **signal 2** médié par

des molécules de costimulation est nécessaire et entraîne la différenciation et la prolifération de ces lymphocytes alors naïfs, en un phénotype dit activé (Figure 8).



**Figure 8. Signaux 1 et 2 de la costimulation d'un lymphocyte.** La cellule présentatrice d'antigène présente au TCR du LT son complexe CMH-peptide (signal 1). Un signal de costimulation passant par la liaison de CD80/CD86 à CD28 est nécessaire pour l'activation aboutisse. Cette figure est création originale réalisée avec powerpoint.

Ce signal finement orchestré, est délivré majoritairement par les molécules CD80/CD86 (B7.1/B7.2) présentes en forte densité à la surface des CPA activées (Freeman et al., 1993) qui, se liant à CD28 à la surface des lymphocytes initient la réponse immunitaire. L'inactivation de *CD28* chez la souris a démontré son rôle primordial dans la costimulation (Green et al., 1994). CD80 et CD86 jouent des rôles similaires et si l'inactivation de l'une ou l'autre n'a pas de conséquence majeure à court terme, l'inactivation des 2 entraîne l'absence totale d'activation des LT (Borriello et al., 1997). CD86 est exprimé constitutivement à un taux basal à la surface des CPA et son expression est amplifiée par l'activation de la CPA, alors que CD80 est inductible notamment par l'engagement de CD28 ou par l'interaction CD40/CD40L. Ainsi, CD86 initie les réponses immunes et CD80 les renforcent et les maintient (Freedman et al., 1987).

En l'absence de l'un des 2 signaux, l'activation lymphocytaire ne peut aboutir. L'absence du signal 1 entraîne l'**ignorance immunologique** (Larsen 1992) (voir D.2.1.a), et en l'absence de costimulation (signal 2) le lymphocyte entre en **anergie** (voir D.2. c.).

D'autre part des molécules dites «co-inhibitrices », en opposition aux molécules costimulatrices, peuvent inhiber ou du moins moduler une réponse immune. *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated antigen-4* (CTLA-4) est la molécule majoritaire à cette fonction et

fait l'objet d'une large description dans la section *E.1 CTLA-4, molécule pivot dans la tolérance immunitaire et de la prévention de l'auto-immunité*. Ces fonctions inhibitrices des réponses adaptatives cellulaires et humorales ont été utilisées pour modérer les réponses inhibitrices anti-protéine transgénique dans le cadre de transfert d'AAV (Manno et al., 2006, 2006) (Adriouch et al., 2011; Lorain et al., 2008).

### C.2.2. Les réponses cellulaires anti-rAAV engendrées par les lymphocytes T

#### C.2.2.a. La réponse immunitaire cellulaires anti-capside

La forme sauvage de l'AAV est tolérée par les hôtes du virus de telle sorte que le virus peut demeurer jusqu'à plusieurs années, chez son hôte. Pourtant, bien souvent ces hôtes ont développé une immunité anti-capside. Dans le contexte de la thérapie génique, les réponses anti-capsides de l'AAV peuvent être soit induites suite au transfert de l'AAV, soit réactivées si l'hôte a déjà été exposé aux AAV. En effet, une grande majorité des individus possèdent une immunité mémoire engendrée après l'infection asymptomatique par le virus sauvage. Lors de l'administration du vecteur thérapeutique, les clones de lymphocytes peuvent se réactiver en reconnaissance d'épitope de la capsid déjà rencontrés, cibler et détruire les cellules transduites. Une étude a décrit que l'infection asymptomatique des AAV permettait de retrouver dans le sang des patients des lymphocytes mémoires spécifiques de la capsid, effecteurs et effecteurs mémoires (Li et al., 2011). Chez l'Homme, les premières preuves de l'existence d'une immunité cellulaire anti-capsid d'AAV et leur retentissement sur l'efficacité du traitement furent décrites à la suite du premier essai clinique utilisant les AAV (Manno et al., 2006). Cette étude démontrait que l'administration de rAAV2 codant pour le FIX à des patients hémophiles entraînait une élévation asymptomatique des transaminases, reflet d'une cytolys hépatique, suivi d'une diminution très rapide de facteur IX circulant, imputée aux LT CD8 spécifique de la capsid. Ces réponses n'avaient pas été détectées lors des essais précliniques menés chez la souris et le chien hémophiles (Brockstedt et al., 1999; Mount et al., 2002; Snyder, 1999).

Un an après l'essai clinique de Manno, Mingozzi et collaborateurs caractérisaient des LT CD8<sup>+</sup> sécréteurs d'IFN- $\gamma$  spécifiques la capsid dans le sang des individus ayant reçu des rAAV-FIX. Les auteurs mettent dès lors en évidence, les effets délétères cette

immunité en thérapie génique (Manno et al., 2006; Mingozzi et al., 2009). Un autre essai clinique développé pour le traitement de l'hémophilie B et mené par Nathwani et collaborateurs et utilisant cette fois un AAV8 a rapporté la présence de cellules spécifiques de la capsidie sécrétrice d'IFN- $\gamma$ . Contrairement à l'essai de Manno, ces réponses immunitaires n'ont pas conduit à l'arrêt total de production de la protéine transgénique (Nathwani et al., 2011a).

Afin de prévenir ces effets délétères dus aux anticorps circulants, il est testé l'injection intramusculaire d'AAV dans un essai clinique visant à traiter les patients déficitaires en LPL. Là encore, les réponses dirigées contre la capsidie de l'AAV1 vont s'avérer délétère à l'issue de l'essai (Mingozzi et al., 2009). Cette étude également révélée que la dose injectée était corrélée aux réponses immunitaires. A ce jour, les patients ayant reçu le Glybera sont obligés de prendre un traitement immunosuppresseur pour prévenir les réponses immunes.

La majorité des individus étant naturellement infectés par l'AAV, un grand nombre de recherches se tourne vers la conception de nouvelles capsides capable d'échapper à l'immunité neutralisante. De nombreux épitopes de la capsidie des AAV reconnus par des anticorps neutralisants sont maintenant bien identifiés (Tseng et al., 2014). Cela permet d'envisager l'ingénierie de nouvelles capsides modifiées moins immunogènes qui ne possèdent plus les épitopes les plus reconnus.

Dans ce sens, de nombreuses publications décrivent l'émergence de nouveaux sérotypes élaborés en laboratoires sélectionnés pour leur très faible immunogénicité. Récemment Selot et collaborateurs ont publié la preuve de concept de l'efficacité de l'AAVrh.10 dont la capsidie mutante était utilisée dans pour une étude préclinique chez la souris le transfert hépatique (Selot et al., 2017). Ce nouveau variant possédant des mutations de la capsidie présente notamment l'avantage d'échapper aux anticorps neutralisants de plus 30 à 60 % en moyenne, bien qu'en somme l'efficacité de transduction ne soit pas améliorée.

#### C.2.2.b. Les réponses cellulaires anti-protéine transgénique

Après l'émergence des premières preuves de concept en 1996 par divers auteurs, le rAAV est devenu un nouvel espoir pour réussir le pari de la persistance d'une protéine

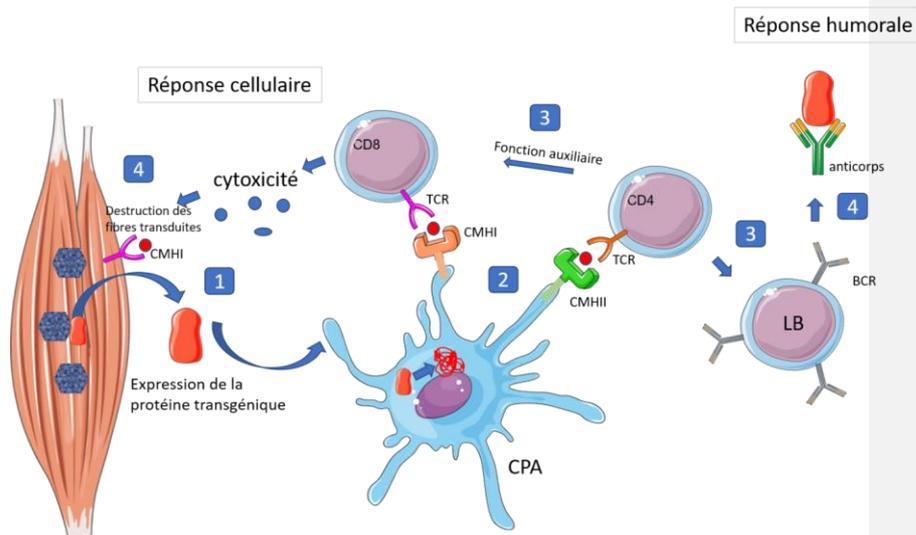
transgénique au long-terme de par ses propriétés peu immunogéniques. L'adénovirus, précédent candidat avait en effet induit chez des patients de graves réponses immunitaires et conduit au décès d'un patient. Pourtant, dès 1999, Brockstedt et collègues observèrent que les rAAVs étaient capables d'induire une réponse immune contre un antigène modèle (Ova) (Brockstedt et al., 1999). Ces travaux pionniers révélaient par ailleurs, que l'intensité des réponses immunitaires variait en fonction de la voie d'administration.

L'administration IV présente l'intérêt d'être simple d'accès. Toutefois l'administration par cette voie est notamment la cible des anticorps neutralisants qui peuvent gravement empêcher les rAAV d'atteindre leur cible. De plus, cette voie favorise la transduction de cellules non-ciblées, ce qui peut toutefois être palliée par la présence d'un promoteur spécifique d'un organe ou d'un type cellulaire.

L'administration hépatique est considérée comme une voie d'administration tolérogène (Adriouch et al., 2011; Mingozi et al., 2003) favorisée par un environnement cellulaire enclin à l'établissement de tolérance où les LSEC et les cellules de Kupffer expriment des récepteurs et cytokines favorisant l'induction de lymphocytes T régulateurs Treg FoxP3<sup>+</sup> (voir section D.2)(Thomson and Knolle, 2010). Une récente étude menée chez la souris par Kumar et collaborateurs a démontré de façon corrélée qu'une forte dose d'AAV-Ova était capable d'induire de la tolérance vis-à-vis de l'Ova alors qu'une faible dose induisait une réponse immunitaire retardée (environ 2 mois après transfert hépatique des AAV). Les auteurs de l'étude concluent sur un changement de phénotype des cellules immunitaires spécifiques de l'Ova impliquant PD-1 (Kumar et al., 2017).

Le muscle squelettique est aussi un organe d'intérêt pour la thérapie génique, l'injection intramusculaire étant peu invasive et les muscles étant très représentés dans l'organisme. Carpentier et ses collègues ont décrit que les réponses immunitaires médiées par les lymphocytes T CD8 après transfert d'AAV étaient induites par la présence de la molécule de CMH à la surface des fibres musculaires inflammées (Carpentier et al., 2015). Des infiltrats de lymphocytes, notamment de LT CD8 ont été retrouvés dans des muscles de patients lors d'essais cliniques (Mendell et al., 2012) (Figure 9). Cette publication et également une autre étude réalisée chez la souris avaient démontré que lorsque le

transgène ne code pas pour une protéine faisant complètement défaut chez l'hôte (par exemple une mutation faux sens), les lymphocytes infiltrant le muscle entraînent en apoptose suggérant la mise place de mécanismes inducteurs de tolérance immunologique. (Mendell et al., 2012 ; Velazquez et al., 2009).



**Figure 9. Les réponses immunitaires adaptatives engendrées par l'expression de la protéine transgénique. Exemple d'une protéine transgénique sécrétée après transduction musculaire des AAV.** 1/ Après transduction musculaire la protéine transgénique se retrouve dans le système sanguin de l'hôte. 2/ Des CPA captent la protéine transgénique et peuvent classiquement la présenter via le CMH I ou par présentation croisée via le CMH II et l'intermédiaire CD4 auxiliaires. 3/ Les CD4 auxiliaires peuvent à leur tour activer les LB ou les LT CD8. Les LB déclenchent la sécrétion d'anticorps (réponse humorale) et les CD8 infiltrent le muscle et lysent les cellules musculaires transduites. Cette figure est une création originale. Les représentations biologiques proviennent de la banque d'images Servier Smart Art.

La transduction musculaire des AAV conduit à des réponses cellulaires dirigées contre le produit du transgène par l'intermédiaire des CPA qui peuvent capter la protéine transgénique et la présenter selon 2 modalités.

1) En captant l'antigène, puis le dégradant par la voie du protéasome, les CPA présentent alors l'antigène par la voie du CMH I.

2) Après phagocytose des cellules transduites les CPA peuvent présenter l'antigène par l'expression du CMH II par présentation croisée (Figure 9). Cela a pour conséquence

l'activation des LT CD4 auxiliaires qui, à leur tour activent des lymphocytes B capables de sécréter des anticorps.

En effet, l'immunité cellulaire peut également induire un profil de tolérance antigénique. Dans un essai clinique récent mené par Mueller et collaborateurs visant traiter des patients souffrant d'un déficit sévère en  $\alpha$ -1-antitripsine (AAT), des quantités significatives de lymphocytes spécifiques de la capsid ont été détectées sans affecter la persistance de la protéine transgénique (Mueller et al., 2013, 2017). Les biopsies musculaires ont révélé la présence d'une grande quantité de Treg FoxP3<sup>+</sup> infiltrant les myocytes pouvant potentiellement expliquer la persistance de la protéine transgénique. Toutefois, un des critères d'exclusion de l'étude était l'existence d'une immunité connue dirigée contre l'AAT chez les patients. De plus, la déficience en AAT résulte d'une mutation ponctuelle d'un gène qui entraîne l'expression d'une protéine mal conformée. Cette protéine bien que mal conformée est toutefois produite, il existe très probablement une tolérance induite dans le thymus ce qui prévient les réponses immunitaires.

En 2010, des patients dystrophiques traités par transferts de rAAV codant pour une mini-dystrophine a entraîné des réponses immunitaires dirigées contre cette protéine qui ont conduit à un l'échec de l'essai thérapeutique. En effet, des LT sécréteurs d'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) spécifiques de la dystrophine ont été détectés. Par ailleurs, un autres critère important influençant les réponses anti-protéine transgénique est l'état inflammatoire d'un tissu qui peut diminuer significativement l'efficacité de transduction. Ainsi, une étude sur des souris dystrophiques a montré que l'inhibition de la voie IKK/NF- $\kappa$ B permettait une amélioration de la régénération musculaire après transfert d'AAV codant pour une dystrophine (Tang et al., 2010). Des résultats similaires ont aussi été observés chez des souris déficientes en  $\alpha$ -sarcoglycan (Cordier et al., 2000).

Ainsi, la voie d'administration, la dose d'AAV, la présence ou l'absence de protéine chez l'hôte constituent des critères influençant l'intensité des réponses immunitaires

Pour pallier à ses réponses immunitaires délétères, les patients reçoivent actuellement des traitements immunosuppresseurs qui sont discutés dans une autre section F. Bien que l'utilisation d'immunosuppresseurs soit l'unique option pour remédier aux effets immunologiques induits par l'injection de vecteurs, leur utilisation ne peut pas être considérée comme une stratégie satisfaisante compte tenu des complications

infectieuses et cancérogènes qu'ils peuvent induire. Ainsi, le développement d'approches visant à tolérer l'hôte vis-à-vis des rAAV est nécessaire pour que ce type de thérapie reste sûr.

### C.2.3. Immunité humorale : activation des lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) sont les médiateurs de l'immunité humorale et entraînent la sécrétion d'immunoglobulines (Ig) nommés anticorps. L'activation des LB implique l'engagement du *B-cell receptor* (BCR), une IgG membranaire qui joue 2 rôles dans l'activation des B. D'abord, comme pour le (*T-cell receptor*) TCR, sa rencontre avec un antigène peut entraîner une cascade moléculaire intracellulaire le menant à proliférer et se différencier. De plus, le BCR peut internaliser les antigènes, qui seront dégradés par la cellule puis présentés par les molécules du CMH-II par ces mêmes lymphocytes B. Ainsi les LB sont des CPA. En conséquence, des LTh CD4<sup>+</sup> interagissant avec ces molécules du CMH-II, délivrent aux LB des signaux de prolifération et de survie. Ce mécanisme, également connu sous le nom de « reconnaissance liée » a été décrit par Mitchison en 1971 (Mitchison, 1971). Ainsi, un LTh, préalablement activé par une CPA pour un antigène donné, va pouvoir interagir avec le LB spécifique du même antigène (coopération cellulaire). En effet, l'expression du CD40L par les LTh, permet après liaison à CD40 à la surface des LB d'induire, outre des signaux de proliférations, des mutations hypersomatiques qui vont renforcer l'affinité des anticorps pour l'antigène présenté. Aux côtés de CD40, CD21/CD19/CD81 et ICOS forment un complexe corécepteur qui renforce l'activation des LB.

L'activation des LB peut également se faire indépendamment de la présence des LT. Les LB expriment des TLR, ces récepteurs du système immunitaire inné décrit précédemment, capables de reconnaître des motifs moléculaires conservés, qui, lorsqu'engagé avec le BCR sont capables de fournir des signaux coactivateur suffisant à la prolifération, la sécrétion d'Ac et la survie.

Les anticorps sont sécrétés principalement par des lymphocytes B différenciés en plasmocytes. Dans certaines circonstances, les LB mémoires peuvent se réactiver et également en sécréter (Kurosaki et al., 2015). Ces Ig sont des glycoprotéines qui exercent diverses fonctions selon leur classe encore appelée isotype. L'IgM est le premier isotype à être synthétisé lorsqu'un LB est primo-activé. Par la suite, des commutations

isotypiques impliquant là encore un réarrangement génique des LB peut entraîner un changement de classe (IgM, IgG, IgA ...) qui varie fonction du type d'activation, de l'antigène.

#### Les IgG

L'IgG représente 75% des Ig totales chez les mammifères et sont concentrée en moyenne à de 10g/L chez l'Homme et la souris.

Leur structure moléculaire en Y comporte deux chaînes peptidique lourdes de 50 kDa chacune reliée par un pont disulfure. Sur chaque chaîne lourde, la partie N-terminale constituée d'un seul domaine immunoglobulinique est variable (c'est-à-dire spécifique d'un antigène) et la partie C-terminale, constituée de 3 domaines immunoglobulinique CH1, CH2 et CH3, est dite constante (identiques à toutes les Ig). Entre les domaines CH1 et CH2, une région charnière assure la flexibilité de la molécule. Une chaîne légère de 25kDa est associée à chaque chaîne lourde (deux, au total) par un pont disulfure. Ces chaînes légères sont également constituées d'une région variable en N-terminale qui contribue également à capter les antigènes tandis la partie constante de la chaîne lourde

Les régions variables des anticorps peuvent se lier très efficacement aux antigènes à la surface des pathogènes, qui une fois recouverts de ces Ig seront neutralisés, opsonisés et phagocytés par des cellules phagocytaires (telles que les macrophages).

La partie Fc des anticorps est également le support de fonctions biologiques, et peut conduire à la cytotoxicité par 2 mécanismes différents :

- (i) La liaison aux récepteurs des Fc (CD16) entraîne un mécanisme *d'antibody-dependent cell cytotoxicity* (ADCC) qui entraîne la lyse des pathogènes par des cellules cytotoxiques.
- (ii) La voie classique du complément peut également être activée par la fixation du complexe C1 au Fc. S'en suit une cascade moléculaire aboutissant la formation d'un complexe d'attaque membranaire qui détruit le pathogène ou de la cellule ciblée en créant de véritables pores à sa surface.

La sous-classe des anticorps est une sous division de leur classe. Concernant les IgG, il existe chez l'Homme les IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 par ordre d'abondance dans le

sérum. Ces sous-classes présentent environ 95% d'homologies entre elles et leur induction dépend la nature de l'antigène et du contexte immunologique.

### C.3. Les réponses humorales anti-AAV engendrées par les lymphocytes B

#### C.3.1. Les réponses anti-capside

Les réponses humorales dirigées contre la capside sont influencées (comme les réponses cellulaires) par la voie d'injection et la dose. La présence d'anticorps préexistants neutralisants dirigés contre la capside de l'AAV a été le premier frein décelé à limiter l'efficacité de transduction chez l'Homme, hôte naturel de virus sauvages. Notamment l'AAV2 infecte principalement l'Homme ; pour le chien, il s'agit de l'AAV6 (Calcedo et al., 2015). Quant aux souris de laboratoire classiquement utilisées lors des protocoles précliniques, elles sont complètement naïves. Ces différences de séroprévalence entre animaux ont initialement masqué les réponses immunitaires délétères retrouvées par la suite lors d'essais cliniques chez l'Homme étant donné que les premiers essais chez l'animal utilisaient principalement des vecteurs dérivés de l'AAV2 chez des animaux séronégatifs pour ce sérotype.

Plusieurs études cliniques ont montré qu'une faible quantité d'anticorps anti-capside était capable de neutraliser très efficacement les rAAV et d'altérer l'efficacité du transfert de gène (Moskalenko et al., 2000). C'est pourquoi les chercheurs se tournent vers la fabrication de nouvelles capsides moins immunogènes. En effet, même l'utilisation de sérotypes peu fréquents n'est pas une option idéale compte tenu des réactions croisées qui permettent aux NAb de reconnaître de nombreux sérotypes dû aux fortes homologies de séquences entre divers sérotypes (Calcedo et al., 2009). Par ailleurs, il semble difficilement concevable d'exclure les patients possédant une immunité préexistante des études cliniques et des futurs traitements, puisque plus des 3/4 de la population possèdent des anticorps anti-capside. Il n'existe pas à ce jour de méthodes permettant d'éliminer les NAb préexistants. La plasmaphérèse utilisée dans une étude, ne s'était pas montrée très méthode très convaincante, puisque seuls des titres d'anticorps initialement très faibles (1/20) étaient naturalisables (Monteilhet et al., 2011).

Les publications de Calcédo et Fitzpatrick suggèrent qu'il existe 2 types d'anticorps pouvant se lier aux capsides des AAV. D'une part les anticorps neutralisants (NAb) qui

nuisent sérieusement à l'efficacité de transduction des vecteurs injectés notamment par voie systémique et d'autres les anticorps liants (BAb). Cette seconde catégorie semble avoir un rôle opposé. En effet, Fitzpatrick et collègues indiquent que les BAb augmenterait l'efficacité de transduction *in vitro* et *in vivo* (Fitzpatrick et al., 2018).

L'injection de vecteurs dans des sites immunoprivilégiés notamment dans l'œil, a donné des résultats très satisfaisants où aucune réponse humorale n'a été détectée.

Plus récemment une nouvelle approche a été développée pour limiter l'effet délétère des Nab. Des équipes ont développé une méthode synthèse d'exosomes contenant des AAV afin d'isoler les AAV d'anticorps neutralisants. En effet ces exo-AAV sont facilement purifiables et capables de cibler diverses cellules. De façon intéressante, une équipe a démontré chez un modèle de murin de surdité (Lhfp15/Tmhs<sup>-/-</sup>) que cette stratégie permettait de rendre cibler efficacement les cellules de l'oreille pour restaurer l'audition (György et al., 2017).

### C.3.2. Les réponses anti-protéine transgénique

A l'image de la réponse cellulaire, la réponse humorale dirigée contre la protéine transgénique est multifactorielle. Lorsque la protéine transgénique est entièrement nouvelle pour l'organisme, par exemple dans le cas d'une mutation non-sens, plusieurs études ont rapporté l'émergence d'anticorps spécifiques de la protéine transgénique après transfert IV (Calcedo and Wilson, 2013) ou IM (Chirmule et al., 2000; Herzog et al., 2001). Dans le cas du remplacement d'une protéine circulante (comme le facteur IX qui est muté chez les hémophiles), il est probable que la protéine transgénique puisse être plus exposée à une réponse humorale comparée à une protéine intracytoplasmique. Toutefois, cela n'a jamais été clairement démontré. C'est pour cela que nous avons exploré cette piste au cours de cette thèse (voir résultats).

La plupart des essais cliniques excluant les patients possédant un historique de réponses immunitaires contre la protéine transgénique, peu d'études ont révélé une immunité vis-à-vis de la protéine transgénique. Ainsi, le plus souvent une tolérance connue vis-à-vis de la protéine transgénique (par exemple le cas d'un patient est suppléé par une protéine recombinante) est un bon critère pour l'implémentation d'une thérapie génique.

Toutefois, des études précliniques ont démontré que les réponses dirigées contre la protéine transgénique pouvaient s'observer : une étude menée par l'équipe de Herzog en 2002 sur des chiens atteints d'hémophilie B porteurs d'une mutation non-sens (entraînant l'absence totale de synthèse protéique) a montré que l'injection de rAAV codant pour le facteur IX induisait des réponses humorales dont l'intensité était corrélée à la dose injectée (Mount et al., 2002). Toutefois, dans d'autres expériences, il a été démontré que de fortes doses de rAAV peuvent également être à l'origine d'une tolérance vis-à-vis de la protéine transgénique. Ainsi, Mingozi et ses collègues ont observé chez des souris hémophiles dont la délétion génétique entraîne l'absence de production protéique que le transfert hépatique d'une forte dose d'AAV, l'absence de réponses immunes (Mingozi et al., 2003).

De plus en plus d'essais cliniques utilisent des promoteurs spécifiques de l'organe cible. Cette stratégie permet de limiter la transduction de cellules non-ciblées (*off-target*), en particulier de CPA qui peuvent potentiellement présenter des peptides transgéniques et induire une réponse immune. L'utilisation d'un promoteur spécifique du muscle avait un impact positif sur les réponses humorales comparées à l'utilisation d'un promoteur ubiquitaire (Cordier et al., 2001).

Récemment, des essais cliniques développés dans le cadre de l'hémophilie B et utilisant des transgènes dont les codons ont été optimisés ont rapportés des résultats très encourageants. L'expression du facteur IX était maintenue jusqu'à 31 semaines (au moins chez certains patients) et ce, en l'absence de prise d'immunosuppresseurs. (Sparks Therapeutics, 2016).

## D. La tolérance immunologique

Ce chapitre est consacré à une description des notions de tolérance immunologique et des acteurs cellulaires et moléculaires qui l'orchestrent. Le cœur de ce travail doctoral s'est focalisé sur la compréhension des mécanismes d'induction de tolérance dans le contexte du transfert de gène par rAAV avec pour objectif de proposer une stratégie visant à réduire les réponses immunitaires et potentiellement d'induire une tolérance vis-à-vis d'une protéine transgénique modèle fortement immunogène (l'ovalbumine).

La tolérance peut se définir comme un ensemble de mécanismes induisant l'absence de réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène donné et ce, de façon durable. La tolérance immunologique permet de limiter ou d'empêcher une réponse immunitaire délétère. La notion de tolérance immunologique est liée à la notion des molécules du « soi » telle que définie par Brunet et Medawar. Conceptuellement, la tolérance immunologique est **aussi** liée à la nécessité des individus d'interagir et de puiser des ressources dans l'environnement dans lequel ils vivent. En effet, l'Homme et la plupart des vertébrés vivent en symbiose avec des milliards de microorganismes formant des biofilms (microbiote) protecteurs sur leur peau et leurs muqueuses, mais aussi avec des plantes et des animaux leur apportant des nutriments, sans que leur interaction ne déclenche de réaction immunitaire. Une autre démonstration de l'importance de la tolérance peut être illustrée par les femelles des mammifères, qui doivent aussi développer des mécanismes tolérogènes leur permettant de porter et de donner naissance d'un nouvel individu génétiquement différent d'elles-mêmes.

C'est R.D. Owen qui, le premier, parla de « Tolérance immunitaire ». C'est de façon tout à fait remarquable que l'année 1945, Owen a retrouvé chez un veau des cellules sanguines génétiquement différentes de l'animal et qui provenaient son veau jumeau. Dans sa publication, il indique qu'il retrouve aussi ces cellules chez les animaux devenus adultes et donc, qu'il demeure très probablement des cellules souches provenant de son jumeau dans la moelle ; un phénomène qu'il nomma « chimérisme cellulaire ». De façon plutôt inattendue, la publication de Owen ne fut commentée que quatre ans plus tard dans le livre de FM Brunet et F Fenner « *The Production of antibodies* » en 1949. Pendant ce

**Commenté [SL1]:** Sinon on ne comprends pas le lien avec la phrase d'avant sur le soi

temps, le groupe de Medawar explorait les effets de la greffe de peau chez des veaux jumeaux dizigotiques. Alors qu'ils s'attendaient à observer un rejet de greffe allogénique, les greffes ont survécu. L'ensemble de ces découvertes ont permis d'établir que la tolérance immunologique pouvait être établie dans certains contextes seulement, comme la période néonatale et faisaient intervenir des « marqueurs du soi ».

Un individu immunocompétent, est tout à la fois capable de produire une réponse immunitaire normale, c'est-à-dire de détruire les pathogènes et cellules anormales et de tolérer non seulement ses propres cellules mais aussi les milliards de microorganismes et cellules nécessaires à sa survie.

Classiquement on distingue chez les mammifères 2 types de tolérance immunologique : La tolérance dite « **centrale** » qui permet de tolérer les antigènes du soi. Lorsque la tolérance centrale est rompue, une réaction auto-immune se produit. D'autre part, le système immunitaire est capable de tolérer naturellement des antigènes du non-soi, ce type de tolérance acquise en dehors des organes lymphoïdes primaires, se nomme tolérance « **périphérique** ».

### D.1. La tolérance centrale

La tolérance centrale s'opère dans les organes lymphoïdes primaires (dans le thymus pour les LT et la moelle osseuse pour les LB). La tolérance centrale permet aux lymphocytes T et B d'être en mesure de discriminer les antigènes du soi et de prévenir leur réactivité vis-à-vis de ceux-ci. A l'issue des mécanismes de maturation environ 95% des lymphocytes générés seront **éliminés**.

#### D.1.a. Tolérance centrale des lymphocytes T aux antigènes du soi dans le thymus

Les lymphocytes T immatures double négatifs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> migrent depuis la moelle osseuse jusqu'au **thymus**. Là, ils subissent 2 grandes étapes de sélection ; la sélection positive, puis la sélection négative qui aboutit à un phénotype mature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou du **CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>**. Les mécanismes principaux de la tolérance centrale des lymphocytes T sont la mort cellulaire.

**Commenté [SL2]:** Je ne suis pas sûre d'être d'accord sur ce paragraphe : la tolérance au soi implique aussi bien des mécanismes centraux que périphériques. Les Tregs naturels sont bien dédiés essentiellement au contrôle des réponses autoréactives, non ? Les mécanismes de tolérance à des antigènes du non soi sont effectivement appelés à des mécanismes périphériques puisque les LyT ne sont pas éduqués au niveau central vis-à-vis de ce type d'antigènes (et encore, ça pourrait être en théorie possible). Je trouve que de donner comme exemple les microorganismes comme exemple d'antigène est un peu "confusionnant". Pourquoi pas citer les alloantigènes : tolérance vis-vis du fœtus ou transplantation. Et ne citer qu'au dessus, les autres sources d'antigènes susceptibles d'induire de la tolérance : microorganismes, antigènes alimentaires (dont les allergènes), et focaliser les mécanismes de tolérance centrale et périphérique à ce qui concerne l'autoréactivité. Tu peux ensuite ou en même temps indiquer quels mécanismes sont impliqués dans la tolérance aux antigènes exogènes.

**Commenté [SL3]:** Notion d'éducation ? moi j'ai appris 95%, mais peu importe.

**Commenté [SL4]:** Non. Les progéniteurs T sont double négatifs. Ils deviennent double positifs seulement dans le thymus.

**Commenté [SL5]:** Phrase un peu alambiquée. Le phénotype mature est plus lié à l'acquisition d'un TCR et aux processus de sélection qu'à la perte de CD4 ou CD8. Je dirai : aboutit à un phénotype mature simple négatif CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>

## Etape 1 : Sélection positive

A leur arrivée dans le thymus les lymphocytes immatures doubles négatifs (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup>) vont subir des événements de recombinaison génétique qui vont aboutir au réarrangement puis à l'expression de gènes codant pour le TCR  $\alpha$  et  $\beta$ . De par la nature stochastique de ces réarrangements, il est possible que les thymocytes ne réussissent pas à générer de TCR ou que celui-ci soit possède une affinité aux peptides du soi non-adaptée. Pour éviter la génération de clones autoréactifs, seuls les lymphocytes possédant un TCR pouvant interagir avec une affinité modérée avec des molécules du CMH exprimées par les cellules du cortex thymique (cTEC) recevront des signaux de survie et de prolifération. Cette sélection extrêmement restrictive, entrainera la « mort par négligence » (c'est-à-dire absence de signaux de survie) de près de 95% des LT n'ayant pas interagit avec les molécules de CMH présenté par les cTEC. La survie des lymphocytes sélectionnés à cette étape est dépendante de l'induction de *B-cell lymphoma extra large* (Bcl-xL) (Tischner et al., 2010). Les cellules n'ayant pas reçu de signaux de survie via les molécules du CMH autologue continuent leur prolifération, leur différenciation et leur migration vers la partie centrale du thymus, nommée médulla. A l'interface entre cortex et medulla, les Tregs perdent l'expression de CD4 ou de CD8 pour devenir simple positif CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, ou CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>.

## Etape 2 La sélection négative

La sélection négative est un mécanisme de tolérance centrale induisant la mort cellulaire par apoptose de clones de lymphocytes réagissant trop fortement avec des peptides du soi présentés par des cellules épithéliales de la medulla thymique(mTEC). Les mTEC sont le type cellulaire thymique prépondérant à cette fonction présentatrice d'antigène, mais on y retrouve également des DC, des macrophages et des LB thymiques. Concernant les DC, elles sont capables de capter des antigènes en périphérie puis d'entrer dans le thymus afin de les présenter aux lymphocytes en différenciation, favorisant ainsi la sélection négative des lymphocytes T autoréactifs. Comme leur homologue cortical les mTEC jouent un rôle de CPA plutôt singulier. Elles sont capables de présenter un très large panel d'antigènes du soi d'expression tissulaire périphérique, par un phénomène nommé expression génique « non-restreinte » (*promiscuous gene expression*) unique aux cellules thymiques. La présentation de nombreux peptides antigéniques du soi par les molécules

**Commenté [SL6]:** Je me disais bien que le phrase du dessus était surprenante de ta part..... 😊

**Commenté [SL7]:** Il manqué le mot épithélial. Cellules de l'épithellim thymique cortical

**Commenté [SL8]:** Éliminées suggère tuées. Plutot les cellules qui ont reçu un signal de survie via les molecules du CMH autologue.

**Commenté [SL9]:**

**Commenté [SL10R9]:** Antigènes d'expression tissulaire restreinte en périphérie tels que (exemples...)

de CMH est dépendante de l'expression du facteur de transcription *AutoImmune Regulator AIRE* (Metzger et Anderson, 2011) et de forts taux d'expression de la molécule costimulatrice CD80. Une mutation du gène *AIRE* entraîne un syndrome multiorganique endocriné sévère appelé APECED.

L'interaction entre les LT et les CPA thymiques peut induire 3 types de destins différents des LT :

- (1) Les LT dont le TCR possède une affinité pour les complexes CMH-peptides des mTEC entraînent leur délétion par sélection négative ou une différenciation en Tregs thymique.
- (2) Les lymphocytes peuvent également être orientés vers phénotype Tregs CD4 FoxP3<sup>+</sup>, l'affinité du TCR des Tregs pour complexes CMH/peptides du soi est légèrement supérieure au T conventionnel. Toutefois, les mécanismes qui orientent la différenciation vers un phénotype Treg FoxP3<sup>+</sup> demeurent à ce jour encore mal compris. A l'issue des étapes de sélection les lymphocytes deviennent simples positifs et la sélection de leur TCR est basée sur la reconnaissance modérée pour les peptides du soi présenté par les CMH des thymocytes.
- (3) Toutefois, certains clones échappent à cette sélection, et l'affinité de leur TCR pour les peptides du soi peut être trop élevée. Alors, ces clones sont susceptibles d'induire des réactions auto-immunes en périphérie. Des mécanismes de tolérances périphériques permettent de contrôler ces lymphocytes potentiellement dangereux.

#### D.1.b. Tolérance centrale des lymphocytes B

Avant de quitter la moelle, les lymphocytes B subissent un réarrangement des gènes codant pour leurs récepteurs (BCR) et une sélection positive et négative du répertoire de BCR généré. Pareillement aux lymphocytes T, les lymphocytes B sont éliminés s'ils ne réussissent pas à générer un BCR fonctionnel (sélection positive) ou s'ils possèdent une affinité trop forte pour un antigène du soi rencontré durant cette phase de maturation et de différenciation. Le destin de ces clones dépend du ligand reconnu et peut être de 3 natures différentes :

**Commenté [SL11]:** Oui mais il ya quand me^me l'idée bien acceptée que les Tregs se différencient si l'affinité de leur TCR est dans une zone toute proche de celle induisant la deletion. Un petit schema sur la relation entre fréquence des lymphocytes en fonction de leur affinité de TCR serait bienvenu, avec les zones correspondant à la mort par negligence, la selection negative et la differenciation en Tregs.

- (1) La mort cellulaire par apoptose (délétion clonale),
- (2) La production d'un nouveau BCR (processus dénommé « *receptor-editing* »),
- (3) L'induction d'un état de non-réponse ou anergie (absence de costimulation).

## D.2. La Tolérance périphérique

La tolérance périphérique englobe l'ensemble des mécanismes inducteurs de tolérance immunologique se produisant dans les organes lymphoïdes secondaires où les lymphocytes T et B se différencient.

Dans le cas des lymphocytes T, il est maintenant bien établi que certains clones peuvent échapper à la sélection négative opérant dans le thymus. Soit parce que certains antigènes spécifiques de tissus sont absents dans le thymus, soit parce qu'ils sont insuffisamment représentés. Ainsi, d'autres mécanismes interviennent en périphérie et prennent le relai pour prévenir l'auto-immunité en induisant localement de la tolérance en empêchant l'activation de clones auto-réactifs.

### D.2.1. Tolérance périphérique : mécanismes passifs

#### D.2.1.a. Ignorance

Si un antigène est, soit insuffisamment présenté, soit séquestré dans des sites inaccessibles aux cellules immunitaires, les cellules immunitaires ignorent cet antigène. Ces sites particuliers incluent le cerveau, les testicules, et la chambre antérieure de l'œil. Il existe des barrières physiques, telles que des barrières anatomiques comme les jonctions serrées ; et des barrières moléculaires, tel que l'expression de *fragment apoptosis stimulating ligand* (FasL) (CD178) ou encore une absence/faible expression du MHC-II. Les lymphocytes qui n'entrent jamais en contact avec les antigènes qui s'y trouvent, demeurent naïfs et ignorent la présence de l'antigène. Ce phénomène est appelé tolérance par ignorance.

#### D.2.1.b. Délétion clonale

La délétion clonale intervient également en périphérie. La reconnaissance des antigènes du soi entraîne l'apoptose (délétion) des lymphocytes autoréactifs.

**Commenté [SL12]:** Après avoir lu ce paragraphe en entier, je trouve que son plan est discutable. Il y a beaucoup de notions pas forcément bien organisées à mon avis (mais c'est discutable). J'aurais fait peut être un peu plus scolaire au démarrage : mécanismes passifs (=ignorance, anergie, deletion) puis mécanismes actifs (Tregs) et après les DCTol qui favorisent les Tregs induites

**Commenté [SL13]:** Bon, là ce n'est que mon avis : je ne mélangerais pas les notions d'ignorance et de sites immunoprivilégiés. En effet Fas/FasL n'est pas un mécanisme d'ignorance.

Les antigènes du soi reconnus sans costimulation peuvent induire l'expression de récepteurs impliqués dans la mort cellulaire et leur ligand. La voie de signalisation passant par Fas/FasL est prépondérante à cette fonction. En effet les souris *lymphoproliférative* qui possèdent une mutation dans le gène Fas et les *generalised lymphoproliférative disorder* qui possèdent une mutation dans le FasL (Cohen et Eisenberg 1991), développent des anomalies immunologiques graves caractérisées notamment par un syndrome lymphoprolifératif (lymphadenopathies et splénomégalies). Chez l'Homme, le syndrome ALPS (*autoimmune lymphoproliférative syndrome*) résultant d'une mutation dans le gène Fas est associé à des symptômes fortement similaires à ceux observés chez la souris (Rieux-Laucat 1995).

#### D.2.1.c. L'anergie clonale

L'anergie survient en cas d'activation incomplète d'un lymphocyte ; soit par un manque de costimulation, soit par la liaison du lymphocyte à des molécules co-inhibitrices. PD-1 en partenariat avec ses ligands PD-L1 et PD-L2 est un récepteur inhibiteur clé dans l'induction d'anergie (Keir et al., 2008) et plus largement dans le contrôle des mécanismes d'auto-immunité (voir section E.2). L'engagement du TCR inhibe la voie de signalisation PI3K et Akt. À ce titre, l'anergie est considérée comme un mécanisme de tolérance

Bien que le mécanisme d'action diffère clairement, Parish et collaborateurs ont montré que les profils d'expression génique des cellules anergiques et en délétion étaient très similaires. Mais contrairement à la délétion, l'anergie n'entraîne pas systématiquement la mort cellulaire (Parish et al., 2009).

#### D.2.2. Tolérance périphérique : mécanismes actifs

##### D.2.2.a Les Tregs et leurs mécanismes d'action : acteurs cellulaires majeurs dans la tolérance périphérique

Les lymphocytes T régulateurs regroupent différents sous-ensembles dont les plus caractérisés sont les CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, les TR1 CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> et les TR35 CD4<sup>+</sup>IL-35<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>, les Th3 (LAP<sup>+</sup>). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Dans le cadre de ce travail, ne seront détaillés que les lymphocytes T exprimant le facteur de transcription *forkheadbox P3* (FoxP3) et l'appellation Treg fait référence à cette population cellulaire, hormis si cela est

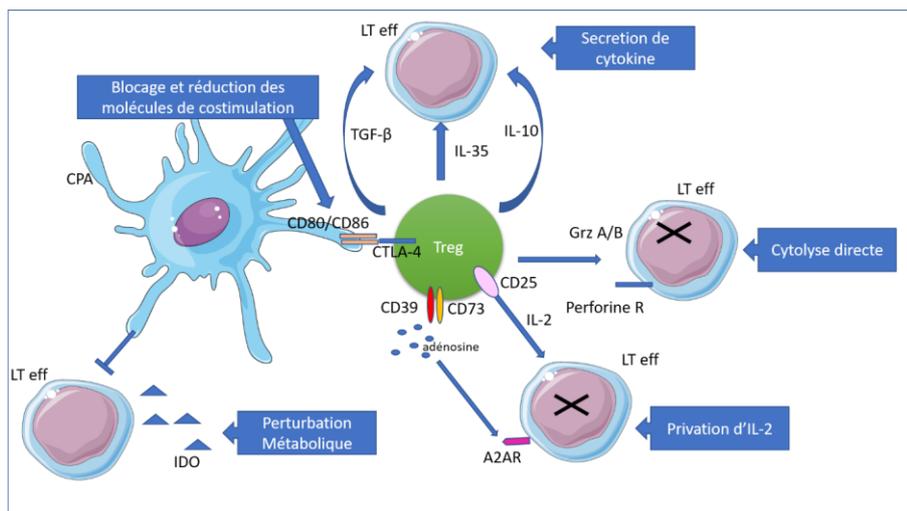
expressément détaillé. La caractérisation phénotypique des Tregs (FoxP3<sup>+</sup>) a été une tâche ardue. Initialement définis uniquement sur l'expression de fort taux de CD25 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) (Sakaguchi, 2003), d'autres auteurs ont contribué à démontrer le rôle que joue FoxP3 dans l'acquisition du phénotype régulateur (Fontenot et al., 2005).

Chez l'Homme, il semble que d'autres cellules non régulatrices expriment aussi FoxP3. Ils sont donc également caractérisés sur la base d'une faible expression du récepteur à l'IL-7 (CD127<sup>low</sup>). Par ailleurs, les Tregs expriment de fort taux de CD44. Ils expriment également tout un panel de molécules inhibitrices des réponses immunes discuté ci-après et parmi elles, CTLA-4 est indispensable à leurs fonctions régulatrices. Les Treg FoxP3 représentent 5-10% des LT CD4<sup>+</sup> périphériques chez l'Homme et 10-15% chez la souris et sont garants de l'homéostasie et du contrôle des réponses immunitaires. Ce n'est qu'en 2001, que des études menées parallèlement sur l'Homme et la souris que des mutations sur le gène *FOXP3* ont été identifiées comme responsables d'un déficit immunitaire grave, le syndrome IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enthéropathy X-linked*). Pourtant, les symptômes identifiés chez l'Homme depuis 1982, étaient fortement semblables à ceux observés chez des souris *scurfy*, (*FOXP3* KO) décrites par Russel en 1949 (Bennett et al., 2001). Ainsi, chez l'Homme comme chez la souris une mutation ou une délétion de *FOXP3* induit une auto-immunité sévère affectant de multiples organes, survenant durant la période périnatale et souvent fatale (Kim et al., 2007). De nombreuses études ont souligné l'importance de l'expression de FoxP3 dans l'acquisition du phénotype Tregs lors de la différenciation thymique (Sakaguchi, 2003; Yagi et al., 2004) et en périphérie dans le maintien du phénotype et des fonctions suppressives.

Les Tregs FoxP3<sup>+</sup> sont souvent classés en 2 catégories (i) les Treg originaires du thymus et dénommés : les Treg thymiques (parfois désignés « naturels » nTregs), (ii) ceux se différenciant dans les organes lymphoïdes secondaires ou dans les tissus Tregs périphériques et dénommés Tregs périphériques ou Tregs induits. Les Tregs expriment également le répresseur transcriptionnel Blimp-1 qui est requis pour la production d'IL-10 participant à leur survie et leur fonctionnalités (Cretney et al., 2011).

La littérature converge principalement vers 4 grands mécanismes suppressifs médiés par les Tregs (Sakaguchi et al., 2008; Vignali et al., 2008) :

(i) la sécrétion de cytokines inhibitrices, (ii) la cytolysse, (iii) modification signalétique et fonctionnelle et (iv) action sur les DC (v) la privation d'IL-2 détaillé ci-après (Figure 10).



**Figure 10. Mécanismes suppresseurs médiés par les Tregs** : sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, relargage de granzymes, forte expression des récepteurs à l'IL-2, expression de molécules co-inhibitrices et perturbation métabolique LTeff.

#### D.2.2. a.1. La sécrétion de cytokines impliquées dans la fonction des Tregs

Le rôle régulateur du TGF- $\beta$  et de l'IL-10 sécrétés par les Tregs a été démontré dans de nombreux modèles inflammatoires ou auto-immuns. Les Tregs FoxP3<sup>-</sup> peuvent être générés expérimentalement en présence, respectivement, d'IL-10 et de TGF- $\beta$  (Chen et al., 2003; Roncarolo et al., 2006). Les Tregs FoxP3<sup>+</sup> peuvent eux-mêmes être induits par les DC résidents dans les tissus CD103<sup>+</sup> en présence de TGF- $\beta$  et d'acide rétinoïque.

Le TGF- $\beta$  régule l'expression de FoxP3 dans les Tregs naïfs et entraîne l'expression parallèle de CD25 et d'autres molécules co-inhibitrices comme CTLA-4 ou *glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene/receptor* (GITR) tout en inhibant la production de cytokine pro-inflammatoire comme l'IFN- $\gamma$  ou l'IL-4 (Pyzik and Piccirillo, 2007).

L'IL-35 est directement sécrétée par les Tregs et limite la prolifération des T effecteurs. Cette cytokine est également capable d'induire la conversion de T effecteurs en Treg (iT<sub>r</sub>35) (Collison et al., 2010). L'inhibition de l'IL-35 améliore l'immunité tumorale dans de nombreux modèles murins (Turnis et al., 2016). L'équipe de Vignali a

**Commenté [SL14]**: Tu fais donc le choix de mélanger les facteurs de différenciation et les facteurs impliqués dans les fonctions suppressives. Pourquoi pas, mais c'est plus difficile à suivre. Et tu ne distingues pas trop (mais je n'ai pas tout lu, des mécanismes invoqués pour les nTregs et les pTregs. C'est les pTregs qui t'intéressent le plus, non ?

démontré que les iT<sub>reg</sub>35 (FoxP3<sup>-</sup>) induisent dans l'environnement tumoral l'expression de récepteurs inhibiteurs tel que PD-1, TIM-3 ou LAG-3 qui contribuent aux mécanismes d'échappement tumoraux.

#### *D.2.2.a.2 Blocage et réduction du nombre de molécules de costimulation disponible*

Les Tregs peuvent influencer les réponses immunitaires en interagissant avec les DC par des récepteurs inhibiteurs. CTLA-4 (dont une large description fait l'objet de la section E.1) est la molécule inhibitrice prépondérante à ce rôle et probablement la plus importante dans cette interaction (Wing et al., 2008).

#### *D.2.2.a.3 L'expression de molécules d'inhibition entraîne des perturbations métaboliques*

Les Tregs FoxP3<sup>+</sup> expriment tout un panel de molécules inhibitrices qui contribuent à leurs fonctions suppressives. Bien que décrites dans cette section, l'expression de ces molécules n'est pas restreinte au Tregs, et peuvent également être d'autres cellules immunitaires, notamment pour en diminuer l'activation. Pour ce travail, seul quelques marqueurs sont détaillés. Il est important de noter que PD-1, qui n'est pas cité ici, est exprimé par les Tregs et contribue à leurs fonctions suppressives. PD-1 fait l'objet d'une description approfondie dans la section (E.2.1. PD-1)

#### CTLA-4

Les Tregs interagissent avec les CPA qui expriment les molécules de costimulations CD80/CD86. Les perturbations métaboliques induites par les Tregs passent notamment par l'induction indolamine ou tryptophane 2,3 dioxygénase (respectivement IDO et TDO) par un mécanisme dépendant de la liaison entre CTLA-4 et ses ligands CD80/CD86. IDO et TDO sont impliqués dans la déplétion du tryptophane, un acide aminé essentiel, nécessaire à la prolifération des lymphocytes T, et la production de kynérinine un métabolite du tryptophane considéré comme immunosuppresseur. Ainsi, le catabolisme du tryptophane favorise l'émergence de Tregs et limite celle des T conventionnels (Mellor et al., 2004).

Par ailleurs, les Treg peuvent exprimer 2 ectoenzymes (CD39 et CD73) qui catabolise l'ATP extracellulaire et contribuent à la formation de l'adénosine extracellulaire. En se liant à ses récepteurs à la surface des T effecteurs (les récepteurs A2A), l'adénosine diminue les fonctions effectrices des lymphocytes et promeuvent la conversion en Treg par un mécanisme dépendant du TGF- $\beta$  (Borsellino et al., 2007;

Deaglio et al., 2007). L'engagement du récepteur A2A permettrait également l'induction de Treg ex-Th17 en réprimant l'IL-6 et en induisant la production de TGF- $\beta$  (Zarek et al., 2008).

#### LAG-3

LAG-3 est exprimée notamment par les Tregs et possède une affinité supérieure pour le CMH-II que le CD4 avec qui elle entre en compétition (Huard et al., 1995). Cette liaison prévient la signalisation passant par le TCR et le corécepteur CD4 par encombrement (Liang et al., 2008). L'invalidation de *Lag-3* n'entraîne pas de défauts immunologiques majeurs suggérant des mécanismes relais. Cependant, les souris NOD invalidées pour *Lag-3* développent un diabète accéléré (Miyazaki et al., 1996) suggérant un défaut dans les mécanismes de régulation auto-immuns. Par ailleurs, deux études sur l'environnement tumoral ont démontré que (i) les Tregs FoxP3+ exprimant LAG-3 présentait un phénotype activé (sécrétion d'IL-10 et de TGF- $\beta$ ). (ii) La présence de Tr1 exprimant Lag3 chez des patients atteints de cancer colorectal était de mauvais pronostic.

Commenté [SL15]: Les revoilà !

#### TIGIT

*T cell immunoglobulin and ITIM domain* TIGIT est une molécule inhibitrice antagoniste de la costimulation jouée par CD226, capable de se lier au récepteur du poliovirus PVR CD115 et CD112. L'interaction entre TIGIT et CD155 exprimé par les DC entraîne l'inhibition de la production d'IL-12 et augmente celle de l'IL-10 (Yu et al., 2009). Comme son nom l'indique, TIGIT possède un domaine intracellulaire inhibiteur ITIM qui contribue à relayer un signal inhibiteur. TIGIT peut être exprimé par les lymphocytes T conventionnels mais aussi par les Tregs. TIGIT ne joue pas un rôle primordial dans la répression des signaux d'activation médié par les Tregs comme le suggère l'invalidation génétique du gène. TIGIT est exprimée sur les Tregs (Yu et al., 2009) et régulée par l'expression de FoxP3 (Zhang et al., 2013). Une étude a démontré que les Treg exprimant TIGIT, exprimaient aussi de plus forts taux de PD-1, CTLA-4, LAG-3 et TIM-3 et possédait une activité suppressive plus importante (Fuhrman et al., 2015).

#### TIM-3

*T cell immunoglobulin-3* (TIM-3) est une molécule appartenant à la famille des TIM. Exprimée principalement par les cellules sécrétrices IFN- $\gamma$  (LT CD8 ou LTh1 CD4), mais également par les Treg et d'autres cellules immunitaires telles que les DC, NK et monocytes. Identifié en 2002 par Monney et collaborateurs comme jouant un rôle

important dans le contrôle des réponses auto-immunes, le blocage de TIM-3 par un anticorps bloquant entraînait une exacerbation de l'EAE. Un an plus tard, une autre équipe **démontrait** que l'invalidation de TIM-3 exacerbait les réponses immunitaires après immunisation par un peptide dans un modèle de souris susceptible à EAE et l'administration de TIM-3/Ig diminuer les réponses immunes (Sabatos et al., 2003). TIM-3 possède 3 ligands connus à ce jour. La galectine-9 a été le premier ligand identifié, en démontrant qu'elle induisait l'apoptose des Th1 (et non des Th17) exprimant TIM-3 dans un modèle d'EAE (Zhu et al., 2005). La phosphatidylsérine, retrouvée sur les cellules en apoptose est un ligand commun à la famille des molécules TIM et aussi un ligand de TIM-3. TIM-3 est également le partenaire de *high mobility group protein B1* un récepteur d'acides nucléiques et de CEACAM-1 **démontré** récemment dans des cellules épuisées (*exhausted*) (Huang et al., 2015).

**Commenté [SL16]:** Faut choisir le temps : imparfait ou passé simple ? Cf phrase d'avant. ☺

**Commenté [SL17]:** Identifié

#### D.2.2.a.4 Privation des lymphocytes T conventionnels pour l'IL-2

Les Tregs FoxP3<sup>+</sup> expriment un plus fort taux de CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2) que les autres lymphocytes. Ainsi en captant l'IL-2 dans le milieu ils privent les T effecteurs de ce facteur trophique (Thornton and Shevach, 1998).

**Commenté [SL18]:** chaîne alpha du récepteur d'ailleurs.

#### L'IL-2

L'IL-2 est une interleukine pléiotropique. L'IL-2 est un puissant mitogène et facteur des cellules immunitaires intervenant dans les phases d'inflammation mais également de résolution inflammatoire. L'invalidation génétique du gène codant pour l'IL-2 conduit à un phénotype auto-immun sévère pouvant conduisant à la mort des souris. Les souris invalidées pour l'IL-2 induit une forte lymphopénie des Tregs. L'IL-2 est donc indispensable à l'induction, au maintien et à la survie des Tregs.

L'IL-2 joue également un rôle important de facteur de croissance pour les LT conventionnels et participe à leur différenciation phénotypique et l'expression de cytokine ad hoc en combinaison avec d'autres facteurs. Notamment, l'IL-2 participe à l'acquisition du phénotype cytotoxique des LT CD8 capable de sécréter des IFN. L'IL-2 joue également un rôle critique dans l'acquisition du phénotype mémoire des lymphocytes après la résolution d'une inflammation.

#### D.2.2.a.5 La cytolysse et relargage de granzyme B

La cytotoxicité n'est pas l'apanage des lymphocytes T cytotoxiques ou des NK. Plusieurs études ont démontré que les Tregs peuvent supprimer très efficacement des cellules, par relargages de granzymes et de perforines. Initialement, ce mécanisme a été démontré pour la suppression des lymphocytes B médié par les Tregs relarguant des granzymes mais, ce mécanisme a aussi été décrit concernant la suppression d'autres cellules comme les NK et les lymphocytes T conventionnels. Notamment, dans un modèle murin de transplantation, des souris invalidées pour le granzyme B possèdent une capacité suppressive moins efficace (Gondek et al., 2008).

D'autres cellules contribuent aux côtés des Tregs à l'induction et la maintenance d'une tolérance périphérique tels que les LB régulateurs ou les DC tolérogène et bien d'autres. Ces cellules et leur rôle régulateur ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

## E. Modulation des Réponses immunitaires médiées spécifiquement par CTLA-4 et PD-L1

Dans l'objectif d'induire de la tolérance vis-à-vis d'une protéine transgénique immunogène, dont les réponses immunitaires dirigées contre elle s'oppose à l'efficacité de protocoles de thérapie génique, j'ai étudié spécifiquement l'impact de molécules immunorégulatrices recombinantes dérivées de CTLA-4 et de PD-L1. Ce chapitre est donc consacré à une description approfondie de CTLA-4 et de PD-L1 ainsi que de leur intérêt potentiel individuel mais également combiné dans l'induction de tolérance immunologique.

### E.1 CTLA-4, molécule primordiale pour l'acquisition et le maintien de la tolérance immunitaire

Depuis son identification en 1987 (Brunet et al., 1987), la communauté scientifique a énormément étudié le rôle critique que jouent CTLA-4 dans le contrôle des réponses immunitaires, mais également leur implication dans les mécanismes de tolérance immunitaire et les maladies auto-immunes chez la souris et chez l'Homme. (Walunas, 1994 et Walunas, Bakker et Bluestone 1996)

Cytotoxic T lymphocyte-associated molécule-4 (CTLA-4, CD152) a été identifiée lors d'une étude du répertoire des lymphocytes T (Brunet et al., 1987). Le gène codant pour CTLA-4 et celui pour CD28 sont structurellement semblables. Ils sont tous deux localisés sur la bande q33 du chromosome 2 et sur la bande c du chromosome 1. **CTLA-4 est la molécule majoritaire d'inhibition** des réponses immunitaires adaptatives. Son rôle est antagoniste de celui de CD28 dont la notion provient de résultats obtenus lors d'études *in vitro* au moyen d'anticorps bloquant la fonction de CD28 ou CTLA-4 (Krummel and Allison, 1995; Walunas et al., 1994).

CTLA-4 et CD28 partagent les mêmes ligands CD80/CD86 (B7-1/B7-2). L'affinité de CTLA-4 étant près de 20 fois supérieure à celle de CD28, CTLA-4 se lie préférentiellement aux molécules B7 (Collins et al., 2002; Linsley et al., 1994). Cette liaison a un effet inhibiteur précoce de la réponse immunitaire entraînant une diminution de la sécrétion d'IL-2 (détaillé ci-après), l'inhibition de la progression du cycle cellulaire et la modification de la signalisation intracellulaire. Ainsi, le rôle de CTLA-4 peut être

défini comme un « modérateur de la liaison de CD28 aux molécules de costimulation » contrôlant ainsi l'intensité d'une réponse immune.

Différentes équipes se sont interrogées sur la fonctionnalité des différents domaines de CTLA-4 afin d'identifier les parties indispensables à ses activités immunorégulatrices. CTLA-4 est une molécule membranaire sous forme d'homodimère où chaque monomère possède une partie cytosolique, une partie membranaire et une partie extracellulaire. Des études menées *in vivo* et *in vitro* avec des Tregs exprimant uniquement la partie extracellulaire de CTLA-4 ont montré que la fonctionnalité suppressive de ces cellules n'était pas affectée alors qu'une déficience de la partie extracellulaire ou complète d'un gène n'est pas viable (Carreno et al., 2000; Masteller et al., 2000). La partie extracellulaire semble donc suffisante pour induire un effet inhibiteur des réponses immunitaires, du moins chez les Tregs.

La partie cytoplasmique comprend différents motifs qui contrôlent les cycles de recrutement/endocytose/recyclage de la molécule mais ne jouent aucun rôle dans la fonction inhibitrice de CTLA-4. Notamment, la rétention de CTLA-4 à la surface des cellules est dépendante de la phosphorylation de Lck et ZAP-70, sur des tyrosines situées au niveau de la partie intracytoplasmique de la protéine (Baroja et al., 2000) empêchant la liaison avec la molécule adaptatrice AP-2 et prévenant de cette façon l'internalisation de CTLA-4. Par ailleurs, à l'identique de PD-1, la partie intracellulaire de CTLA-4 peut interagir avec SHP2, ce qui résulte en la déphosphorylation du TCR participant ainsi à l'inhibition de la réponse immunitaire, prolifération et survie cellulaire. Ainsi, un des domaines de la partie intracellulaire possède un effet indirect d'inhibition de la réponse immunitaire, bien que cette fonction ne semble pas indispensable à la fonctionnalité de CTLA-4, comme le montre les expériences de suppression de la partie intracellulaire chez les Tregs (cf. paragraphe précédent).

L'importance de CTLA-4 dans le maintien de la tolérance immunologique a clairement été démontré par son invalidation génétique chez la souris qui provoque un syndrome lymphoprolifératif massif associé d'une auto-immunité multi-organique fatale chez des souriceaux nouveau-nés (Khattri et al., 1999). Il est maintenant établi que cette pathologie est liée à l'engagement continu de CD28, qui n'étant plus contrôlé entraîne une activation délétère des lymphocytes, réaffirmant les rôles opposés de molécules CD28 et

CTLA-4. En effet, l'administration de la molécule de fusion CTLA-4-Ig chez des souris CTLA-4 KO est suffisante pour prévenir du phénotype auto-immun (Tivol et al., 1997). Réciproquement, les souris CTLA-4/CD80/CD86 KO ne présentent pas ce phénotype non plus (Mandelbrot et al., 1999). La délétion du CTLA-4 chez la souris adulte induit un syndrome d'auto-immunité généralisé semblable, sans toutefois être fatale. Dans ces conditions l'auto-immunité est associée à une expansion du compartiment des Tregs comme un mécanisme compensatoire (Klocke et al., 2016). Il a également été retrouvé chez ces animaux de forts taux d'IL-10 et de TGF- $\beta$  probablement responsable de l'absence d'auto-immunité. L'absence d'auto-immunité peut également être discutée par le système même d'étude. En effet, les auteurs ont utilisé un système de délétion génique de type Crelox inducible au tamoxifène. Or, cette technique de délétion n'étant pas toujours efficace à 100%, il a pu en résulter du maintien d'un pourcentage non négligeable de cellules pouvant toujours médier leurs effets régulateurs de manière extrinsèque (voir le paragraphe E.1.b.b). De façon intéressante, l'invalidation génétique de CTLA-4 spécifiquement chez les Treg FoxP3 entraîne également l'expansion des Tregs. Il semblerait dans les deux cas que cette augmentation ne soit pas due à une sélection au niveau thymique mais plutôt à un mécanisme d'induction de Tregs périphériques visant au rôle joué par CTLA-4, par les autres fonctions suppressives des Tregs (D.2.2.a). Toutefois l'invalidation de CTLA-4 spécifiquement dans les Tregs de façon constitutive ou induite chez la souris adulte conduit à une auto-immunité massive et fatale mettant en exergue l'importance de l'expression de CTLA-4 chez les Tregs FoxP3<sup>+</sup>.

#### E.1.a. Expression de CTLA-4

L'expression de *Ctla-4* semble surtout restreinte aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> bien que certains auteurs aient rapporté sa présence sur les lymphocytes B (Quandt et al., 2007), les DC, les lymphocytes NK activés ou les monocytes. CTLA-4 est capable de contrôler les réponses cytotoxiques et humorales. Une caractéristique de cette molécule est que 90% du stock cellulaire des molécules de CTLA-4 demeurent majoritairement dans des vésicules intracytoplasmiques et sont recrutées à la membrane en cas d'activation cellulaire (Linsley and Golstein, 1996) FoxP3 et NFAT sont d'importants régulateurs transcriptionnels de *Ctla-4*. Les microARN (mir)145 et mir155 régulent post-transcriptionnellement *Ctla-4* (Fayyad-Kazan et al., 2012) et leur altération est associée à des symptômes d'auto-immunité (Sonkoly et al., 2010). Les formes humaine et murine

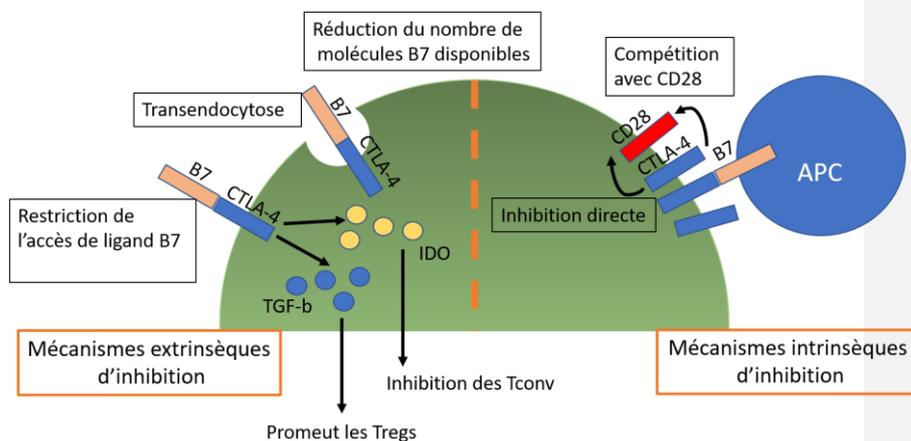
partagent 76% d'homologie et les parties intracellulaires des deux molécules sont identiques. Concernant les lymphocytes T conventionnels CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> et FoxP3<sup>+</sup>. L'expression de CTLA-4 à la surface des cellules est proportionnelle à la stimulation du TCR et le recrutement de la molécule se fait dans le voisinage de la synapse immunologique environ 3 jours après initiation de la réponse immune. Ce mécanisme peut être considéré comme un rétrocontrôle négatif limitant l'activation des lymphocytes. Après stimulation par le TCR, les LT sont capables de sécréter des microvésicules (ou exosome) contenant CTLA-4 bien que le rôle de ce mécanisme n'ait pas encore été complètement élucidé (Esposito et al., 2014). Ainsi la quantité de CTLA-4 présent à la surface des lymphocytes est régulée par divers mécanismes, non seulement la protéine est rapidement endocytée et recyclée mais il est possible que les cellules se libèrent des microvésicules contenant CTLA-4 pour réguler la quantité intracellulaire.

D'autre part, CTLA-4 est exprimée de façon constitutive à la surface des lymphocytes T régulateurs (Treg) FoxP3<sup>+</sup> (Harper et al., 1991; Walunas et al., 1994) et contribue à l'activité suppressive de ces Treg. Toutefois son invalidation génétique dans les Treg spécifiquement ne prévient pas totalement leur fonction suppressives (Tang et al., 2004) pourtant, les souris Foxp3CreCTLA-4<sup>fl/fl</sup> pour lesquelles la suppression de *Ctla-4* est inductible, développent une atteinte multiorganique ressemblant fortement à l'invalidation constitutive de CTLA-4 décrite en 1995 par deux équipes différentes (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995). Ce phénotype démontre le rôle crucial et sans redondance médié par CTLA-4. Néanmoins, une autre étude plus récente a montré qu'une invalidation de *Ctla-4* dans les Treg chez la souris adulte entraîne paradoxalement une expansion de cette population cellulaire, ce qui diminue l'auto-immunité chez ces souris (Paterson et al., 2015). Ainsi il semblerait que chez les souris adultes des mécanismes compensatoires puissent être établis bien que ceux-ci restent à clarifier.

CTLA-4, comme d'autres molécules inhibitrices est surexprimée à la surface de diverses tumeurs solides comme les carcinomes, mélanomes, neuroblastomes, rhabdomyosarcomes, ostéosarcomes mais aussi dans certains lymphomes. Ce mécanisme contribuerait fortement à l'échappement des tumeurs à l'immunité tumorale. L'expression de CTLA-4 par les tumeurs et sur les cellules du système immunitaire en a fait une cible majeure pour les thérapies antitumorales avec notamment le développement de l'Ipilimumab un anticorps monoclonal thérapeutique

## E.1.b. Mécanismes d'inhibitions médiés par CTLA-4

Walunas et collaborateurs ont décrits il y a plus de 20 ans que CTLA-4 inhibait la prolifération des LT, la progression du cycle cellulaire et la synthèse d'IL-2. CTLA-4 agit par divers mécanismes dont les plus décrits sont détaillés ci-après. Il est admis que les régulations immunologiques médiées par CTLA-4 peuvent être intrinsèques, i.e. que l'expression de CTLA-4 sur une cellule permet à cette même cellule de contrôler son activation ou extrinsèque ; dans le cas l'expression de CTLA-4 entraîne l'inhibition d'une autre cellule.



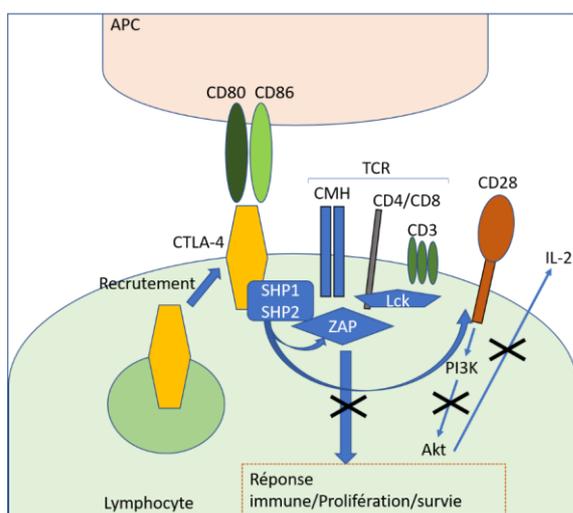
**Figure 11. Mécanismes d'inhibition médiés par CTLA-4.** Mécanismes intrinsèques : (1) compétition pour les mêmes ligands que CD28 avec une affinité supérieure. (2) Sur les Tregs la partie intracellulaire de CTLA-4 peut se lier à la kinase PKC- $\eta$  et moduler les fonctions des Tregs. Mécanismes extrinsèques : (1) Arrachage de B7-1 et B7-2 par transendocytose ou trogocytose pour en réduire la quantité disponible. (2) Inhibition indirecte par liaison à B7-1 et B7-2 entraînant la sécrétion de TGF- $\beta$  et d'IL-10 ou encore d'IDO. (3) Autres mécanismes à titre d'exemple : réduction de la mobilité cellulaire. Le schéma est une création originale.

## a-Mécanismes intrinsèques médiés par l'expression de CTLA-4

1- *Compétition directe avec CD28 pour CD80/CD86*

Rapidement après la liaison du TCR au complexe CMH-peptide, l'engagement de CD28 aux molécules de costimulation B7.1/B7.2 non seulement renforce l'activation et la fonctionnalité des lymphocytes T mais aussi induit une autorégulation par le recrutement de molécules telles que CTLA-4, situé dans des vésicules du compartiment cytoplasmique. (Walunas, 1994).

La liaison de CTLA-4 a un effet antagoniste de la costimulation positive médiée par CD28. Ainsi, CTLA-4 possède les mêmes ligands que CD28, (i.e. CD80/CD86) mais possède une affinité plus importante que CD28 et son recrutement entraîne une liaison préférentielle à ses ligands. La conséquence de cette liaison est un effet inhibiteur précoce de la réponse immunitaire entraînant une diminution de la sécrétion d'IL-2, l'inhibition de la progression du cycle cellulaire et la modification de la signalisation médiée par le TCR. Figure 12.



**Figure 12. Détail de l'impact sur la signalisation passant par le TCR.** L'engagement du TCR, CTLA-4 est recruté à la membrane et entre en compétition avec CD28. Son affinité supérieure lui permet de déplacer les molécules CD28 alors liés à CD80/CD86. En plus, la queue intracellulaire peut recruter la phosphatase SHP2 qui en déphosphorylant notamment ZAP70 et CD28 diminue l'intensité de la réponse immunitaire et des molécules de costimulation. La figure est une création originale.

- 2- La partie intracellulaire de CTLA-4 permet le recrutement de la molécule au niveau des synapses immunologiques

La partie intracellulaire de CTLA-4 possède un domaine d'interaction avec la protéine kinase C  $\eta$  (PKC- $\eta$ ) en particulier chez les Tregs. Une équipe a démontré que cette interaction renforce le recrutement de CTLA-4 au niveau de la synapse immunologique et permettait ainsi à la molécule de diminuer le nombre de molécules CD80/CD86 disponibles à la surface des cellules (mécanismes

extrinsèques décrit dans la section b-). En effet, la mutation du domaine d'interaction avec PKC- $\eta$  de CTLA-4 a pour conséquence d'enrayer les mécanismes de transendocytose des molécules de costimulation dans un modèle de mélanome B16 chez la souris (Kong et al., 2014; Pedros et al.).

#### b-Mécanismes extrinsèques médiés par l'expression de CTLA-4

La première expérience ayant démontré indirectement l'implication des mécanismes extrinsèques dans le contrôle des réponses immunitaires et notamment d'auto-immunité ont été décrit après l'observation que le transfert des cellules de moelles CTLA-4<sup>-/-</sup> mélangés avec des cellules moelle provenant de souris normales et donnait un phénotype normal (immunocompétent et sans auto-immunité) chez des souris RAG KO alors que le transfert de cellules uniquement CTLA-4<sup>-/-</sup> donnait les mêmes symptômes d'auto-immunité que les souris CTLA-4 KO (Bachmann et al., 1999; Ise et al., 2010).

#### Restriction du nombre de molécules B7 à la surface des CPA

Le groupe de Sakagushi avec d'autres équipes ont montré que la présence de CTLA-4 à la surface des Tregs FoxP3<sup>+</sup> pouvait diminuer l'expression des molécules de costimulation CD80/CD86 (sans diminuer pour autant CD40 ou l'expression du CMHII) à la surface des cellules dendritiques. Ce phénomène est possible par l'adhésion des Tregs aux DC par l'intermédiaire de LFA-1 (Onishi et al., 2008). L'étude démontrait par ailleurs que l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-CTLA-4 impactait fortement ce phénomène, qui était complètement abrogé par l'utilisation de Tregs déficients pour CTLA-4. Le mécanisme responsable de ce phénomène a été décrit par Qureshi et collaborateurs qui ont démontré que les LT effecteurs ainsi que les Tregs pouvaient diminuer l'expression des molécules costimulatrices par transendocytose par l'intermédiaire de CTLA-4. Ainsi, en se liant aux molécules de costimulation, CTLA-4 exprimé par un lymphocyte peut dérober les molécules de costimulation exprimées à la surface d'une CPA (Qureshi et al., 2011). De façon intéressante une autre équipe a démontré que les Treg peuvent également faire l'acquisition de CD80 et CD86 par un mécanisme appelé trogocytose consistant en l'échange d'un fragment de membrane lipidique, indépendamment de la présence de CD28 ou PD-L1 (Gu et al., 2012).

### 3- Induction de cytokines inhibitrices

En dehors des mécanismes liés à l'interaction directe de CTLA-4 avec les molécules de costimulation, CTLA-4 peut agir indirectement sur le métabolisme des DC et LT en induisant la production d'IDO (Grohmann et al., 2002) qui, à son tour catabolise le tryptophane indispensable à la prolifération (Munn et al., 1999). D'autre part, l'engagement de CTLA-4 a été rapporté comme entraînant la production de TGF- $\beta$  par les lymphocytes (Chen et al., 1998; Zheng et al., 2006). Par ailleurs, l'absence de CTLA-4 entraîne l'augmentation de la production d'IL-10 comme attesté par les expériences faites avec des souris CTLA-4 KO. Bien que cela n'ait jamais été décrit il est possible que la sécrétion d'IL-10 et l'expression de CTLA-4 soient permises dans un équilibre finement régulé.

### 4- Effets de CTLA-4 sur la motilité cellulaire.

L'influence de la CTLA-4 sur la motilité cellulaire est un aspect assez controversé.

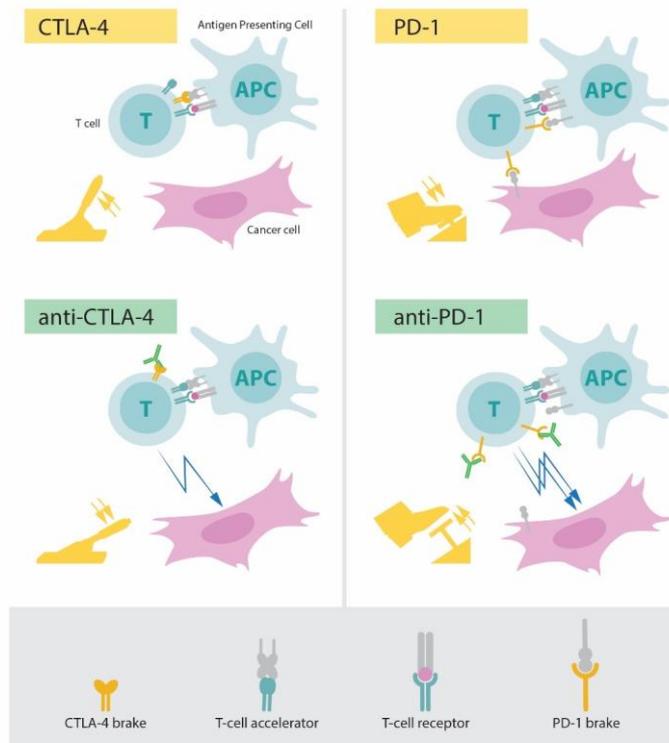
Initialement, CTLA-4 a été proposé comme étant un frein moléculaire limitant l'engagement du TCR avec la CPA (stop-signal) (Schneider et al., 2006). Puis, une autre étude a démontré que cet impact sur les T était fortement restreint aux LT conventionnels (Lu et al., 2012). Deux ans plus tard, une autre étude démontrait que l'utilisation d'anti-CTLA4 bloquants permettait de rendre les LT CD4 effecteurs et Tregs plus mobiles alors qu'ils ralentissaient les mouvements des LT CD8 effecteurs et stabilisait la synapse immunologique (Devarajan et al., 2014).

Une autre étude proposait que cet impact sur la mobilité des lymphocytes lors de l'utilisation d'anticorps bloquants CTLA-4 était attribuable d'une part à l'encombrement des synapses immunologiques qui limitent les interactions moléculaires, et d'autre part au mécanisme d'ADCC inhérent à l'utilisation de cette classe d'anticorps. Ainsi, les auteurs concluaient sur la mise en garde de l'utilisation d'anti-CTLA-4 comme outils d'étude des fonctions de CTLA-4 qui peuvent entraîner des biais d'interprétation des données.

Enfin, au moins une étude rapporte l'absence d'évidence quant à l'implication claire de CTLA4 sur la mobilité des cellules (Fife et al., 2009).

### E.1.c. Développement clinique de molécules ciblant la signalisation passant par CTLA-4/CD28/B7

CTLA-4 étant la molécule majeure impliquée dans le contrôle de l'activation lymphocytaire, elle est rapidement devenue une cible intéressante pour le développement de nouvelles thérapies. Ainsi, la firme Bristol-Myers Squibb a développé un anticorps monoclonal bloquant CTLA-4, l'Ipilimumab, qui a été commercialisé en 2011 sous le nom de Yervoy, qui a contribué à une révolution dans le traitement de certains cancers très agressifs comme le mélanome décrit dans un article pionnier dans l'immunothérapie du cancer (Hodi et al., 2010) (figure 14). Ce médicament est le fruit de recherches initiées par James P. Allison aux Etats-unis, qui furent récompensés très récemment d'un prix Nobel. Ce prix Nobel fut partagé avec Tasuku Honjo, qui lui a découvert PD-1 et décrit ses fonctions inhibitrices des réponses immunitaires et par ailleurs démontré l'efficacité des anticorps bloquants PD-1 dans différents modèles tumoraux (Figure 14). Leurs travaux ont contribué non-seulement à l'émergence d'une nouvelle ère dans la prise en charge de cancers mais également à la compréhension de mécanismes d'échappement tumoraux.



**Figure 14. Les anticorps bloquant CTLA-4 et PD-1 réactive les lymphocytes T.** Sur les panels du haut (encadrés jaune), la situation en l'absence de traitement par anticorps bloquants. L'inflammation et l'environnement tumoral induisent l'expression de CTLA-4 et de PD-L1. Les panels du bas montrent la situation sous traitement par anticorps bloquant soit CTLA-4 (à gauche), soit PD-1 (à droite). Les deux situations permettent de « lever les freins d'inhibition » permettant de réactiver le système immunitaire. La figure est empruntée à [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org).

L'objectif de ces travaux ont eu finalement un objectif opposé à ce travail doctoral, qui, au contraire a eu pour objectif, non pas de lever l'inhibition médiée par l'expression de CTLA-4 et de PD-L1 mais bien de renforcer ces voies, au moyen de molécules recombinantes et dérivées de ces protéines naturelles. (Voir la section RESULTATS).

Le rôle central joué par CTLA-4 dans l'inhibition des réactions immunologiques a également été exploité pour contrôler les réponses immunitaires indésirables dans le domaine de la greffe allogénique et dans le traitement de certaines pathologies auto-immunes. En 2005, la même firme Bristol-Myers Squibb développe l'Abatacept : une

molécule comprenant la partie extracellulaire de CTLA-4 fusionnée au fragment cristallisable d'une IgG1 (CTLA-4/Ig) et utilisé pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde et de l'arthrite juvénile idiopathique. En 2017, ce médicament obtient également une autorisation pour le traitement de l'arthrite psoriasique. Son mécanisme d'action est toujours en cours d'investigation, il semblerait qu'il intervienne principalement dans le blocage de la costimulation en saturant les molécules CD80/CD86. Une étude clinique de transfert hépatique, a démontré notamment que CTLA-4/Ig n'était pas capable d'induire la synthèse d'IDO.

En 2011, le Belatacept, une molécule pratiquement identique à l'Abatacept à l'exception de deux mutations (L104E et A294Y) visant à augmenter l'affinité du médicament aux molécules CD80/CD86 obtient une autorisation pour la prise en charge de rejet de greffe. Dans le cas d'une greffe de rein, des données cliniques ont rapporté que l'administration régulière de cette molécule bien que très efficace à court-terme ne permet pas pour autant d'induire une tolérance vis-à-vis du greffon à long terme et entraîne un rejet aigu après plusieurs semaines semble-t-il lié à une incompatibilité du CMH-II (. Ainsi, bien qu'initialement pensé comme potentiellement inducteur de tolérance immunitaire, notamment lors d'études sur des allogreffes de cœur dans des modèles murins, l'effet du Belatacept est uniquement immunosuppresseur. La molécule PD-L1 a été décrite comme un second ligand de CD80. L'interaction entre ces deux molécules a un effet inhibiteur et modifie la signalisation notamment chez les CPA (voir paragraphe E.2). A ce jour, les conséquences du blocage de cette interaction par l'utilisation de CTLA-4-Ig qui possède une affinité supérieure est encore méconnue.

Une dernière molécule dérivée de ces 2 dernières, CTLA4Fce vient d'être décrite comme ciblant spécifiquement l'immunité TH2 dans l'allergie (Perez-Witzke et al., 2016). Cette nouvelle molécule capable de se lier au récepteur IgE prévient la sécrétion d'une forme soluble de CD23 (sCD23) impliquée dans des phénomènes allergiques.

### ***Rôle de CTLA-4 dans la réponse anti AAV***

Notre équipe et d'autres ont démontré que des AAV codant pour CTLA-4/Fc (équivalent de CTLA-4/Ig) étaient capables d'inhiber très efficacement la réponse immunitaire cellulaire et humorale dirigée contre une protéine transgénique modèle : l'ovalbumine

sécrétée (Ova). En inhibant la primo-activation (*priming*) des lymphocytes, CTLA-4 permet la persistance de la protéine transgénique.

Afin de reproduire les réponses immunitaires délétères causés par l'expression d'une protéine transgénique lors d'une thérapie génique par vecteur AAV ; des travaux menés au laboratoire avant mon arrivée ont démontré que l'administration intramusculaire d'un AAV1 ou d'un AAV8 codant pour l'Ova induit des réponses humorale et cellulaire forte (jusqu'à 15% de LT CD8 spécifiques de l'Ova après administration de  $10^{11}$  gv/souris). Ces réponses entraînent la disparition d'ARNm d'Ova dans les muscles transduits en environ 40 jours et la neutralisation de l'Ova sérique par des anticorps dirigés contre, en moins de 10 jours. Pour tenter d'enrayer ces réponses immunitaires indésirables, il avait été testé (entre autres) un AAV codant pour CTLA-4 (murin) fusionné au Fc d'une IgG1 de souris. La co-administration dans les muscles gastrocnémiens de l'AAV-Ova et de l'AAV-CTLA-4/Fc dans un ratio de particules virale équivalent permettait une excellente persistance des ARNm d'Ova et ce, jusqu'à 80 corrélés à une persistance de l'expression de CTLA-4/Fc dans le sérum des animaux et une absence totale de réponse immunitaire. Toutefois, comme attendu, l'administration unique intrapéritonéale de 200 $\mu$ g de CTLA-4/Fc sous forme protéique prévient efficacement la survenue de réponses immunitaires pendant un temps limité (environ 40 jours). Ainsi, bien que très efficace pour prévenir de l'activation des lymphocytes pendant environ 40 jours, l'administration de CTLA-4/Fc n'est pas capable d'induire de la tolérance immunologique vis-à-vis de l'Ova.

## E.2. PD-L1, molécule essentielle dans l'acquisition et le maintien de la tolérance périphérique

### E.2.1. Présentation et rôles de PD-L1

PD-L1 (B7-H1 ou CD274) et PD-L2 (CD273, B7-DC) appartiennent, à la famille des molécules B7 et possèdent à l'instar des autres représentants de cette famille (CD80, CD86 ou ICOS) deux domaines immunoglobuliniques. Ces deux molécules exercent une fonction similaire d'inhibition des réponses immunitaires en inhibant la prolifération des LT et la sécrétion de cytokines pro inhibitrices (IL-2, IL-4, IL-10, et IFN de type I). L'expression de PD-L1 est induite en réponse à l'inflammation d'un milieu, notamment la présence d'interféron de type I et II, l'IL-10 et le TNF- $\alpha$  (Eppihimer et al., 2002). GM-CSF et l'IL-4 sont de forts inducteurs de PD-L2. PD-L1 et PD-L2 sont les ligands de PD-1. PD-L1 est environ 3 fois plus représenté que PD-L2 bien que possédant une affinité au moins 3 fois inférieure pour PD-1.

### E.2.2. Les ligands de PD-L1

#### E.2.2.1. PD-1

A ce jour, PD-1 possède deux ligands connus programmed death-1 (PD-1, CD279) a été identifié par Ishida et collaborateurs en 1992 et CD80 (CD80 est décrit dans le paragraphe suivant) (Ishida et al., 1992).

PD-1 est une molécule exprimée par les cellules immunitaires capable d'induire la mort cellulaire *in vitro* par apoptose est à ce titre nommé « *Programmed Death 1* ». Structurellement, PD-1 appartient à la famille des molécules possédant un domaine immunoglobulinique V-like comme CD28 ou CTLA-4. En revanche, contrairement à ces dernières, PD-1 ne possède pas de domaine d'homodimérisation et se retrouve donc sous forme monomérique à la membrane plasmique des cellules l'exprimant.

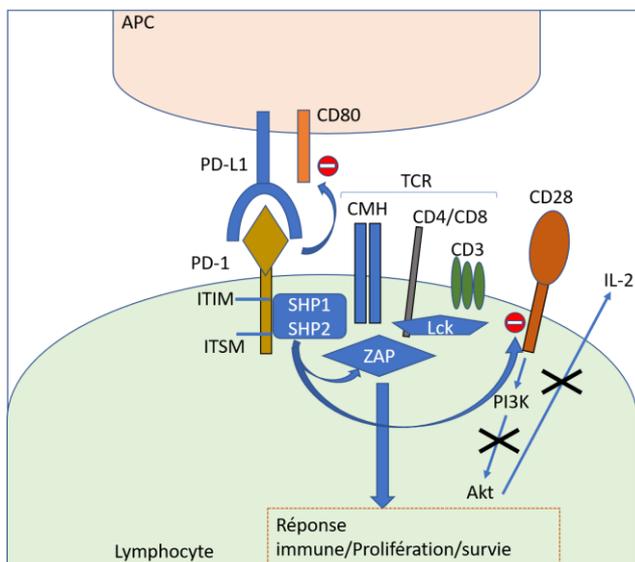
La fonction principale de PD-1 est l'inhibition des réponses immunitaires peu de temps après la phase initiatrice des réponses immunitaires. L'expression de PD-1 est restreinte aux cellules du système immunitaire. PD-1 est inductible à la surface des LT et LB après rencontre antigénique bien que les lymphocytes du système immunitaire inné NK ou NKT et les LT $\gamma\delta$  en expriment constitutivement de forts taux. Les CPA peuvent aussi

exprimer PD-1. Notamment les DC, les macrophages et autres cellules phagocytaires expriment également PD-1 dont les cellules de Kupffer (Keir et al., 2008).

#### *E.2.2.1.1. Mécanisme inhibiteur médié par PD-1*

Récemment, de nouvelles données sur les mécanismes inhibiteurs de PD-1 dans un modèle acellulaire ont permis de mieux comprendre l'importance de PD-1 dans les mécanismes de régulation de la costimulation passant par CD28. L'expression de PD-1 dans la synapse immunologique notamment peu après l'activation permet le recrutement de SHP2 sur les tyrosines de la partie intracellulaire de PD-1. Jusqu'à récemment il était admis que SHP2 désamorçait le signal d'activation transmis par le TCR principalement en déphosphorylant des tyrosines du motif activateur du complexe CD3. Toutefois, une étude récente a élégamment démontré que PD-1, en recrutant SHP2 était la molécule la plus apte à déphosphoryler CD28, en comparaison avec d'autres molécules comme Lck ou CD3, qui nécessitent beaucoup plus de molécules PD-1 pour être déphosphorylés (Hui et al., 2017). PD-1 joue donc un rôle directement antagoniste de la transduction du signal de costimulation.

De façon intéressante, il a été démontré que PD-1 exprimé par les CPA infiltrant des tumeurs pouvait co-exprimer PD-1 et PD-L1. Il semble que PD-1 puisse se lier à PD-L1 *in cis* et que cette interaction puisse renforcer l'activation des lymphocytes en limitant la quantité de PD-L1 disponible à la surface des CPA (Zhao et al., 2018).



**Figure 13. Signalisation passant par l'axe PD-1/PD-L1.** PD-L1 peut se lier à PD1. Cela permet la fixation de la phosphatase SHP2 sur la partie intracellulaire de PD-1 sur ses motifs ITIM. SHP2 va notamment déphosphoryler la partie intracellulaire de CD28 et contribuer à l'inhibition des signaux de survie. PD-L1 peut aussi interagir avec CD80, probablement lorsqu'une cellule co-exprime les deux molécules, ce faisant, PD-L1 inhibe une des molécules majeures impliquées dans la costimulation. Cette figure est une création originale avec powerpoint

#### E.2.2.1.2. PD-1, molécule caractéristique de l'épuisement cellulaire

L'expression de PD-1 peut également perdurer lorsqu'un antigène persiste sans que le système immunitaire puisse l'éliminer (e.g. lors d'une infection virale chronique ou d'une tumeur). Ce mécanisme est appelé exténuation ou épuisement cellulaire (*exhaustion* est le terme anglais). Phénotypiquement, les cellules exténuées entrent dans un état hypo-répondeur caractérisé par des fonctions effectrices diminuées, vis-à-vis de l'antigène persistant dû à des modifications de signalisation. Le phénotype « épuisé » est réversible notamment par l'utilisation d'anticorps bloquant anti-PD-1. Cette notion « d'épuisement cellulaire » est débattue, notamment par la réversibilité du phénomène, il s'agirait plutôt d'une adaptation cellulaire à une stimulation antigénique continue. En fonction du contexte, l'exténuation peut être caractérisée d'état dysfonctionnel des lymphocytes ou d'un mécanisme d'une adaptation permettant, notamment dans le cas d'une infection virale chronique de limiter les dégâts tissulaires engendrés par l'infiltration des cellules immunitaires.

**Commenté [SL19]:** C'est vrai mais c'est un peu ambigu. Notion de fonctionnalités effectrices diminuées.

**Commenté [SL20]:** Difficile si tu n'as encore dit que les LyT épuisés expriment PD.1...

**Commenté [SL21]:** Ah ! ☺

**Commenté [SL22R21]:**

**Commenté [SL23]:** Trop tard

Une autre étude a par ailleurs montré que la présence de CD28 était indispensable pour réverter le phénotype de lymphocytes exténués. Ainsi, l'étude révélait qu'à la suite d'une infection par LCMV, la réactivation des fonctions effectrices des LT exténués (PD-1<sup>+</sup>) était possible par un traitement anti-PD-L1. Ainsi en l'absence de stimulation par PD-L1, PD-1 ne transduit plus de signaux inhibiteurs, les lymphocytes récupèrent leurs fonctions effectrices. Toujours dans cette étude, l'utilisation conjointe d'un anti-B7 (ligand de CD28) et d'un anti-PD-L1 abolissait l'effet provoqué par l'anti-PD-L1 seul. Ainsi, les auteurs concluaient que la signalisation passant par PD-1 pouvait être considérée comme un régulateur de la quantité de CD28. Cette caractéristique fonctionnelle donne à PD-1 une similitude fonctionnelle avec CTLA-4. L'accès de CD28 à ses ligands est contrôlé par l'expression de CTLA-4 (comme évoqué dans la partie E.1).

Les LT CD8 exténués (PD-1<sup>+</sup>) sont retrouvés chez des individus atteints de maladies chroniques (virales ou les cancers). Toutefois, une cellule exténuée n'est pas une cellule apoptotique ou sénescence. Cette caractéristique a permis le développement de stratégies utilisant des anticorps bloquants afin d'invertir ce phénotype. De plus, en dépit d'une plus faible fonctionnalité, les LT CD8 sont toujours capables d'induire des réponses immunitaires, bien que moins efficaces. Ainsi la déplétion de LT CD8 chez des primates infectés par SIV entraîne une forte augmentation de la virémie, ce qui indique que, bien que fonctionnellement diminués, ils contribuent au contrôle de la réplication virale (Schmitz et al., 1999).

Les tumeurs peuvent exprimer de fort de taux de PD-1 et PD-L1 (notamment dû à l'inflammation et la sécrétion d'IFN- $\gamma$ ) mais aussi induire des modifications phénotypiques des cellules immunitaires les infiltrant et les conduisant à cet état « d'épuisement cellulaire ». Le développement d'anticorps bloquant PD-1 (Nivolumab et Pembrolizumab) est désormais utilisé en clinique pour renforcer les fonctions effectrices des cellules immunitaires.

Les lymphocytes possédant un phénotype épuisé sont souvent qualifiés de « dysfonctionnels ». Il est aussi possible que l'expression de PD-1 (mais aussi d'autres marqueurs comme LAG-3 ou TIM-3) sur les cellules immunitaires soit plus liée à une adaptation de l'environnement antigénique permettant de prévenir les dommages

tissulaires liés à la réponse immunitaire, ou induit par l'environnement tumoral entraînant l'échappement tumoral.

#### E.2.2.2. CD80

CD80 a été identifié comme un second ligand de PD-L1. L'interaction de ces deux récepteurs exerce également une fonction inhibitrice en empêchant directement la liaison de CD28 aux molécules de costimulation (Butte, 2007). Ainsi, CTLA-4 et PD-L1 partagent cette même fonction d'inhibition de la costimulation bien que son affinité pour CD80 soit inférieure à celle de CTLA-4. Des données récentes de la littérature concernant l'interaction de PD-L1 avec CD80 obtenu *in vitro* indique que cette interaction n'est possible que lorsqu'une même cellule co-exprime les deux molécules. Cette étude révélait qu'une forme soluble PD-1 était capable de se lier à une cellule exprimant PD-L1 mais pas une forme soluble de CD80. Les auteurs ont également synthétisé une forme plus flexible de PD-L1 qui rendait les domaines fonctionnels de PD-L1 plus mobiles. Dans ces conditions seulement CD80 pouvait interagir avec PD-L1 (Chaudhri et al., 2017, 2018). *In vivo*, la co-expression de PD-L1 et de CD80 est observable chez les lymphocytes (Rollins and Gibbons Johnson, 2017) a notamment été observée chez des monocytes infiltrants la tumeur (Chaudhri et al., 2018).

##### 1- Expression de PD-L1

Chez l'Homme et la souris, PD-L1 est exprimé de façon constitutive à la surface des cellules immunitaires telles que les LB, les DC, les macrophages et cellules phagocytaires (type cellules de Kupffer), et mastocytes. PD-L1 est aussi exprimé sur les cellules thymiques du cortex et de la medulla participant aux mécanismes de la sélection positive et négative des lymphocytes (Nishimura et al., 2000).

PD-L1 est également retrouvé à la surface de nombreuses cellules non-hématopoïétiques telles que les cellules vasculaires endothéliales notamment hépatiques (LSEC), les îlots pancréatiques, les astrocytes et la microglie, les kératinocytes, le muscle squelettique, et le muscle lisse. On retrouve PD-L1 à la surface d'autres organes immunoprivilégiés tels que la chambre antérieure de l'œil, les testicules, les spermatozoïdes et conduits spermatides (Cheng et al., 2009; Wang et al., 2017), les neurones, et très largement sur les cellules utérines et placentaires. L'expression de PD-L1 par les tissus leur confère une protection contre les dommages induits par les cellules

immunitaires et prévient l'infiltration leucocytaire. PD-L1 est également fortement exprimé par certaines tumeurs.

Notamment, la présence d'IFN- $\gamma$  dans un milieu entraîne l'expression de PD-L1 à la surface des cellules du système immunitaire (Yamazaki et al., 2002). Ce mécanisme semble être médié par le facteur de transcription STAT1 et explique pourquoi la surexpression de PD-L1 est un mécanisme adopté par les cellules lors de l'inflammation.

#### 2- *PD-L1 induit des mécanismes de tolérance immunologique*

Le rôle central de PD-L1 dans la tolérance aux tissus a été démontré par divers modèles murins d'inactivation du gène ou de surexpression du récepteur. L'inactivation génétique de *PD-L1* a pour conséquence des symptômes d'auto-immunité qui varie en fonction du fond génétique.

Une première étude a révélé que l'inactivation de PD-L1 dans la souche 129S4/SvJae normalement résistante à l'EAE, devenait susceptible à l'induction de la maladie et présentait un score cliniquement exacerbé (Björkström et al., 2013). Chez les souris de fond génétique MRL-MpJ habituellement utilisées comme un modèle d'étude du lupus, l'inactivation de *Pdcd1* induit une atteinte auto-immune du myocarde et une pneumonie très sévère conduisant à la mort des animaux avant le déclenchement de l'atteinte rénale (Lucas et al., 2008). D'autres expériences démontrent que la surexpression artificielle de PD-L1 a différentes conséquences en fonction de la souche murine utilisée. Par exemple, la surexpression de PD-L1 sur les îlots pancréatiques de souris NOD empêche la survenue d'un diabète (Keir et al., 2006), alors que chez la B6 elle promeut un diabète et le rejet immunologique d'îlots pancréatiques greffés (Subudhi et al., 2004). La surexpression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales de nombreux cancers est associée de manière significative à un mauvais pronostic (Wang et al., 2017). En exprimant PD-L1, les cellules tumorales diminuent l'activation des lymphocytes (exprimant PD-1) et contribuent aux mécanismes d'échappement tumoral. PD-L1 active naturellement la cascade moléculaire de l'axe PI3K/Akt/mTor qui agit directement sur le métabolisme des glucides de la cellule (en induisant une glycolyse) et, par conséquent, entraîne ou maintient les cellules tumorales dans un état prolifératif. Certains auteurs ont rapporté la perte d'expression de PTEN par certaines tumeurs, un répresseur naturel de

PI3K censé contrôler la prolifération cellulaire mais également l'expression de PD-L1 (Song et al., 2013).

Récemment, une équipe a démontré que les cellules tumorales exprimaient une forme glycosylée de PD-L1 (Li et al., 2016). Cette découverte a deux conséquences, d'une part les auteurs ont montré que la glycosylation stabilisait la molécule à la membrane en prévenant l'ubiquitinylation de PD-L1 et d'autre part que cette glycosylation était médiée par la *Glycogen synthase kinase 3-β*. Or, cette voie est inhibée par un grand nombre de facteurs sécrétés dans le microenvironnement tumoral tel que *epidermal growth factor*, *insulin-like growth factor-1*, *hepatocyte growth factor*, *fibroblast growth factor* et le TGF-β.

L'utilisation d'anticorps bloquant l'axe PD-1/PD-L1 a été (avec les anti-CTLA-4) révolutionnaire pour le traitement de divers cancers y compris sous forme de monothérapie. En 2012, une étude rétrospective a ainsi montré que l'utilisation d'anticorps bloquants PD-L1 était capable de renforcer le taux de réponse globale du système immunitaire de 25%.

Lors d'une grossesse, l'organisme d'une mère induit des mécanismes de tolérance actif vis-à-vis l'embryon et du fœtus. On retrouve une forte expression de PD-L1 sur les cellules placentaires, expression d'autant plus importante si la grossesse est allogénique (c'est-à-dire par l'intermédiaire d'une mère-porteuse) *versus* semi-allogénique (grossesse par la mère biologique). De plus l'expression de PD-L1 à la surface de l'utérus et du placenta augmente tout au long de la grossesse. D'autre part, il a été montré chez la souris que l'utilisation d'anti-PD-L1 entraîne la résorption du fœtus ou des nouveau-nés prématurés et de petites tailles. PD-L2 est également exprimé par les cellules placentaires mais son blocage n'induit pas d'avortement précoce (Guleria et al., 2005 ; Petroff 2003).

D'autre part la présence de PD-L1 à la surface des Treg durant la grossesse est cruciale. L'inactivation de PD-L1 chez les Treg spécifiquement induit une rupture de tolérance des antigènes provenant du père. Ce phénomène n'a pas lieu lors d'une grossesse syngénique (reproduction consanguine). Cette expérience souligne l'implication de PD-L1 dans la tolérance à des antigènes exogènes.

De façon intéressante, il a été démontré *in vitro* que la synergie d'action de PD-L1 et du TGF- $\beta$  promouvait la différenciation des LT effecteurs en Treg périphérique en inhibant la cascade de signalisation Akt/mTor *in vitro* (Francisco et al., 2009).

### E.3. PD-L1/Ig et anti-PD-L1, outils d'étude de l'axe PD-1/PD-L1

Par ailleurs, l'utilisation de PD-L1-Ig, qui est une protéine résultant de la fusion entre la partie extracellulaire de PD-L1 et le domaine Fc d'une immunoglobuline a donné des résultats contradictoires. Initialement synthétisé dans l'objectif d'étudier l'axe PD-1/PD-L1, certaines équipes ont rapporté que l'utilisation de PD-L1-Ig avait un rôle inhibiteur des réponses immunitaires notamment en diminuant la prolifération des LT et leur sécrétion d'IL-10 (Butte et al., 2007; Freeman et al., 2000). Dans le même sens, d'autres études démontrent que PD-L1-Ig est également capable d'augmenter l'expression de FoxP3 et les fonctions suppressives des Tregs par l'atténuation de la voie Akt/mTor (Haxhinasto et al., 2008) ainsi que de diminuer l'auto-immunité dans divers modèles murins (Ding et al., 2016; Song et al., 2015; Zhou et al., 2016). Plusieurs études ont également démontré l'intérêt de PD-L1/Ig dans des expériences de greffe en combinaison avec d'autres molécules comme la cyclosporine ou la Rapamycine (Ozkaynak et al., 2002). En revanche, d'autres équipes ont décrit un rôle opposé à l'utilisation de cette molécule (Subudhi et al., 2004). Dans cette étude, les auteurs montrent que PD-L1-Ig induit une prolifération de lymphocytes après un transfert adoptif chez des souris B6. Il est possible qu'en fonction de l'environnement inflammatoire, la molécule n'induit pas les mêmes effets. Récemment, dans un modèle de maladie du greffon contre l'hôte, une équipe a démontré que l'interaction spécifique entre PD-L1-Ig et CD80 (c'est à dire lorsque PD-1 était invalidé) augmentait la prolifération des LT conventionnels (Brennan and Yang). Toutefois, les récentes données étudiant l'interaction CD80/PD-L1 au moyen d'un système *in vitro* utilisant la transfection stable de CD80 sur une lignée cellulaire et l'utilisation de PD-L1-Ig semble indiquer que l'interaction entre CD80 et PD-L1-Ig ne sera pas possible dans ce modèle. Toutefois, cette même étude révèle que lorsqu'une même cellule coexprime CD80 et PD-L1 à sa surface, alors l'inhibition du signal se produit. Ainsi il semblerait que PD-L1 régule la signalisation passant par CD80 uniquement en cis (Chaudhri et al., 2017).

#### E.4. PD-L1 et auto-immunité

Outre les modèles animaux, l'expression anormale de PD-L1 est également impliquée dans divers désordres immunologiques avec des caractéristiques auto-immunes. Notamment, une forme sécrétée de PD-L1 (sPD-L1) a été retrouvée dans le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde contribuant à la dérégulation de l'axe PD-1/PD-L1 (Wan et al., 2006). De nombreuses équipes se sont intéressées aux dérégulations observées sur l'axe PD-1/PD-L1 chez des patients lupiques. Comme chez les patients atteints de diabète de type-1, la fréquence de cellules PD1<sup>+</sup> étaient largement diminuée (Kristjansdottir et al., 2010; Tsutsumi et al., 2006). Des anomalies de l'expression de PD-L1 ont également été détectées dans de nombreuses affections auto-immunes touchant les vaisseaux comme la maladie de Behçet (Sim et al., 2011; Zhang et al., 2017).

## F. Immunomodulation et induction de tolérance immune dans le contexte de thérapie génique par AAV

### F.1 Principaux défis cliniques pour éviter les réponses anti-protéine transgénique

Les descriptions initiales de rAAV en tant que virus non-immunogénique, lui conférait un profil très attrayant pour une application en thérapie génique. Malgré cela, le frein actuel au développement de nouvelles thérapies utilisant les rAAV est l'immunité spécifique de l'hôte dirigée contre le vecteur et la protéine transgénique. C'est pourquoi de nombreux efforts se concentrent actuellement sur le développement de stratégies pouvant palier à ses réponses immunitaires délétères.

En effet, deux études cliniques pionnières menées chez des patients hémophiles par Manno et Nathwani ont rapidement indiqué que les rAAV étaient capables d'induire des réponses immunitaires délétères à la persistance de la protéine transgénique. Ces deux études révèlent que l'injection par voie veineuse de rAAV peut induire une réponse immunitaire cellulaire et humorale dirigée contre des antigènes de la capsid de l'AAV sans que ces réponses ne représentent un danger pour les patients. En dépit des réponses immunes clairement monitorées, Nathwani et collaborateurs ont observé une persistance de la protéine transgénique, ce qui n'était pas le cas de l'étude de Manno (Manno et al., 2006; Nathwani et al., 2011a) . Une différence notable entre ces deux études était l'administration transitoire d'immunosuppresseurs pendant la période de détection des enzymes hépatiques dans l'essai de Nathwani et ses collègues.

Par ailleurs, différents exemples démontrent que l'administration de rAAV sans immunosuppresseur n'induit pas systématiquement la destruction de tous les vecteurs puisque la protéine transgénique est souvent détectable après de longues périodes (Flotte et al, 2011, Nathwani 2014, *Spark Thérapeutique, Uniqure*). Au moins 2 études ont rapporté l'absence de réponse immunitaire (Ferreira et al., 2014; Mueller et al., 2013). Dans l'étude Mueller (déficience en  $\alpha$ -antitrypsine) ou dans celle de Ferreira (déficience en lipoprotéine lipase) les mutations génétiques n'entraînent pas la déficience complète du gène (de type mutation non-sens), il préexistait donc une tolérance vis-à-vis des protéines pour lesquels les patients ont reçu la thérapie par AAV. Les auteurs ont

démonstré, la présence de Tregs infiltrant les muscles transduits, et probablement responsables de la tolérance pour la protéine transgénique

## F.2 Utilisation d'immunosuppresseurs dans les réponses anti-rAAV

Inspiré des traitements utilisés dans la prévention des rejets de greffes, et visant autant que possible à prolonger la survie du greffon, l'utilisation d'immunosuppresseurs généraux a été la première stratégie mise en place dans les études chez l'animal pour contrôler les réponses immunes anti-AAV. En dépit des effets secondaires qui sont de gravité variable, l'utilisation de tels médicaments même de façon transitoire peut avoir des effets intéressants sur la persistance de la protéine transgénique.

Des essais pionniers utilisant la cyclosporine A n'a pas permis d'améliorer la persistance de la protéine transgénique en plus d'induire une toxicité rénale importante (Fields et al., 2001). Mais l'utilisation d'autres immunosuppresseurs généraux, notamment l'utilisation d'agents alkylant comme le cyclophosphamide est capable d'empêcher la survenue d'une immunité humorale dans au moins deux études chez des modèles murins et canins d'hémophilie (Herzog et al., 2001, 2002). Le cyclophosphamide, toxique pour l'ADN en réplication, entraîne une action anti-inflammatoire globale. L'utilisation de Tacrolimus (FK-506) a également permis la persistance de la protéine transgénique mais requiert des injections continues (Fields et al., 2001). Ainsi, l'action non-ciblée de ce type de traitement a rapidement été abandonné pour d'autres traitements plus spécifiques. Notamment, l'application de traitement visant à induire des Treg afin de déclencher des mécanismes de régulations « naturels » et mémoire. Parmi les drogues capables de tels effets, l'utilisation de Rapamycine (Rapamune), un inhibiteur de la voie PI3K/AkT/ *mammalian Target Of Rapamycine* mTOR, notamment impliqué dans la progression du cycle cellulaire présente l'avantage de déléter les LT effecteurs tout en induisant l'expression de FoxP3, ce qui a pour conséquence d'augmenter la population de Treg (Lu et al., 2010) y compris chez l'Homme, notamment dans une étude menée chez des diabétiques (Stallone et al., 2016). La Rapamycine est une protéine immunosuppressive (serine/thréonine kinase), et un inhibiteur de la protéine mTOR qui permet la progression du cycle cellulaire de la G1/S, cette drogue est donc particulièrement nocive pour les cellules en proliférations telles que les lymphocytes lors d'une réponse immune. Par ailleurs, plusieurs équipes ont démontré que la Rapamycine

pouvait amplifier les Tregs dans des modèles murins et vitro et aussi chez l'Homme (notamment chez des patients diabétiques). Toutefois, la dose semble jouer un rôle crucial. De récents rapports chez la souris ont indiqués par ailleurs que les effets de la Rapamycine pouvaient être amplifiés par l'utilisation conjointe d'IL-10 (Nayak et al., 2009) et de Flt3-ligand (Biswas et al., 2015).

Des études menées chez des souris possédant une mutation non-sens pour le FIX, ont montré qu'après transfert IM d'AAV codant pour le FIX, des Tregs pouvaient être induit *in vivo* par l'administration de Rapamycine et d'IL-10 ou de FMS-like tyrosine kinase 3-ligand (FLT3-L). Cette stratégie semblait prévenir la formation d'anticorps spécifique du FIX et induire de la tolérance immunologique vis-à-vis de la protéine. FLT3-L est une molécule qui permet la survie des pDC et leur prolifération en interagissant avec son récepteur FLT3. La voie mTOR est renforcée chez les pDC ce qui les rend moins susceptibles à la Rapamycine. Finalement l'étude chez les souris déficientes en FIX a démontré qu'il était possible d'amplifier les Tregs *in vivo* en favorisant l'amplification de DCtol au moyen de FLT3-L et d'une protéine favorisant les Tregs, la Rapamycine. Toutefois, ce type de traitement n'a pas été testé dans le muscle qui est un organe moins enclin à l'induction de la tolérance.

Les essais pré-cliniques chez le primate non-humain traitant les dystrophies musculaires et la maladie de Pompe ont par ailleurs utilisés une combinaison de corticoïdes (Nathwani et al., 2011a) ou d'anti-CD20 ciblant la réponse humorale combinés à de la Rapamycine ciblant l'immunité cellulaire avec des résultats très encourageants.

A ce jour, la stratégie prévalant aux les essais cliniques en cours est l'administration de drogues immunosuppressives uniquement en cas de détection de réponses immunitaires. Cela est possible grâce à l'amélioration de l'immunogénicité de la capsid et des transgènes. Ainsi l'administration des drogues immunosuppressives n'est pas systématique et les facteurs influençant la survenue d'une réponse immunitaire restent un critère majeur à définir. Le développement de stratégies moins globales, visant directement les réponses anti-rAAV représentent un grand intérêt pour l'amélioration du profil de sureté de la thérapie génique.

### F.3. Immunomodulation

Une étude menée à l'U1234, où j'ai effectué ma thèse a démontré que l'utilisation de protéines immunomodulatrices présentait un intérêt pour la persistance de la protéine transgénique dans un modèle murin transfert de rAAV par voie intramusculaire (Adriouch et al. 2011). Dans cette étude chez la souris B6, une seule injection intrapéritonéale de CTLA4-Fc (Abatacept) (250µg) était capable d'enrailler très efficacement les réponses cellulaires et humorales pendant 40 jours, et lorsque cette injection était combinée à celle d'un rAAV codant pour une forme membranaire de PD-L1, la persistance de la protéine transgénique Ovalbumine se prolongeait pendant au moins 80 jours.

L'étude révèle par ailleurs, que l'injection non-combinée de CTLA-4/Fc ou du rAAV-PD-L1 ne permet qu'une modeste persistance du transgène Ovalbumine et de la protéine transgénique. Comme évoqué précédemment, il est fort probable que cette synergie provienne du co-ciblage de la voie de costimulation du CD28 à la fois par le blocage direct des molécules B7 par CTLA-4/Fc et renforcé par la stimulation de PD-1 par PD-L1/Fc.

De façon similaire, une autre équipe avait démontré que la combinaison de MR1, un anti-CD40 ligand, et de CTLA4-Ig permettait de réprimer efficacement les réponses primaires de l'hôte contre le virus mais cet effet n'était que transitoire (Herzog et al., 1997; Snyder et al., 1997). De plus, des études plus tardives chez l'Homme et l'animal ont révélé que MR1 présentait un risque de thrombose important dû à l'activation des plaquettes sanguines (Sidiropoulos and Boumpas, 2004).

Dans une étude préclinique chez la souris visant à traiter la maladie de Pompe (une pathologie de surcharge lysosomal caractérisée par une déficience en  $\alpha$ -glucosidase (GAA)), l'utilisation d'anti-CD4 non déplétant avant injection d'un AAV2/8-GAA par voie veineuse a permis d'inhiber la formation d'IgG anti-GAA d'une part et d'autre part a permis d'augmenter la transduction des hépatocytes lors de la réinjection d'un AAV2/9-GAA. Toutefois les auteurs décrivent que la tolérance induite par anti-CD4 est seulement transitoire, les souris redevenant immunocompétentes en 24 semaines (Han et al., 2015).

#### F.4. Induction d'une tolérance immunologique sans immunosuppression

L'induction d'une tolérance vis-à-vis du vecteur et des protéines transgéniques reste l'alternative la plus intéressante. Cela permettrait, outre une expression de la protéine durable, l'affranchissant de traitement immunosuppresseurs aux effets secondaires indésirables. A ce jour, différentes stratégies ont déjà été envisagées pour induire une telle tolérance en se passant de l'utilisation de drogues aux effets toxiques. Les données obtenues de la clinique et d'études précliniques semblent clairement indiquer que le transfert de gènes hépatiques est une voie tolérogène aux côtés des injections dans les organes immunoprivilégiés.

Au sein de notre équipe une stratégie de tolérisation orale à laquelle j'ai pu participer, a permis de démontrer la preuve de concept que l'administration d'un antigène modèle très immunogène (l'ovalbumine), dans l'eau de boisson des souris permettait de prévenir très efficacement les réponses immunitaires dirigées contre l'Ova après injection IM de rAAV-Ova (Hardet et al., 2016). L'acquisition d'une tolérance promeut simultanément l'induction de 2 populations de Tregs (i) ceux exprimant FoxP3 (iTreg) induit par conversion des Th2 et les Tregs et (ii) les Th3, LAP<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> nécessitant la présence de TGF- $\beta$  pour induire leur effet suppresseur (Hardet et al., 2016; Wawrzyniak et al., 2017).

Hoffman et ses collaborateurs, ont montré qu'une injection d'AAV-FIX dans le foie de souris hémophiles pouvait être suivi d'une la ré-administration dans le muscle des souris de rAAV de sérotypes différents ou d'adénovirus codant pour le FIX, et l'expression de la protéine transgénique par les myocytes permettait d'augmenter le taux de FIX circulant sans réponses immunitaires dirigées contre ce dernier (Hoffman et al., 2007).

Une autre stratégie déjà envisagée est le transfert de gènes pendant la période prénatale ou périnatale. A cette période, le système immunitaire est encore très immature et de l'injection musculaire d'AAV-huFIX ou d'AAV-luciférase au 15<sup>e</sup> jours de vie de souris embryonnaires (B6) a résulté l'expression pérenne de la protéine (Hu et al., 2011; Schneider and Coutelle, 1999). A ce jour, cela semble toutefois difficilement envisageable chez l'Homme.

## II-OBJECTIFS DE LA THESE

---

Les réponses immunitaires dirigées contre une protéine transgénique engendrées après le transfert musculaire d'AAV peuvent représenter un frein important à l'établissement et au succès de la thérapie génique.

Ainsi, en premier objectif à ce travail, nous avons souhaité étudier et comparer l'impact de la localisation (cytoplasmique, membranaire ou sécrétée) de la protéine transgénique sur l'intensité et la qualité des réponses immunitaires. En effet, une comparaison de l'immunogénicité associée à localisation de la protéine transgénique n'est pas clairement documentée. Nous avons envisagé que ses résultats permettraient de mieux comprendre les facteurs qui gouvernent l'émergence mais aussi l'intensité des réponses immunitaires cellulaires et humorales. Pour cela, des rAAV codant pour une forme cytoplasmique, une forme membranaire et une forme sécrétée de l'Ova ont été générés puis injectés par voie intramusculaire. Nous avons ensuite suivi et comparé les réponses immunitaires cellulaires et la génération d'anticorps dirigées contre la protéine transgénique durant 40 jours. L'existence d'un lien entre la localisation de la protéine transgénique et l'intensité et la qualité des réponses immunitaires permettrait en effet d'établir un nouveau critère à prendre en compte et permettrait possiblement d'adapter les traitements immunosuppresseurs.

Le second objectif, celui-ci majeur et au centre de ce travail doctoral, a eu pour but d'évaluer l'intérêt *in vivo* de protéines immunorégulatrices dérivées de CTLA-4 et de PD-L1 dans l'inhibition des réponses immunitaires. Ces protéines étaient produites directement *in vivo* dans un modèle murin de transfert de gène par vecteur rAAV. Ce modèle consiste à injecter par voie intramusculaire un rAAV codant pour une protéine transgénique modèle sécrétée, l'Ovalbumine (Ova). L'injection d'AAV-Ova induit de fortes réponses immunitaires, aisément mesurables, permettant dans le cadre de ce travail d'évaluer de manière robuste des stratégies visant à inhiber ces réponses voire, à induire un état de tolérance. De telles stratégies bénéficieraient *in fine* aux situations cliniques dans lesquelles les réponses immunitaires constituent encore aujourd'hui un frein au développement et à l'efficacité à long terme de la thérapie génique.

Pour cela, nous avons conçues *in silico* de nouvelles protéines immunorégulatrices, à partir des séquences codantes pour les domaines fonctionnels d'interactions de CTLA-4 et de PD-L1 et, fusionnés ces séquences à la région Fc d'un IgG1 pour améliorer leur demi-vie *in vivo* et leur avidité. Nous avons ensuite généré des rAAV codant pour ces différentes protéines immunorégulatrices de fusion et les avons administrés par voie IM à des souris simultanément au rAAV-Ova. Cette méthode que nous nommons immunorégulation vectorisée (ou VIR pour l'acronyme anglais Vectored ImmunoRegulation) permet d'évaluer les effets systémiques des diverses protéines immunorégulatrices produites *in vivo* sur les réponses immunitaires dirigées contre l'Ova. Afin d'étudier le potentiel immunorégulateur de la manipulation de chacune de ces voies, nous nous sommes attachés aux critères suivants :

- La conception *in silico* de nouvelles protéines au potentiel immunorégulateur pouvant manipuler les voies majeures d'inhibition passant par CTLA-4 et par PD-1 et la synthèse des AAV codants pour ces différentes molécules.
- Le suivi de leur impact sur l'inhibition des réponses cellulaires et humorales dirigées contre l'Ovalbumine au cours du temps.
- Leur impact sur la persistance du transgène Ova dans les muscles transduits et/ou la persistance de l'Ova dans le sérum des animaux.
- Leur possible effet indésirable sur le long terme (absence d'infection ou de tumeur apparentes).
- Leur impact sur la population des Tregs FoxP3<sup>+</sup> et sur l'expression des marqueurs associés à la tolérance et/ou l'immunorégulation.

La réalisation de ce travail a permis d'évaluer l'importance de certaines voies d'immunorégulation, notamment les voies CTLA-4/CD28/B7 et PD-1/PD-L1, considérées individuellement, mais aussi leur possible effet synergique au moyen de protéines bi-fonctionnelles ou en combinant stratégiquement les molécules ciblant ces voies individuellement.

### III-RESULTATS

#### A. Etude de l'immunogénicité d'une protéine transgénique modèle en fonction de sa compartimentation cellulaire après transfert musculaire d'AAV

##### Contexte de l'étude

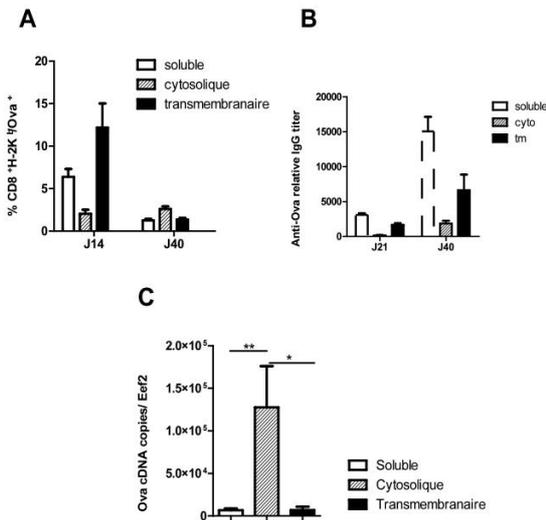
Le spectre des maladies monogéniques recouvre un large ensemble de pathologies pour lesquelles la protéine anormalement produite peut être une protéine cytosolique (comme la dystrophine impliquée dans dystrophie musculaire de Duchenne), une protéine membranaire (comme le CFTR impliqué dans la mucoviscidose) ou sécrétée (comme le facteur IX impliqué dans l'hémophilie). A notre connaissance, aucune étude n'a comparé l'immunogénicité liée à la localisation d'une protéine transgénique pouvant pallier à un défaut génétique. Pour tester cela, nous avons comparé l'impact de la localisation de l'Ovalbumine sur les réponses immunitaires.

##### METHODES

Des vecteurs AAV codant pour la forme sécrétée (AAV2/1-sOva), d'autres pour une forme membranaire (AAV2/1-mOva) comportant la séquence complète de l'Ova fusionné à la partie membranaire de H-2D<sup>b</sup> (Calbo et al., 2008) et une forme cytosolique (AAV2/1-cOva) déplétée des 50 premiers acides aminés contenant le signal de sécrétion ont été générés. Des souris C57BL/6Rj ont ensuite été injectées les AAV codants pour les 3 formes d'Ova dans les muscles gastrocnémiens des souris à la dose  $3,5 \times 10^9$  génomes viraux/souris.

##### RESULTATS

Nous avons observé la présence de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'Ova dans tous les groupes au pic de la réponse immunitaire (jour 14). Il semble que la réponse immunitaire cellulaire soit moins intense dans le groupe injecté avec l'AAV-cOva mais ces résultats restent à vérifier. Concernant le penchant humoral, nous avons collecté le sérum des animaux pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre l'Ova. Nous avons détecté des IgG-anti-Ova tous les groupes. Dans le groupe injecté avec l'AAV-cOva nous avons observé un titre inférieur comparativement aux 2 autres constructions.



**Figure 15. Comparaison des réponses immunitaires dirigées contre l'Ova en fonction de sa localisation cellulaire.** 5 souris C57BL/6/group ont été injectées avec  $3.5 \times 10^9$ gv/souris d'AAV codant pour les différentes formes de l'Ova. **A.** Des échantillons de sang ont été prélevés à différents point de cinétique pour détecter les lymphocytes spécifiques de l'Ova, **B.** ainsi que le sérum des animaux pour détecter la présence d'anticorps anti-Ova. **C.** La persistance du transgène a été analysée par qRT-PCR sur les muscles gastrocnémiens transduits.

De façon intéressante, nous avons dans cette expérience, détecté un nombre significativement élevé de transcrits d'ARNm d'Ova dans le groupe injecté avec l'AAV-cOva. Toutefois ce résultat n'a pas été reproductible et lors d'une seconde expérience aucune différence significative n'a été relevée.

## CONCLUSION

Ces données indiquent que l'Ovalbumine déclenche des réponses immunitaires monitorables cellulaires et humorales quelle que soit sa localisation cellulaire. Dans cette expérience, nous avons observé que la forme cytoplasmique permette une meilleure persistance du transgène bien que ces résultats nécessitent d'être confirmés. Nous suggérons que la mise au clair d'une potentielle immunogénicité d'une des formes pourrait un nouveau critère à prendre en compte dans le développement d'une thérapie génique pour permettre d'anticiper sa réussite.

## B.1. Evaluation de nouvelles molécules bi-fonctionnelles fusionnées à un Fc combinant les domaines fonctionnels de CTLA-4 et de PD-L1 sur l'inhibition des réponses immunitaires dans un contexte de thérapie génique musculaire par rAAV

### Contexte de l'étude

L'AAV-Ova injecté dans les muscles gastrocnémiens de souris déclenche de fortes réponses immunitaires dirigées contre la protéine transgénique. Ce modèle mime les réponses immunitaires dirigées contre un transgène dans le contexte de la thérapie génique par AAV.

Les études préliminaires menées au laboratoire ont démontré que 200µg de CTLA-4/Fc injectés en intrapéritonéal le jour que l'injection intramusculaire de l'AAV-Ova permettait de prévenir remarquablement le déclenchement des réponses immunitaires dirigées contre l'Ova sécrété pendant 40 jours en moyenne (Adriouch et al., 2011). Par la suite, les réponses immunitaires émergent et conduisent à la disparition de l'Ova dans le sérum des animaux ou des muscles transduits. En revanche, l'administration intramusculaire d'un AAV codant pour une forme membranaire de PD-L1 ou de PD-L2 ne permettait pas l'inhibition des réponses immunitaires dirigées contre l'Ova aux temps précoces. Toutefois, l'administration d'un AAV codant pour PD-L1 ou de PD-L2 combiné à une injection de 200µg CTLA-4/Fc le jour de l'administration de l'AAV-Ova améliore significativement la persistance de l'Ova sérique pendant au moins 80 jours.

Ces résultats démontrent que voies de signalisation passant par CTLA-4 ou par PD-L1 peuvent agir en synergie. Ainsi, nous avons décrit des séquences d'acides nucléiques combinant les domaines fonctionnels de ces deux molécules selon différentes modalités.

#### Présentation de la stratégie d'ImmunoRégulation Vectorisée

Afin de contrôler ses réponses immunitaires délétères, et avec pour objectif d'induire de la tolérance immunologique vis-à-vis de l'Ova, de nouvelles protéines dérivées de CTLA-4/Fc et PD-L1/Fc ont été testées. Pour évaluer le potentiel immunorégulateur de ces nouvelles protéines nous avons utilisé une stratégie d'immunorégulation vectorisée (VIR). Cette stratégie consiste à construire des AAV capables d'exprimer tout un panel nouvelles molécules immunorégulatrices. Injectés

dans les muscles de souris sauvages C57Bl/6, ces AAV transduisent les fibres musculaires, ce qui permet la synthèse des protéines d'intérêt, qui seront sécrétées.

### METHODES

Les séquences génétiques issues de ce travail sont décrites dans la figure 14. Nous les avons soumis à un logiciel d'optimisation de codon (GeneArt, Life Technologies). Ces séquences ont été synthétisées, puis clonées au sein d'un plasmide contenant les séquences ITR, le promoteur et la séquence de polyadénylation (GeneArt, Life Technologies). Dans un second temps, les plasmides contenant les séquences d'intérêts ont été transmis à Virovek qui a fabriqué les 3 lots d'AAV codant pour les protéines bifonctionnelles (AAV-VIR). Pour permettre l'expression de deux protéines distinctes au sein d'un seul transgène, nous avons utilisé la séquence de clivage dérivée du *foot-to-mouse disease* virus, nommé facteur de clivage 2A, plutôt qu'un IRES, qui outre la longue séquence en acides nucléiques, entraîne une asymétrie défavorable de production des protéines en aval de la séquence. Ces séquences ont par ailleurs été utilisées pour produire des anticorps *in vivo* (Balazs et al., 2011).

Chaque lot d'AAV-VIR a été co-injecté avec l'AAV-Ova et nous avons comparé leur potentiel immunorégulateur à celui des molécules parentales, CTLA-4/Fc et PD-L1/Fc

#### Critères d'évaluation :

- Expression des protéines bi-fonctionnelles : détection des protéines dans le sérum des animaux, détection des ARNm dans les muscles transduits.
- Capacité des molécules à inhiber l'activation de la réponse immunitaire cellulaire et humorale durant le temps de l'expérience.
- Induction d'une population cellulaire régulatrice.
- Persistance du transgène Ova et de la protéine dans le sérum.

### RESULTATS

Nous avons réparti les groupes de souris C57BL/6 en 2 cohortes, l'une permettant de contrôler le potentiel régulateur des molécules parentales et l'autre permettant d'évaluer celui des nouvelles constructions. Aucune des nouvelles constructions n'ont permis de d'inhiber les réponses immunitaires Figure 14. En effet, nous avons observés une réponse cellulaire et humorale dirigées contre l'Ova. A l'exception du construit 3 pour

lequel nous avons détecté la présence des protéines sériques CTLA-4 et PD-L1, les autres molécules ont été difficilement détectable (données non montrées).

Afin de vérifier que ces molécules étaient capables d'être sécrétées, nous avons effectué des transfections transitoires des plasmides codant pour ces molécules dans des cellules HEK293. Le surnageant de cultures des cellules transfectées a été récolté à l'épuisement de la culture et concentré. Nous avons ensuite détecté par western-blot la présence de CTLA-4 et de PD-L1. A l'exception du construit 2 pour lequel CTLA-4 était indetectable, la présence de CTLA-4 et de PD-L1 a été détectée dans les autres construits. Ainsi, pour le construits 2, pour lequel la séquence de CTLA-4 est en aval de la séquence de clivage, la production de cette partie n'a pas semblé aboutir et, explique au moins pour ce construit les résultats.

Par ailleurs, nous avons détecté lors de plusieurs expériences impliquant l'injection de l'AAV-CTLA-4/Fc que seul ou en combinaison avec l'AAV-Ova un impact négatif sur les Tregs (Figure 14.C) En effet, CTLA-4/Fc non seulement diminue la fréquence des Tregs périphériques et centraux mais aussi leur nombre. Par ailleurs, cet effet est dose dépendant dans les expériences que nous avons menés.

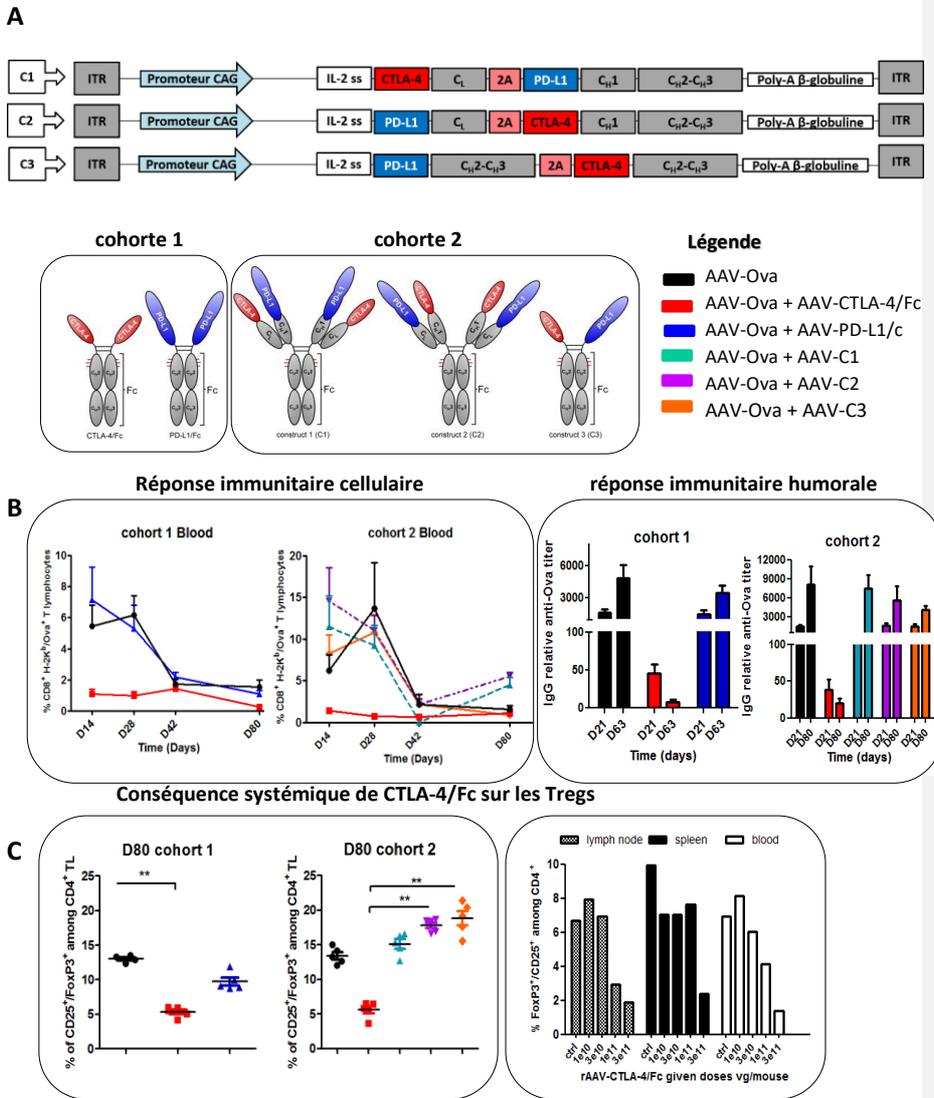


Figure 15. Effet des protéines bi fonctionnelles sur la réponse immunitaire

**A.** Représentation schématique des molécules testées durant les premières étapes du projet doctoral (Abréviations, ITR inverted terminal repeats, IL-2 ss (peptide signal de l'IL-2)). (Panel haut) représentation des séquences génétiques des AAV-VIR. (Panel bas) Représentation schématique des molécules parentales CTLA-4/Fc et PD-L1/Fc (à gauche, cohorte 1) et des molécules bifonctionnelles (à droite, cohorte 2).

**B.** Suivi des réponses immunitaires cytotoxiques (panel gauche) et humorales (à droite) induites après injection  $3 \times 10^{10}$  gv/souris ( $n=5$ ) d'AAV-Ova co-administrés avec les AAV-VIR. Les groupes injectés avec l'AAV-Ova seul ou en combinaison avec les AAV codant pour les molécules parentales (cohorte 1) servent de contrôle.

## Résultats

C. CTLA-4/Fc induit un impact négatif sur les lymphocytes Tregs FoxP3<sup>+</sup>. Sur le panel de gauche, la représentation des fréquences des lymphocytes correspondante à l'expérience de la figure (B) le jour de fin du protocole (jour 80). A droite, une autre expérience où des doses croissantes indiquées sur la figure d'AAV-CTLA-4/Fc ont été injectées. Les souris contrôles (ctrl) ont reçu une injection de PBS dans les muscles gastrocnémiens.

### CONCLUSION

L'expression à long terme de CTLA-4/Fc inhibe très efficacement les réponses immunitaires cellulaires et humorales durant toute la durée des expériences.

Aucune des constructions n'a entraîné un effet immunomodulateur attesté par l'émergence des réponses immunitaires dirigées contre la protéine transgénique Ova.

Par ailleurs, nous avons démontré que CTLA-4/Fc déplètent les Tregs FoxP3<sup>+</sup> dans les compartiments lymphoïdes étudiés. Ainsi, CTLA-4/Fc ne peut pas s'inscrire dans un protocole incluant des injections répétées de cette molécule.

## B.2. Evaluation de nouvelles molécules dérivées de PD-L1/Fc sur l'inhibition des réponses immunitaires dans un contexte de thérapie génique musculaire par rAAV.

### Contexte de l'étude

La thérapie génique représente à ce jour l'unique option thérapeutique pour un large spectre de maladies monogéniques. Bien qu'ayant déjà démontré son innocuité, le transfert de gène par AAV peut déclencher des réponses immunitaires notamment vis-à-vis de la protéine transgénique, s'opposant au succès d'une telle thérapie. A la suite de la première série d'expérience, nous avons conçu de nouvelles dérivées de PD-L1/Fc. En effet, les molécules bifonctionnelles s'étant avérées inefficaces dans l'inhibition des réponses immunitaires d'une part, et, d'autre part CTLA-4/Fc présentant un impact négatif sur les Tregs, l'amélioration de la molécules PD-L1/Fc, il semblait intéressant de renforcer cette voie d'inhibition par l'amélioration de cette protéine.

### METHODES

Après conception *in silico*, nous avons utilisé la stratégie VIR (décrite précédemment) pour évaluer le potentiel immunorégulateur de 4 nouvelles constructions dérivées de PD-L1/Fc. Ainsi, après construction des AAV-VIR, nous les avons injectés dans les muscles gastrocnémiens de souris C57BL/6 et nous avons suivis leur effet sur la réponse immunitaire dirigée contre la protéine transgénique Ova durant 80 jours.

### RESULTATS

- L'administration de l'AAV-CTLA-4/Fc inhibe durablement les réponses cellulaires et humorales dirigées contre l'Ova.
- La présence systémique à long-terme de CTLA-4/Fc induit une déplétion des Tregs dans tous les compartiments lymphoïdes étudiés.
- PD-L1/Fc est modérément efficace pour l'inhibition des réponses immunitaires.
- CTLA-4/Fc et PD-L1/Fc ont un effet synergique sur l'inhibition de la réponse humorale.
- Parmi les nouveaux construits testés par stratégie VIR, deux d'entre eux améliorent significativement la persistance du transgène à long terme et présente à ce titre un intérêt en thérapie génique.

**In vivo screening of novel fusion proteins targeting the major immunoregulatory pathways to inhibit immune responses and to promote long-term transgene expression in the context of AAV muscle gene therapy**

L. Dupaty<sup>1</sup>, M. Demeules<sup>1</sup>, G. Riou<sup>1</sup>, Romain Haret<sup>1</sup>, Benjamin Chevalier<sup>1</sup>, L. Jean<sup>1</sup>, R. Zoubairi<sup>1</sup>, A. Salvetti<sup>2#</sup>,  
O. Boyer<sup>1</sup> and S. Adriouch<sup>1</sup>

**Article en préparation**

<sup>1</sup> Normandie Université, UNIROUEN, INSERM, U1234, Physiopathologie et biothérapies des maladies inflammatoires et auto-immunes (PANTHER), 76000 Rouen, France

<sup>2</sup>International Center for Research in Infectiology (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, Lyon, F-69007, France

# Current Address: Cancer Research Center of Lyon (CRCL), INSERM U1052, CNRS UMR5206, Lyon, F-69006, France

**Corresponding authors:**

Sahil Adriouch

UFR Santé, Inserm U1234

22 Boulevard Gambetta

76183 Rouen Cedex 1, France

Phone: +33-235148543

e-mail: [sahil.adriouch@univ-rouen.fr](mailto:sahil.adriouch@univ-rouen.fr)

## ABSTRACT

In vivo gene transfer mediated by adeno-associated viral (AAV) vectors has become a feasible therapeutic strategy in human. However, immune responses against the capsid and/or against the transgenic protein (TgP) remain one of the main concerns as this method widened to a spectrum of pathologies and individuals. The inhibition or the control of these unwanted immune responses thus remains a major challenge. Here, we implemented a stringent animal model to directly evaluate in vivo fusion-proteins targeting the major immunoregulatory axes with the aim to evaluate their potential to improve TgP persistence and to induce long-term tolerance. For that we monitored their capacity (i) to inhibit cellular and antibody immune responses, (ii) to improve TgP persistence in transduced muscle and, (iii) to preserve Tregs and the expression of phenotypic markers associated with regulatory cells. We first focused in this proof-of-principle study on the immunoregulatory potential of CTLA-4/Fc and PD-L1/Fc. While, expectedly, CTLA-4/Fc potently inhibit immune responses its continuous use affects Tregs precluding the induction of long-term tolerance. PD-L1/Fc was expectedly less potent to inhibit immune responses but better preserved Tregs. We next screened the in vivo potential of 4 fusion proteins derived from PD-L1/Fc and showed the higher capacity of 2 novel candidates to inhibit immune responses and to preserve transgene expression as compared to PD-L1/Fc. Hence, we described here a screening method to evaluate directly in vivo fusion-proteins targeting the natural immunoregulatory axis for their potential to preserve transgene expression in the context of AAV mediated gene therapy and described 2 novel candidates derived from PD-L1/Fc with a remarkable capacity to inhibit antibody formation and to preserve TgP expression.

## Introduction

Nearly 20 years after their first injection in human subject, clinical trial using AAV have been increased by almost 4-fold during the last decade (from n= 48 in 2007 to n= 183 in 2017) bringing AAV to the fourth position of the most widely used vectors in gene therapy. Their safety profile, their *in vivo* efficiency and, their relatively low immunogenicity, has widened the use of AAV vector for delivering therapeutic genes to a variety of tissues

As they poorly activate innate immunity and weakly transduce dendritic cells, AAV appeared far less immunogenic than adenoviral vectors (McCaffrey et al., 2008; Zaiss et al., 2002). Nevertheless, it has rapidly become clear that the injection of AAV vectors can, under different circumstances, induce potent immune responses that could ultimately lead to destruction of transduced cells *in vivo* and consecutive disappearance of transgene expression (Brockstedt et al., 1999; Halbert et al., 1998; Manning et al., 1997). Indeed, capsid proteins and/or the transgenic protein (TgP) coded by the vector may trigger cellular as well as antibody immune responses (Calcedo and Wilson, 2013; Martino et al., 2011b). Disappearance of the TgP and of transduced cells in animal models and in clinical trials were often correlated with the emergence of anti-capsid and/or anti-TgP immune responses and have led to the use of immunosuppressive drugs as the only solution to increase long-term TgP persistence despite their long-term side effects (Ferreira et al., 2014; Nathwani et al., 2011a, 2014). In our present study, we implemented an animal model to screen directly *in vivo* for alternative approaches to promote long-term TgP persistence by manipulating the major natural immunoregulatory pathways that govern lymphocytes activation, function and/or tolerization.

We used here an animal model of AAV-mediated gene transfer to elicit robust cellular and antibody immune responses against the TgP. For that, we injected intramuscularly an AAV1 vector coding for the highly immunogenic Ovalbumin (Ova) model antigen into

immunocompetent C57BL/6 mice (Adriouch et al., 2011; Wang et al., 2005). We previously showed that intramuscular administration of AAV1-Ova vector elicited transient secretion of Ova rapidly followed by antibody formation, anti-TgP CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells expansion, their infiltration into the transduced muscles, the destruction of transduced muscles fibers and, ultimately, the disappearance of TgP expression (Adriouch et al., 2011). We propose that the use of this artificial, yet highly immunogenic, Ova antigen represent here a stringent model where protocols designed to inhibit immune responses and to restore long-term TgP expression can be faithfully evaluated *in vivo*. Using this model, we then aimed to screen *in vivo* the therapeutic potential of immunoregulatory molecules designed to target the major mechanisms that physiologically controls lymphocyte activation, function and/or tolerization. For that, we directly used AAV vectors coding for the immunomodulatory molecule candidates as a rapid *in vivo* screening method that we co-injected together with AAV-Ova vector. To establish here the feasibility and the advantages of this screening method, we first evaluated in this proof-of-principle study the potential of immunoregulatory molecules targeting the two major immunoregulatory axis, namely CD28/B7 and PD-1/PD-L1 axis. For that, we designed AAV vector coding respectively for the well-known CTLA-4/Fc immunosuppressive molecule and for PD-L1/Fc. We extended our study by designing and evaluating *in vivo* novel fusion molecule candidates derived from PD-L1/Fc and showed their enhanced capacity, as compared to PD-L1/Fc, to inhibit immune responses and to promote long term transgene expression.

## RESULTS

### CTLA-4/Fc and PD-L1/Fc improve transgene persistence

To study the modulation of immune responses towards a highly immunogenic TgP model (i.e., Ova), we used our Vectored ImmunRegulation (VIR) approach to monitor the short- and long-term effect of CTLA-4/Fc and PD-L1/Fc on cellular and antibody responses and on long term Tg expression. For that, we injected in gastrocnemius muscle of C57BL/6 mice  $3 \times 10^{10}$  vg/mouse of AAV-Ova either alone (control mice) or in combination with  $3 \times 10^{10}$  vg/mouse of AAV-CTLA-4/Fc or  $3 \times 10^{10}$  vg/mouse of AAV-PD-L1/Fc. We observed that endogenous expression of CTLA-4/Fc remarkably inhibited cellular and antibody immune responses against Ova throughout the experiment. Indeed, AAV-CTLA-4/Fc mice displayed little if any anti-Ova CD8<sup>+</sup> as monitored by H-2K<sup>b</sup>/Ova<sub>257-264</sub> staining and flow cytometry while control animals showed a robust response (Figure 1.A-B). Ova-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> immune responses were also undetectable at day 80 post-AAV-Ova injection as assayed by sensitive ELISpot assays (Figure 1.C). Similarly, CTLA-4/Fc completely prevented the formation of anti-Ova IgG antibodies (Figure 1.D.). Expectedly, inhibition of cellular and antibody responses in this group correlated with persistence of the TgP in the serum and expression of the transgene in the transduced muscles at day 80 (Figure 1.E). We thus concluded that CTLA-4/Fc is very efficient to prevent anti-TgP immune responses and improve its long-term persistence in vivo even in condition where the TgP correspond to a highly immunogenic secreted antigen.

In contrast, AAV-PD-L1/Fc evaluated in a parallel group did not prevent early cellular anti-Ova CD8<sup>+</sup> immune response as monitored by H-2K<sup>b</sup>/Ova<sub>257-264</sub> staining and flow cytometry and only slightly prevented the development of anti-Ova IgG antibody (Figure 1.A, B, D). Despite the absence of conspicuous effect on the early cellular and antibody responses,

expression of PD-L1/Fc remarkably allowed a modest but significant improvement of Ova transgene persistence and expression in serum and muscles as evaluated by ELISA and qRT-PCR, respectively (Figure 1.E). This correlated with a reduced number of functional IFN- $\gamma$  secreting anti-Ova CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in animals injected with AAV-PD-L1/Fc as assayed by ELISpot at day 80 (Figure 1.C). This data indicates that PD-L1/Fc is unable to control the emergence of the early adaptive immune response but still ameliorate TgP persistence possibly thought inhibition of effector functions and/or by favoring tolerization mechanisms at late time points.

#### Long-term treatment with CTLA-4/Fc negatively affects FoxP3<sup>+</sup> Tregs

Despite the major role of FoxP3<sup>+</sup> Tregs on the induction and maintenance of immune tolerance, long-term effect *in vivo* of CTLA-4/Fc or PD-L1/Fc on FoxP3<sup>+</sup> Tregs have poorly been studied so far. Therefore, we took advantage of our VIR approach to study the impact of CTLA-4/Fc and PD-L1/Fc on the percentage and number of Foxp3<sup>+</sup> Tregs populations over time in different lymphoid organs and in blood. Mice injected with AAV-CTLA-4/Fc presented at the end of the experiment at day 80 a drop of about two third of the percentage of CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> in blood, lymph nodes and spleen (Figure 2.A and 2.B). Long-term treatment with PD-L1/Fc also decreased Tregs frequency in lymphoid organs although at a lesser extent. To better evaluate the systemic effects of CTLA-4/Fc and PD-L1/Fc we injected mice with increasing doses of AAV-CTLA-4/Fc (i.e., in the absence of AAV-Ova) ranging from 10<sup>9</sup> to 10<sup>11</sup> vg/mouse compared to a single high vector dosage of AAV-PD-L1/Fc corresponding to 10<sup>11</sup> vg/mouse. Again, CTLA-4/Fc negatively affected in a dose dependent manner the frequency of FoxP3<sup>+</sup> Tregs in blood, spleen and lymph nodes (LN) and thymus (Figure 3.A). In addition, we observed that CTLA-4/Fc but not PD-L1/Fc induce a decrease of the expression of phenotypic markers not only associated with lymphocytes activation as CD44 and CD25 but also with immunoregulation and/or anergy such as CTLA-4, PD-1, TIM-3, and TIGIT (Figure 3.B). We

Commenté [SA24]: Est-ce la bonne figure, je ne vois pas les données

Commenté [SA25]: Quelle différences avec la manip décrite ci-dessus ?

## Résultats

concluded that long term treatment with CTLA-4/Fc interfere with thymic Treg differentiation, affect frequency and number of Treg in the periphery and, is associated with the downregulation of makers associated with immunoregulatory phenotypes.

### **Low dose CTLA4/Fc associated with high dose PD-L1/Fc ameliorate TgP persistence and better preserve FoxP3<sup>+</sup> Tregs**

Next, we assessed the immunoregulatory synergic potential of low doses CTLA-4/Fc combined with high doses PD-L1/Fc. We hypothesized that low doses CTLA-4/Fc may efficiently inhibit immune responses priming without much impact on FoxP3<sup>+</sup> Tregs while a high dose PD-L1 may inhibit activated T cells function and favors tolerization mechanisms. For that, we injected in one quadriceps a dose of 10<sup>10</sup> vg/mouse AAV1-CTLA-4/Fc, which we demonstrated to have no major impact on the number of FoxP3<sup>+</sup> Tregs, together with a 10-fold higher dose of AAV1-PD-L1/Fc injected in the contralateral quadriceps. We additionally injected 10<sup>10</sup> vg/mouse AAV1-Ova vectors in the gastrocnemius muscle at the same time and followed anti-Ova immune responses over time. As control, one group was injected with AAV1-CTLA-4/Fc only and the results confirmed, as expected, that this treatment alone at the chosen dose was not able to fully inhibit the priming of anti-Ova CD8<sup>+</sup> immune response or anti-Ova IgG formation (Figure 4.). In mice that received AAV1 vectors coding for both immunoregulatory molecules, we did not observe higher inhibition of the anti-Ova CD8<sup>+</sup> T cells priming as compared with mice injected with AAV1-CTLA-4/Fc alone (Figure 4.A). However, combination therapy remarkably inhibited the formation of anti-Ova IgG (Figure. 4.B). Also, combination therapy improved transgene persistence and expression in the transduced muscles over the monotherapies. Finally, we evaluated the impact of the combination therapy on FoxP3<sup>+</sup> Tregs frequency in peripheral lymphoid organs. FoxP3<sup>+</sup> Tregs frequencies remained unchanged in the blood, spleen and lymph nodes in these animals (Figure. 4.E). These data, thus confirmed that low doses CTLA-4/Fc could be use with high doses PD-

**Commenté [SA26]:** Pas fait ? ou pas montré ?

**Commenté [SA27]:** Résultats étranges concernant le thymus, les données montrent effondrement dans le groupe PD-L1 ??? ce n'est pas cohérent avec les manips précédentes, si c'est le cas il faudra retirer le thymus ici et se concentrer sur les compartiment périphériques

**Commenté [SA28R27]:** C'est la combinaison des 2 qui induit la diminution, je viens de voir que il y a une erreur dans le code couleur d'où l'ambiguïté...Mais il est vrai que ce résultat est fort bizarre et je n'ai pas beaucoup d'arguments pour l'expliquer (cf discussion)]'hésite à l'enlever...

**Commenté [SA29R27]:** Oui, retirer le thymus, cela ne semble pas cohérent avec les données en périphérie

L1 to improve transgene persistence without affecting FoxP3<sup>+</sup> Tregs that are known to have a major role in the induction and the maintenance of immune tolerance.

### **Novel molecules derived from PD-L1/Fc allowed long-term persistence of Ova Tg**

Next, we took advantage of our *in vivo* screening method to evaluate novel molecules derived from the parental PD-L1/Fc with the aim to improve its efficacy either to inhibit immune responses and/or to improve Tg persistence. Structural and molecular data have previously demonstrated that the N-terminal IgV-like domain is the major domain responsible for the binding to CD80 and PD-1 ligands (Butte et al., 2007). Notably, PD-L1/PD-1 interaction domain mapping revealed that IgV-like domain of PD-L1 is necessary and sufficient to bind PD-1 (Wang et al., 2003; Butte et al., 2007). Hence, we designed here novel molecules harboring from 1 and up to 4 IgV-like binding domains of PD-L1 fused to the IgG's Fc region (Figure. 5A). These molecules were termed here PD-L1n1, PD-L1n2, PD-L1n3 and PD-L1n4 according to the number of binding domain present in each of these constructs (Figure .5A).

We next evaluated the efficacy of each of these novel molecules using our VIR *in vivo* screening method. For that, AAV1 vector coding for each of these novel constructs were produced and injected into quadriceps while AAV1-Ova was injected into gastrocnemius muscles. Mice injected with AAV1-CTLA-4/Fc or AAV1-PD-L1/Fc were used as control groups. We then followed the development of the cellular immune responses against Ova as well as IgG antibody formation. Regarding anti-Ova CD8<sup>+</sup> T cell activation and expansion, endogenous production of PD-L1n1 or PD-L1n2 inhibited 50% of response at the peak of their expansion as compared to the control group induced to express the classical PD-L1/Fc (Fig .5). More importantly and rather unexpectedly, PD-L1n1 or PD-L1n2, but not PD-L1n3 our PD-L1n4, completely prevented the development of anti-Ova IgG antibody with a potency that is undistinguishable from the effect of CTLA-4/Fc. Despite, their inability to completely prevent

the early cellular CD8<sup>+</sup> immune response, PD-L1n1 and PD-L1n2 remarkably improved Ova-transgene persistence and its expression in transduced muscle measured here 94 days post AAV1-Ova administration (Figure. 5D). Again, the protective effect of PD-L1n1 and PD-L1n2 on transgene persistence is similar to the effect observed in the control group induced to continuously express CTLA-4/Fc *in vivo*. In agreement, with the absence of anti-Ova antibody in these groups, Ova protein remarkably persisted in the serum of mice treated with CTLA-4/Fc, with PD-L1n1 or PD-L1n2 (Figure. 5E). Finally, we assessed the impact of PD-L1n1 and PD-L1n2 on FoxP3<sup>+</sup> Tregs located in central or peripheral lymphoid organs. We found that PD-L1n1 or PD-L1n2 did have a slight effect on the total number of Tregs found in spleen, comparable to the effect of PD-L1/Fc molecule, but, on the contrary to CTLA-4/Fc, did not affected the number of FoxP3<sup>+</sup> Tregs in the thymus

### **Combination therapy using a single early dose of CTLA4/Fc associated with long term treatment with PD-L1n2 improves TgP persistence and preserves FoxP3+ Tregs**

Our results so far show that CTLA-4/Fc behave as a potent molecule to suppress the priming of the adaptive immune responses. However, its long-term use *in vivo* is associated with the dramatic decrease of central and peripheral Tregs that may impede the induction of tolerance. On the other side, our novel PD-L1/Fc derivatives potently inhibit antibody formation and better preserve Tregs, but were not capable to completely inhibit CD8<sup>+</sup> T cells priming during the initiation phase of the immune response. We therefore evaluated whether a combination therapy based on a short term CTLA-4/Fc treatment followed by a longer-term PD-L1n2 treatment could better preserve transgene expression as compare to either treatment used alone. To evaluate this situation, we injected the animals with AAV1-Ova i.m to induce a robust immune response against Ova, treated them as before with AAV1-PD-L1/Fc, and, in addition, treated them with the concomitant i.p. administration of a single dose of 200 µg/mouse of CTLA-4/Fc recombinant protein. As expected, a single early dose of CTLA-4/Fc recombinant

protein potently inhibited the early anti-Ova CD8<sup>+</sup> cellular immune response as well as antibody formation in all treated groups (Figure. 6B). However, and as expected, monotherapy with a single dose of recombinant CTLA-4/Fc is not sufficient alone to induce long-term tolerance or to prevent the reemergence of immune responses at latter time points as attested by the detection of anti-Ova IgG antibody after 40 days (Figure. 6D). In contrast, combination of a single dose of recombinant CTLA-4/Fc with long-term treatment with PD-L1n2 prevented the late reemergence of antibody formation and, accordingly, improved long-term Ova transgene persistence and expression in transduced muscles (Figure. 6C-D). We next evaluated the impact of this combined therapy of the FoxP3<sup>+</sup> Tregs compartment. For that, the percentages of Tregs present in blood, spleen, lymph node and thymus were evaluated at the end of the study 80 days post AAV1-Ova injection. The results confirmed that neither the short-term recombinant CTLA-4/Fc nor the combination of this treatment with long-term treatment with PD-L1/Fc or PD-L1n2 affected Tregs in the thymuses or in peripheral lymphoid compartments. Taken together these results suggest that a combination therapy using a single dose of recombinant CTLA-4/Fc is enough to prevent the early priming of the immune responses and that the reemergence of the immune responses could be prevented by the continuous treatment with PD-L1n2 without affecting the Tregs compartment which is possibly a factor that may favor long-term tolerance towards the transgenic protein

## DISCUSSION

The main objective of gene therapy for monogenic diseases is to correct a diseased physiological function with the long-term expression of a therapeutic transgene. Efforts have been made to select safe vectors such as AAV which present many advantages for gene therapy. However, their administration may cause deleterious immune responses against both the vector and the transgenic protein incompatible with gene therapy success. Immunoregulatory molecules termed as immune checkpoints may help to prevent this deleterious immune response, and maybe could tolerize the host against a therapeutic transgene. We have presented here the manipulation of both CTLA-4/CD28/CD80/CD86 and PD-L1/PD1 major immunoregulatory pathways as a rational approach to respectively target priming of immune response and lymphocytes effector functions at later time points aiming to induce long-term persistence of the highly immunogenic protein Ova. To evaluate the effect of immunoregulatory protein on that purpose, we have presented here a novel method allowing to (i) assess the efficacy of molecules to inhibit deleterious immune response in the context of gene therapy alone or in combination, enabling (ii) to assess the long-term systemic effect of secreted fusion proteins with immunoregulatory potential.

VIR strategy allowed evaluating the long-term systemic effect of CD28/B7 blockade mediated by CTLA-4/Fc. Our data showed that blocking of CD80/CD86 major costimulatory molecules with CTLA-4/Fc by VIR strategy was highly efficient to inhibit both cytotoxic and humoral immune responses throughout the experiment. Indeed, previous studies have showed that CTLA-4/Fc is capable to block efficiently costimulation (Adriouch et al., 2011) and to inhibit germinal center formation (Kim et al., 2014). However, we reported along with and other groups working on mice or non-human primates, (Chun et al., 2017; Williams et al., 2014), that CTLA-4/Fc was only immunosuppressive and severely impacted Foxp3 Tregs, a

## Discussion et Conclusion

cell population essential to maintain peripheral tolerance. Indeed, we found that AAV-CTLA-4/Fc affects Tregs population in all lymphoid organs and comprising the thymus. This was not surprising because it was previously shown that CD28 plays a crucial role in Tregs development in the thymus and periphery (Guo et al., 2008; Tai et al., 2005). Our data also revealed that conventional CD4 and Tregs immunophenotype were affected in a dose-dependent manner leading to a decreased frequency in inhibitory molecules expression including CTLA-4, PD-1, TIM-3 and TIGIT or activation markers such as CD25 or CD44. Also, previous studies demonstrated that selective blockade of CD80/CD86 (with CTLA-4/Fc) profoundly impact Tregs by preventing survival signals mediated by IL-2 (Charbonnier et al., 2012; Green et al., 1994). Engagement of CD28 with its ligand's triggers IL-2 production indispensable for Tregs proliferation and survival. This data precludes of a long-term usage CTLA-4/Fc.

To our surprise, targeting PD-1 pathway with PD-L1/Fc was not sufficient to inhibit Ova-specific immune responses in our different settings, although PD-1 is upregulated at immune response peak (Adriouch et al., 2011). On the development of anti-Ova antibodies, PD-L1/Fc only had a significant but moderate effect, and accordingly the molecule prevented at least partially the destruction of transduced muscle fibers attested by a significant number of Ova copies found in transduced muscle. Besides this, PD-L1/Fc did not induce Foxp3 Tregs and even led to Tregs decrease. We hypothesize that the cytokinic environment is of a major importance for Tregs induction, such as the presence of TGF- $\beta$  (Francisco, 2009). Also, it was recently demonstrated by Hui and colleagues that PD-L1/PD-1 signaling led to CD28 dephosphorylation which in turn reduces the amount of available CD28 at the cell surface. Therefore, it is likely that AAV-mediated long-term expression of PD-L1/Fc account for CD28 downregulation, leading to Tregs decrease.

Administration of AAV-PD-L1/Fc without AAV-Ova did not impact Tregs. We hypothesized that this result could be attributed to the fact that PD-1 is expressed at low level

## Discussion et Conclusion

in physiological condition and therefore had proportionally less impact on systemic effects as compared with CTLA-4/Fc.

However, when we combined in administration of both AAV-CTLA-4/Fc and AAV-PD-L1/Fc we observed that humoral response against Ova was completely abolished. We concluded that CTLA-4/Fc and PD-L1/Fc could act synergistically to prevent humoral immune responses onset against Ova. Also, co-administration of both regulatory AAV prevented at least partially the destruction of AAV-Ova transduced muscle fibers attested by the increased of number of Ova transcripts. In line with our previous results, the synergistic effect of co administration of AAV-CTLA-4/Fc and PD-L1/Fc could be explained the redundant role of CTLA-4 and PD-1 the inhibition of costimulation mediated by C28:CD80/CD86. While CTLA-4 blocks CD28 binding to costimulation molecules, binding of PD-L1 to PD-1 downregulates CD28 expression on lymphocyte cell surface.

We believe that VIR strategy could be beneficial to assess protein efficacy to control immune response. Our results demonstrated that two novels molecules among 4 derived from PD-L1/Fc, n1 and n2, presented interesting immunoregulatory properties in dampening immune response to Ova. Our results suggest that these molecules possess potent inhibitory potential on both cellular and humoral immune response. We speculate that these new molecules possess an increased potential to bind to CD80. Indeed, in a recent work, the authors modified PD-L1 so that the molecule was more flexible. This improved flexibility allowed PD-L1 to bind to CD80 whereas unmodified PD-L1 could only bind to PD-1 (Chaudhri et al., 2018). Evaluation at D80 also allowed showed that n1 and n2 affected Tregs in a non-significant extent as compared with CTLA-4/Fc. On a translational perspective, we have showed that combining a single injection of CTLA-4/Fc and AAV-n2 improve transgene survival.

## Discussion et Conclusion

In summary, we have shown that AAV may serve as useful biotool to study the immunoregulatory potential of proteins in the context of gene therapy allowing to easily comparing the long-term systemic effect of molecules.

## MATERIAL & METHODS

**In vivo experiments.** Female C57BL/6Rj (B6) mice were obtained from Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, France). Mice were housed in pathogen-free mice facility and were between 7 to 9 weeks of age at experiments' beginnings. Mice legs were shaved and anesthetized before AAV injection. AAV were diluted under sterile condition in PBS and injected in gastrocnemius muscle for AAV-Ova or in quadriceps of AAV-VIR. In experiment figure XCTLA-4/Fc (BioXcell, Euromedex), injected on left quadriceps while AAV-PD-L1/Fc on the right one to prevent heterodimeric formation combining both CTLA-4/Fc and PD-L1/Fc in one molecule.

**AAV and cDNA design.** All AAV2/1 batches were purchased at Virovek (Hayward, CA, USA). The plasmidic construct used for the generation of AAV2/1 coding for a secreted Ova was kindly provided by Roland W. Herzog. For AAV2/1-CTLA-4/Fc cDNA was built using full extracellular IgV-like domain of mouse CTLA-4 and fused to the Fc domain of mouse Ig1. In all constructs, the same Fc region was used and bears the 'LSF' mutation in the hinge region improving renal reabsorption (Ghetie et al., 1997) AAV-PD-L1/Fc cDNA was built using both extracellular IgV-like domains of mouse PD-L1 and Fc-fused. Constructs n1, n2, n3 and n4 were named according to the number of interaction domain of PD-L1 were harboring. These constructs were also Fc-fused.

**Antibodies and flow cytometry.** To follow cellular immune responses against Ova blood samples were stained with CD45-PerCP Cy5.5, CD44-FITC, CD8-APC, CD4-APC Cy7 (all purchased from SONY). PE conjugated-H-2K<sup>b</sup>/Ova<sub>257-264</sub> dextramers were used to detect Ova<sub>257-264</sub> specific CD8<sup>+</sup> T cells according to manufacturer protocol (Immudex, Copenhagen, Denmark). Immediately after staining, cells suspensions were fixed and lysed using 1-step Fix/Lyse solution (ThermoFischer Scientific) according manufacturer protocol.

Immunophenotyping was made as such, blood, spleen, LN, thymus cell suspensions were first stained with Tim-3-PeCy7, CTLA-4-BV605, CD8-FITC, CD44-A700, FoxP3-A647, CD25-

## Discussion et Conclusion

PE (purchased from SONY); CD4-BV786, TIGIT-BV421, LAG-3-BV711 purchased from BD biosciences), PD-1-APC-Fire750 (purchased from Biolengend). Intracellular staining was made using FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience).

All cells suspensions were analyzed by flow cytometry using FACS Canto I or LSR Fortessa (BD Biosciences) and post-analysis was done with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

### **Enzyme-linked immunoabsorbent assays and Enzyme-Linked Immunospot assays**

Quantification of soluble Ova concentration in mice serum and titration of anti-Ova IgG was performed and analyzed by Enzyme-linked immunoabsorbent assays as previously described (Adriouch et al., 2011; Hardet et al., 2016). ELISpot assays were used to quantify the number of Ova CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T secreting IFN- $\gamma$  cells from mice spleen. In brief, 96 wells PVDF plate (Merck, Millipore) was coated the day before experiment with anti-IFN- $\gamma$  (clone AN-18, ThermoFischer) and kept at 4°C. The day of the experiment  $2.5 \times 10^5$  to  $5 \times 10^5$  splenocytes were cultured in RPMI with 10  $\mu$ g/mL of Ova<sub>257-264</sub> or Ova<sub>323-339</sub> for detection of respectively, MHC-I and MHC-II restricted cellular immune responses. Cultures were stopped after 12h incubation. Biotinylated anti-IFN- $\gamma$  was used as detection antibody. Then, we used avidin-HRP (ThermoFischer). The spots were revealed with Ready-to-use TMB substrate for ELISpot (Mabtech AB, Nacka Strand, Sweden) according to manufacturer instructions.

Quantification of Ova transcripts in transduced muscles. Ova mRNA was extracted from transduced muscle and quantified by real-time quantitative polymerase chain reaction using SYBR green Mastermix (Roche, Meyland, France) as described previously (Adriouch et al., 2011). Analysis was performed as described previously (Hardet et al., 2016).

**Statistical analysis.** All data were represented as mean value and standard errors mean (SEM). One-way ANOVA was used to perform multiple comparison analysis. Unless otherwise specified, experiments have been conducted at least 3 times independently and graphs shown are

## Discussion et Conclusion

representative of overall experiments. Differences were considered as significant when P values were less than 0.05 (\*), 0.01(\*\*) or 0.001(\*\*\*). Graphs and statistical analysis were performed with Prism software (GraphPad, La Jolla, CA).

We kindly thank R. W. Herzog for providing AAV-OVA plasmidic construct. This work was supported by a grant obtained from Association Française contre les Myopathies. We thank French Ministry of higher education and AFM for the PhD fellowship of L.D. We thank flow cytometry platform of INSERM U1234 for providing help and technical expertise.

## FIGURES LEGEND

**Figure 1. AAV-CTLA-4/Fc and AAV-PD-L1/Fc modulate immune response to Ova Tg.**  $3 \times 10^{10}$  vg/mouse of AAV-Ova was mixed with AAV-CTLA4/Fc or AAV-PD-L1/Fc according to groups and were injected in mice gastrocnemius muscles. Mice (n=5/group) were killed at day 80. **A** Graphic presentation of the dextramere stained CD8<sup>+</sup> cells immune response at day 14. **B**. Kinetic of Ova-specific CD8 T cells from blood collection at indicated days. **C** Average number of spots forming unit (SFU) of splenocytes obtained at day 80, restimulated with OT-I or OT-II peptides. **D** Kinetic of anti-Ova total IgG titers determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **E**. Concentration of Ova from mice serum collected at day 80 (left). RT-PCR quantification of Ovalbumine cDNA transgene persistence of transduced muscles (right). ctrl or CT, AAV-OVA; CTLA-4/Fc, AAV-CTLA-4/Fc, PD-L1/Fc, AAV-PD-L1/Fc;

**Figure 2. AAV-CTLA-4/Fc and AAV-PD-L1/Fc impact FoxP3 Tregs frequency** **A**. Graphical representation of flow cytometry data of FoxP3<sup>+</sup> Tregs gated on CD4<sup>+</sup> cells in blood spleen and thymus at day 80. **B**. Percentage of Tregs was determined by flow cytometry at day 80. Ctrl, AAV-Ova; CTLA-4/Fc, AAV-CTLA-4/Fc, PD-L1/Fc, AAV-PD-L1/Fc; LN, inguinal lymph node.

**Figure 3. Increasing dose of AAV-CTLA-4/Fc leads to FoxP3 Tregs decreased frequencies and downregulation of immunoregulatory molecules.** Mice (n=3/groups) were injected with increasing dose of AAV-CTLA-4/Fc at day 0, cells from different lymphoid compartments were harvest to study Tregs frequency and phenotype. **A**. Percentage of FoxP3 Tregs obtained by flow cytometry from different organs. **B**. Percentage of expression of major immunoregulatory markers of splenic Tregs. Experiment was repeated 3 times giving similar results. Ctrl, PBS; CTLA-4/Fc, AAV-CTLA-4/Fc, PD-L1/Fc, AAV-PD-L1/Fc; LN, inguinal lymph node.

**Figure 4. Co-administration of low dose AAV-CTLA4/Fc and high dose AAV-PDL1/Fc ameliorate Ova Tg persistence.** At day 0,  $3 \times 10^{10}$  vg/mouse (n=5/group) of AAV-Ova were administrated to mice gastrocnemius in all mice (except for one group which received PBS only). To evaluate the synergistic effect of both regulatory molecule's mice were administrated with both  $3 \times 10^{10}$  vg/mice of AAV-CTLA-/Fc and  $1 \times 10^{11}$  vg/mouse of AAV-PD-L1/Fc, (CTLA-4/Fc+PD-L1/Fc) in quadriceps. As control one group received (CTLA-4/Fc) in quadriceps and another group received  $1 \times 10^{11}$  vg/mouse of AAV-PD-L1/Fc (PD-L1/Fc). Mice were killed at day

80. **A.** kinetic of Ova specific CD8 response by Ova dextramere staining using cytometry. **B.** Kinetic of anti-Ova antibody detection with ELISA. **C.** Evaluation of Ova transgene persistence by qRT-PCR quantification and normalized against the level of Eef2. **D.** Average frequency of Tregs was determined by flow cytometry obtained from blood and spleens collection at day 80. Ctrl, AAV-Ova; CTLA-4/Fc, AAV-CTLA-4/Fc; PD-L1/Fc, AAV-PD-L1/Fc. Plots represent the average and SEM.

**Figure 5. Immunological assessment of new molecules derived from PD-L1Fc.** All mice (n=5/group) received  $3 \times 10^{10}$  vg/mouse of AAV-Ova. According to groups mice received  $10^{11}$ vg/mouse of AAV coding for n1, n2, n3 or n4. Groups receiving  $10^{11}$ vg/mouse of AAV coding for CTLA-4/Fc or PD-L1/fc served as control. **A.** Schematic representation of CTLA-4/Fc, PD-L1/Fc and PD-L1/Fc derived molecules coded by AAV-VIR and used in this experiment and genetic constructs. **B.** Kinetic of cellular CD8 specific response to Ova. **C.** Kinetic of anti-Ova antibody response. **C.** qRT-PCR quantification of Ova transgene in transduced muscles. **D.** Concentration of Ova measured by ELISA at day 94. **E.** Concentration of Ova measured by sandwich ELISA in mice serum and day 94. Plots represent the average and SEM.

**Figure 6. Impact of PD-L1/Fc derived molecules on Tregs FoxP3 obtained at day 80.** Absolute number and frequency of FoxP3<sup>+</sup> Tregs obtained from flow cytometry analysis from CD4<sup>+</sup> gated cells and plots represent the average and SEM.

**Figure 7. CTLA-4/Fc +AAV-n2 ameliorate transgene survival without affecting Tregs.** Mice (n=5/group) received  $3 \times 10^{10}$  vg/mouse of AAV-Ova at day 0. Except control (ctrl) group, all mice received 200µg of CTLA-4/Fc intraperitoneally at day 0. According to group mice also received  $10^{11}$ vg/mouse of AAV-PD-L1/Fc or AAV-n2 at day 0. **A.** Schematic description of the protocol. **B.** Kinetic of CD8 Ova-specific immune response. **B.** Kinetic of anti-Ova IgG titer. **C.** qRT-PCR of Ova/Eef2 transgene in transduced muscle. **D.** Frequencies of Tregs in studied lymphoid organs. Plots represent the average and SEM.

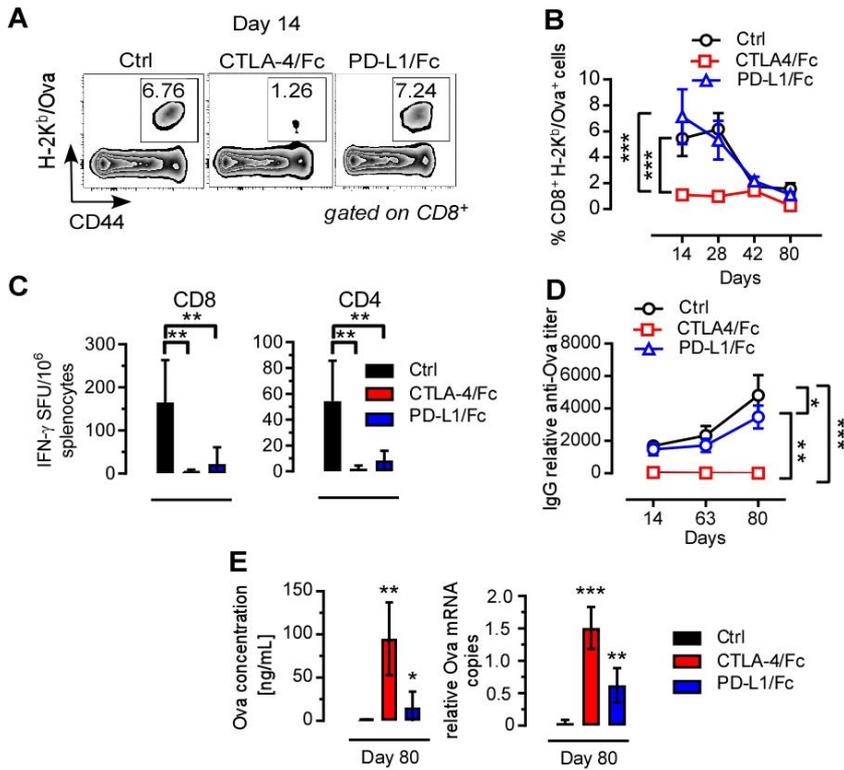
**Figure suppl 1. Co-administration of low dose AAV-CTLA4/Fc and high dose AAV-PDL1/Fc ameliorate Ova Tg persistence.** At day 0,  $3 \times 10^{10}$  vg/mouse of AAV-Ova were administrated to mice gastrocnemius in all mice (except for one group which received PBS only). To evaluate the synergistic effect of both regulatory molecule's mice were administrated with both  $3 \times 10^{10}$  vg/mice of AAV-CTLA-4/Fc and  $1 \times 10^{11}$ vg/mouse of AAV-PD-L1/Fc, (CTLA-4/Fc+PD-L1/Fc) in quadriceps. As control one group received (CTLA-4/Fc) in quadriceps and

## Discussion et Conclusion

another group received  $1 \times 10^{11}$  vg/mouse of AAV-PD-L1/Fc (PD-L1/Fc). Mice were killed at day 80. **A.** kinetic of Ova specific CD8 response by Ova dextramer staining using cytometry. **B.** Kinetic of anti-Ova antibody detection with ELISA. **C.** Evaluation of Ova transgene persistance by qRT-PCR quantification and normalized against the level of Eef2. **D.** Average frequency of Tregs was determined by flow cytometry obtained from blood, spleens and thymus collection at day 80. Ctrl, AAV-Ova; CTLA-4/Fc, AAV-CTLA-4/Fc; PD-L1/Fc, AAV-PD-L1/Fc. Plots represent the average and SEM.

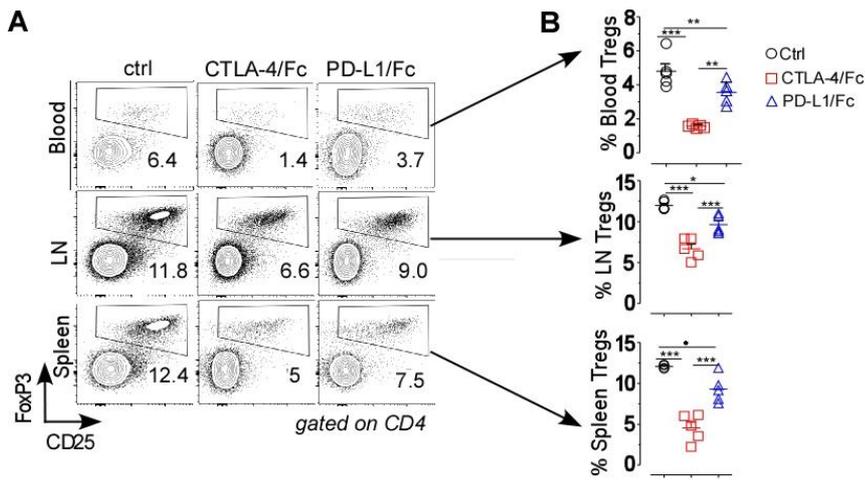
Figures

Figure 1.



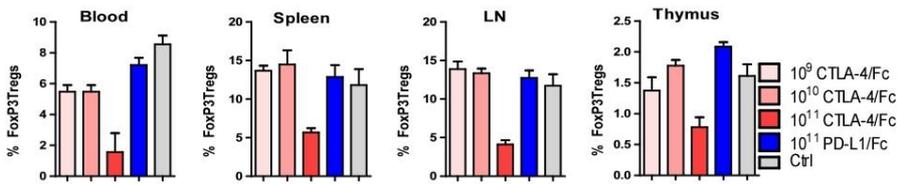
**Figure 1. AAV-CTLA-4/Fc and AAV-PD-L1/Fc modulate immune response to Ova** Tg. 3e10 vg/mouse of AAV-Ova was mixed with AAV-CTLA4/Fc or AAV-PD-L1/Fc according to groups and were injected in mice gastrocnemius muscles. Mice (n=5/group) were killed at day 80. **A** Graphic presentation of the dextramere stained CD8<sup>+</sup> cells immune response at day 14. **B** Kinetic of Ova-specific CD8 T cells from blood collection at indicated days. **C** Average number of spots forming unit (SFU) of splenocytes obtained at day 80, restimulated with OT-I or OT-II peptides. **D** Kinetic of anti-Ova total IgG titers determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **E** Concentration of Ova from mice serum collected at day 80 (left). RT-PCR quantification of Ovalbumine cDNA transgene persistence of transduced muscles (right). ctrl or CT, AAV-OVA; CTLA-4/Fc, AAV-CTLA-4/Fc, PD-L1/Fc, AAV-PD-L1/Fc;

Figure 2.

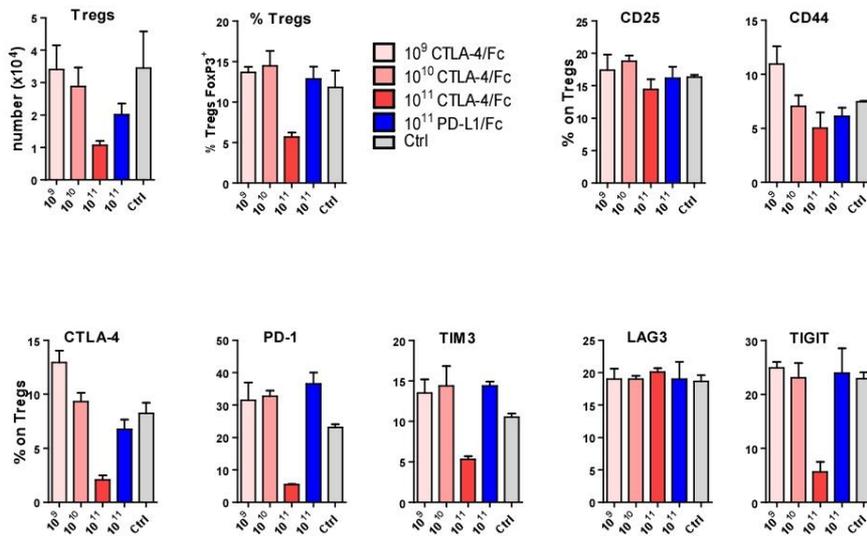


**Figure 2. AAV-CTLA-4/Fc and AAV-PD-L1/Fc impact FoxP3 Tregs frequency** **A.** Graphical representation of flow cytometry data of FoxP3<sup>+</sup> Tregs gated on CD4<sup>+</sup> cells in blood spleen and thymus at day 80. **B.** Percentage of Tregs was determined by flow cytometry at day 80. Ctrl, AAV-Ova; CTLA-4/Fc, AAV-CTLA-4/Fc, PD-L1/Fc, AAV-PD-L1/Fc; LN, inguinal lymph node.

**Figure3.**  
**A**

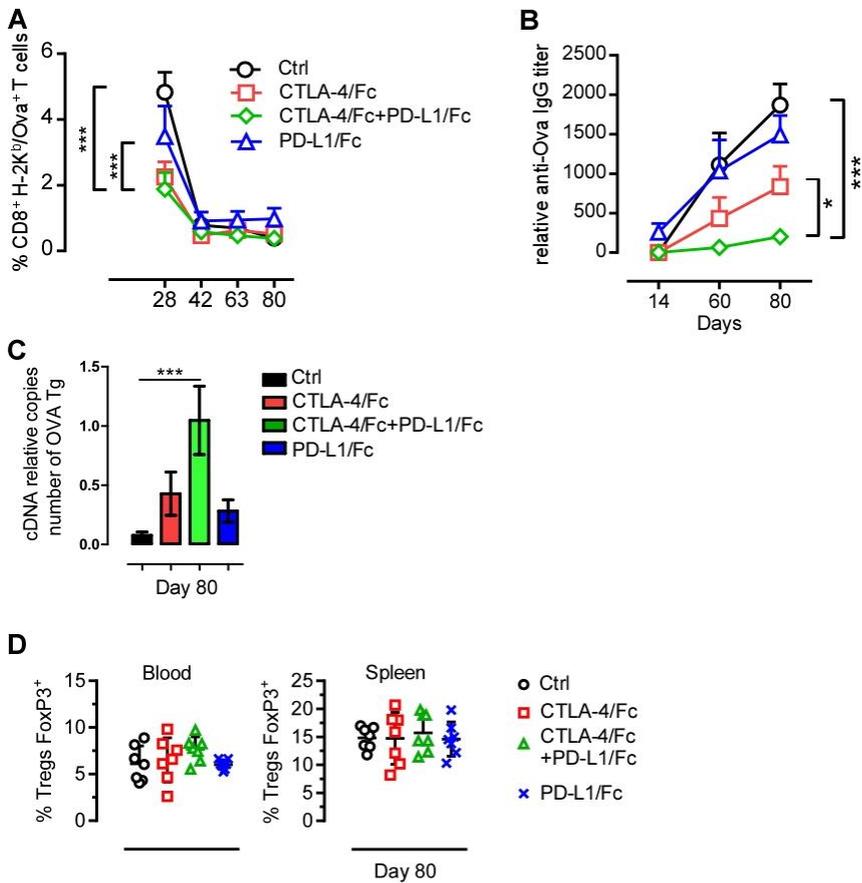


**B**



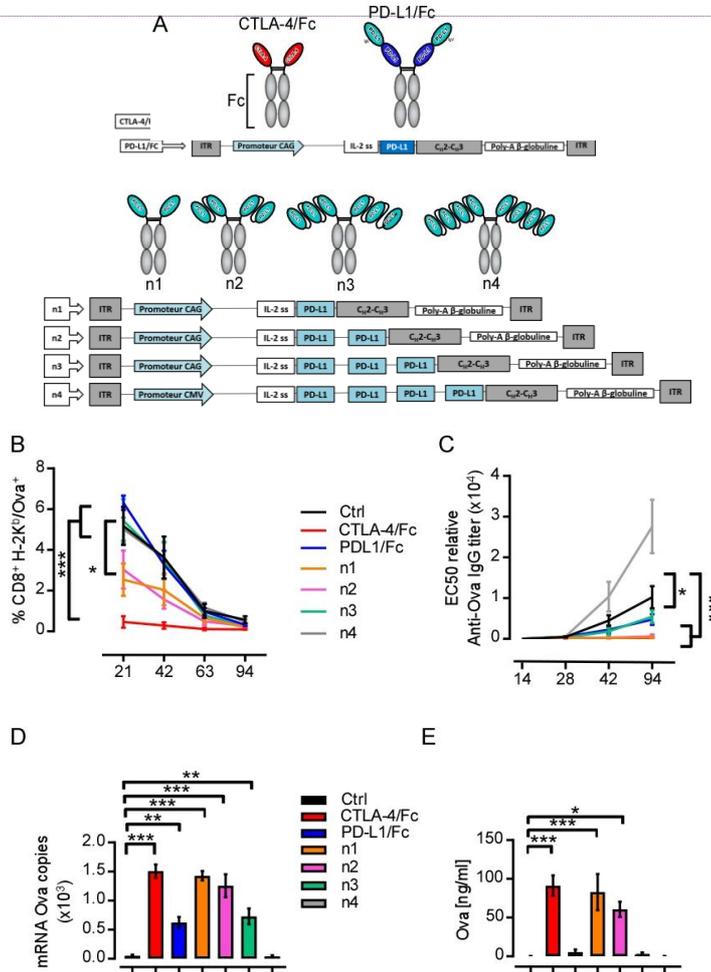
**Figure 3. Increasing dose of AAV-CTLA-4/Fc leads to FoxP3 Tregs decreased frequencies and downregulation of immunoregulatory molecules.** Mice (n=3/groups) were injected with increasing dose of AAV-CTLA-4/Fc at day 0, cells from different lymphoid compartments were harvest to study Tregs frequency and phenotype. **A.** Percentage of FoxP3 Tregs obtained by flow cytometry from different organs. **B.** Percentage of expression of major immunoregulatory markers of splenic Tregs. Experiment was repeated 3 times giving similar results. Ctrl, PBS; CTLA-4/Fc, AAV-CTLA-4/Fc, PD-L1/Fc, AAV-PD-L1/Fc; LN, inguinal lymph node.

**Figure 4.**



**Figure 4. Co-administration of low dose AAV-CTLA4/Fc and high dose AAV-PDL1/Fc ameliorate Ova Tg persistence.** At day 0, 3e10 vg/mouse (n=5/group) of AAV-Ova were administrated to mice gastrocnemius in all mice (except for one group which received PBS only). To evaluate the synergistic effect of both regulatory molecule's mice were administrated with both 3e10 vg/mice of AAV-CTLA-/Fc and 1e11vg/mouse of AAV-PD-L1/Fc, (CTLA-4/FC+PD-L1/Fc) in quadriceps. As control one group received (CTLA-4/Fc) in quadriceps and another group received 1e11vg/mouse of AAV-PD-L1/Fc (PD-L1/Fc).

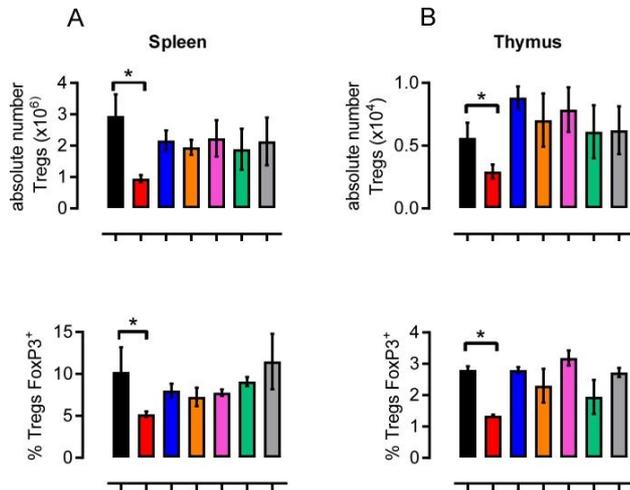
Figure 5.



Commenté [ID30]: Pas de stats car 3 souris/groupe. Sinon la manipe a été faite 2X

**Figure 5. Immunological assessment of new molecules derived from PD-L1Fc.** All mice (n=5/group) received  $3 \times 10^{10}$  vg/mouse of AAV-Ova. According to groups mice received  $10^{11}$ vg/mouse of AAV coding for n1, n2, n3 or n4. Groups receiving  $10^{11}$ vg/mouse of AAV coding for CTLA-4/Fc or PD-L1/fc served as control. **A.** Schematic representation of CTLA-4/Fc, PD-L1/Fc and PD-L1/Fc derived molecules coded by AAV-VIR and used in this experiment and genetic constructs. **B.** Kinetic of cellular CD8 specific response to Ova. **C.** Kinetic of anti-Ova antibody response. **C.** qRT-PCR quantification of Ova transgene in transduced muscles. **D.** Concentration of Ova measured by ELISA at day 94. **E.** Concentration of Ova measured by sandwich ELISA in mice serum and day 94. Plots represent the average and SEM.

**Figure 6.**



**Figure 6. Impact of PD-L1/Fc derived molecules on Tregs FoxP3 obtained at day 80.** Absolute number and frequency of FoxP3<sup>+</sup> Tregs obtained from flow cytometry analysis from CD4<sup>+</sup> gated cells and plots represent the average and SEM.

Figure 7.

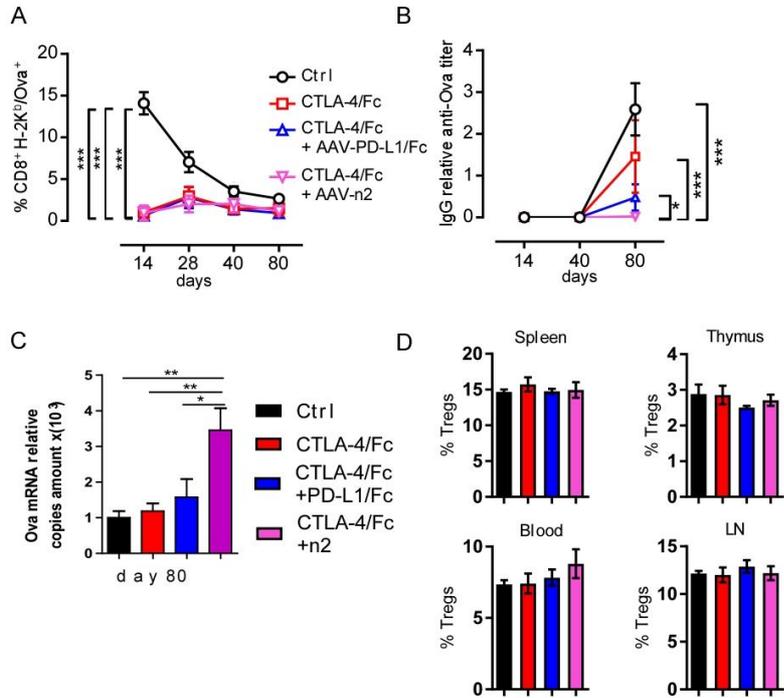
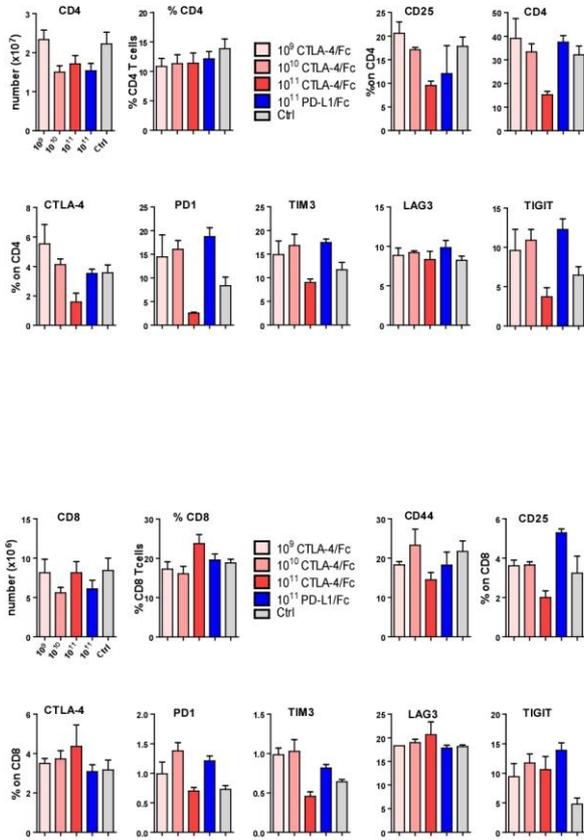


Figure 7.

**CTLA-4/Fc + AAV-n2 ameliorate transgene survival without affecting Tregs.** Mice (n=5/group) received  $3 \times 10^{10}$  vg/mouse of AAV-Ova at day 0. Except control (ctrl) group, all mice received 200 $\mu$ g of CTLA-4/Fc intraperitoneally at day 0. According to group mice also received  $10^{11}$ vg/mouse of AAV-PD-L1/Fc or AAV-n2 at day 0. **A.** Schematic description of the protocol. **B.** Kinetic of CD8 Ova-specific immune response. **B.** Kinetic of anti-Ova IgG titer. **C.** qRT-PCR of Ova transgene in transduced muscle. **D.** Frequencies of Tregs in studied lymphoid organs. Plots represent the average and SEM.

## Discussion et Conclusion



**Figure suppl 1. Increasing dose of AAV-CTLA-4/Fc leads to decreased frequencies and downregulation of immunoregulatory molecules on CD4 and CD8.** Mice (n=3/groups) were injected with increasing dose of AAV-CTLA-4/Fc at day 0, cells from different lymphoid compartments were harvested to study CD4 (upper panel) and CD8 (lowerpanel) frequency and phenotype. Ctrl, PBS; CTLA-4/Fc, AAV-CTLA-4/Fc, PD-L1/Fc, AAV-PD-L1/Fc.

## IV- DISCUSSION

### A-La thérapie génique par AAV : les principaux défis actuels

L'intérêt grandissant qu'a suscité l'AAV au cours des dernières décennies, est en grande partie lié à son potentiel d'utilisation comme un vecteur de transfert de gène efficace et sûr. De par son absence de pathogénicité, il n'avait suscité qu'un intérêt modéré au moment de sa découverte. Pourtant, c'est ce qui a orienté son choix dans le cadre de thérapie génique traitant les maladies monogéniques. Près de 60 ans après sa découverte, sa caractérisation n'est toujours pas achevée et des questions non seulement sur son cycle viral mais aussi sur son interaction avec les cellules de son hôte persistent.

L'AAV recombinant est vecteur faiblement immunogène comparé aux autres vecteurs utilisés en thérapie génique. Pourtant, son immunogénicité est frein au développement de nouvelles thérapies notamment pour des organes peu enclins à l'établissement de tolérance, comme le muscle squelettique. Ce sont les données de la clinique qui ont grandement contribué à révéler l'immunogénicité délétère des rAAV dans le contexte de la thérapie génique. Les réponses immunitaires engendrées par ce type de matériel sont complexes car elles sont non seulement induites par un matériel composé de protéines virales et d'acides nucléiques, mais aussi potentiellement induites par la protéine transgénique qui peut être immunogénique. Cette immunogénicité multifactorielle a été extensivement étudiée et caractérisée ces dernières années et de nombreuses équipes ont développé des stratégies pour l'éviter ou l'atténuer.

Les améliorations de la capsid pour réadresser les particules virales, les modifications du transgène, pour qu'il exprime que fort taux d'une protéine ou l'ajout d'un promoteur tissu spécifique et un tri drastique des patients sont autant de méthodes développées dans l'objectifs de contrôler ses réponses délétères. Si initialement le concept de thérapie génique était « simple », nous savons aujourd'hui qu'une somme de critères est à prendre en compte lors du design de ce type de thérapie.

C'est dans ce contexte que la stratégie d'immunorégulation vectorisée (VIR) a été implémentée. Un grand nombre de molécules immunorégulatrices (*immune checkpoint*) ont été identifiées à ce jour. Ces molécules naturellement exprimées par notre système immunitaire contrôlent le déclenchement et la résolution des réponses immunitaires. Afin d'étudier l'effet de diverses protéines au potentiel immunorégulateurs, nous avons

construits des AAV capables d'exprimer différentes molécules à tester. Une fois transduites, les fibres musculaires expriment directement, *in vivo* les molécules d'intérêt.

### B-Travaux sur les protéines bifonctionnelles combinant les domaines fonctionnels de CTLA-4 et de PD-L1

Au début de ce projet, nous avons développé des constructions transgéniques avec pour objectif de synthétiser des molécules bifonctionnelles combinant les domaines fonctionnels de CTLA-4 et de PD-L1. Pour cela nous avons synthétisé 3 constructions.

L'objectif de ces constructions bifonctionnelles était, à la fois d'induire une régulation des réponses immunitaires durant la phase initiatrice de par la présence de CTLA-4 mais également durant la phase effectrice des réponses immunitaires de par la présence de PD-L1. Toutefois, aucune des constructions ne s'est avérée capable d'enrayer le système immunitaire (section des travaux annexes).

Cette première série d'expériences a néanmoins permis d'entamer une réflexion sur deux points majeurs. **(i)** L'utilisation de CTLA-4 ne devait plus s'inscrire dans une perspective d'injections répétées de par l'impact négatif systémique et central sur les Tregs FoxP3<sup>+</sup>. Avec pour objectif final d'induire de la tolérance immunitaire, l'utilisation de CTLA-4 ne pourrait pas être envisagée au long-terme. **(ii)** PD-L1/Fc semble préserver la majorité des Tregs mais n'induit qu'un effet immunorégulateur modéré.

Pour le construit 1, une explication plausible de son incapacité à inhiber les réponses immunitaires réside potentiellement dans la conformation la molécule. En effet, une équipe (Darlington et al., 2005) a montré que CTLA-4 ne peut se lier à ses ligands que sous une forme homodimérique, or, dans le cas de nos constructions, il est difficile d'anticiper si une telle conformation est envisageable, par la présence dans le voisinage de PD-L1/Fc.

Concernant l'expression protéique du construit 3, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Nous avons détecté par ELISA la présence d'hétérodimère. Compte-tenu de la nécessité de CTLA-4 d'interagir sous forme dimérique, il est peu probable qu'un hétérodimérique CTLA-4/Fc-PD-L1/Fc puisse donner un effet intéressant. Toutefois, nous avons envisagé que des homodimères de CTLA-4/Fc et de PD-L1/Fc puissent également être synthétisés alternativement et agir sur la réponse immunitaire.

## Discussion et Conclusion

Par ailleurs, ces expériences préliminaires ont mis en évidence le rôle délétère de l'expression de CTLA-4/Fc sur les Tregs FoxP3<sup>+</sup>. Cet effet délétère est corrélé à la dose d'AAV injectée et impacte tous les compartiments lymphoïdes étudiés, sang, rate, ganglion et thymus.

Bien que PD-1 soit exprimé dans un laps de temps court après l'activation des lymphocytes à leur surface, nous avons observé que PD-L1/Fc était inefficace pour bloquer l'activation des lymphocytes au pic de la réponse immunitaire et, par ailleurs, n'empêchait pas la survenue d'une réponse humorale. Nous avons donc conçu de nouvelles molécules dérivées de PD-L1/Fc, décrites dans la seconde partie des résultats.

### B.1. Avantages de la stratégie VIR

1/ La stratégie VIR permet de tester un très large panel de protéines dont le gène est compatible avec la capacité d'encapsulation du génome de l'AAV (soit < ou = 4.7kB) afin de comparer l'efficacité de chacune à inhiber une réponse immunitaire.

2/ La production des AAV est relativement rapide et peu coûteuse en comparaison aux procédés de synthèse et de purification de protéines recombinantes. Notamment lorsque les objectifs de production protéique doivent être compatibles avec des protocoles d'expérimentation animale.

3/ Un autre avantage est qu'une fois les AAV-VIR injectés *in vivo*, ils expriment la protéine d'intérêt en continue. Cela permet de (i) s'affranchir d'éventuelles réinjections dans le cas d'une protéine recombinante et d'éviter une pharmacocinétique peu maîtrisée comme lors de réinjections. (ii) De suivre l'impact systémique des molécules sur les différentes populations cellulaires et dans différents compartiments lymphoïdes, et (iii) *in fine* de comparer leur efficacité sur la persistance de l'Ova.

Ainsi, dans notre cas, la stratégie VIR est bien une méthode visant à l'évaluation du potentiel immunorégulateur de nouvelles molécules sur les lymphocytes spécifiques de l'Ova.

La vectorisation de génome codant pour une protéine d'intérêt thérapeutique est un outil d'étude applicable à de nombreuses pathologies.

### B.2. Limites de la stratégie VIR

1/ La protéine transgénique étant exprimée en continue sans possibilité d'interrompre sa production, il est impossible de vérifier directement l'induction de tolérance immunologique, qui se caractérise par l'absence de réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène (dans notre cas, l'Ova) chez un individu immunocompétent et en l'absence de tout traitement.

2/ Une seconde conséquence à la production en continue de ces molécules est qu'il est difficile de maîtriser la concentration maximale en protéine recombinante qu'une concentration de génome viraux injectée pourra induire. Par ailleurs, bien que toutes nos constructions aient été obtenues à partir de l'AAV1 et possèdent le même promoteur, nous avons aussi observé de façon empirique qu'une concentration donnée de génomes viraux injectés entraînait parfois des différences de concentration de protéine transgéniques. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cela, il est possible que la conformation tridimensionnelle de certaines protéines soit un frein à leur production. Il est également envisageable que certaines constructions soient immunogènes ce qui entraînerait la destruction des fibres musculaires transduites. Quelle qu'en soit la raison, si la différence en concentration sérique est trop importante cela peut entraîner un biais d'interprétation.

Ainsi, après évaluation de l'intérêt de chacune de protéines, seules les candidates ayant permis d'inhiber durablement les réponses immunitaires seront produites et testées seules ou en combinaison dans un protocole permettant de vérifier l'induction de tolérance immunologique vis-à-vis de la protéine transgénique Ova.

### C-La localisation cellulaire de la protéine transgénique impacte-t-elle l'intensité des réponses immunitaires ?

J'ai eu l'opportunité de mener un projet parallèle visant à étudier l'impact de la localisation cellulaire d'une protéine transgénique sur son immunogénicité. Nous avons obtenu d'une collaboration avec A. Salvetti différents lots de productions d'AAV codant pour différentes formes d'Ova. A savoir, une forme cytosolique, membranaire et sécrétée de l'Ova. Ces AAV ont été injectés dans les muscles gastrocnémiens chez des souris et nous avons évalués l'impact de la localisation de la protéine transgénique sur l'intensité des réponses immunitaires dirigées contre elle. Ces expériences ont démontré que les trois

## Discussion et Conclusion

formes induisent des réponses immunitaires. La forme sécrétée et transmembranaire induit des réponses immunitaires d'intensité semblable et dont la cinétique est comparable. En revanche, ces données préliminaires semblent indiquer que la forme cytosolique de l'Ova induit des réponses cellulaires et le pic des réponses immunitaires est décalé dans le temps. D'autres études ont démontré qu'une protéine transgénique intracellulaire pouvait induire des réponses immunitaires (Mendell et al., 2010). Toutefois, dans le cadre de cette étude le muscle était inflammé. Nos travaux révèlent qu'un muscle sain peut également induire des réponses immunitaires spécifiques d'une protéine transgénique.

### D-Effets immunomodulateurs de CTLA-4/Fc

Dans toutes les expériences que nous avons menées, CTLA-4/Fc s'est avéré inhiber les réponses immunitaires avec une efficacité supérieure à toutes les autres molécules testées. Nous avons observé que l'efficacité de l'inhibition des réponses immunitaires était corrélée à la dose d'AAV-CTLA-4/Fc injectée. En fin d'expérimentation (jour 80 post-injection des AAV) 80 jours après injection de l'AAV-CTLA-4/Fc et l'AAV-Ova, la restimulation des splénocytes de souris en présence de peptides immunodominants de l'Ova ne permettait pas d'induire de sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Cela suggère qu'il n'y pas de mémoire immunologique induite vis-à-vis de l'antigène Ova chez ces souris.

En dépit de son remarquable effet inhibiteur, nous avons pu observer l'impact négatif de CTLA-4/Ig sur les Tregs FoxP3<sup>+</sup>. En effet, l'expression continue et l'accumulation de la molécule a un effet systémique progressif et fort. Nous avons pu observer qu'après 80 jours d'exposition à CTLA-4/Fc, que les deux tiers des Tregs avaient disparu des organes lymphoïdes étudiés, qui étaient le sang : les ganglions, la rate et le thymus, chez des souris injectées avec  $10^{10}$  gv. Cette diminution des Tregs était accompagnée d'une diminution de l'expression de la plupart des autres molécules immunorégulatrices étudiées dont CTLA-4, PD-1, TIM-3, TIGIT qui contribuent aux fonctions suppressives des Tregs. Le marqueur d'activation CD44 était également impacté par l'expression de CTLA-4/Fc. Par ailleurs, cette diminution des molécules immunorégulatrices a aussi été retrouvée chez les lymphocytes T conventionnels. En dépit de l'immunosuppression forte médiée par la molécule et pour une durée

## Discussion et Conclusion

relativement longue (80 jours), aucun effet secondaire n'a été observé sur la santé des souris.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la diminution des Tregs en périphérie. Les Tregs ne peuvent pas produire d'IL-2 indispensable leur survie et leur prolifération, dont la production des lymphocytes T conventionnels en dépend. Or, CTLA-4/Ig empêchant l'engagement de CD28, qui est nécessaire à la production de l'interleukine cela expliquerait la réduction des Tregs. En outre, d'autres équipes ont démontré que l'inactivation de *Cd28* ou l'utilisation d'anticorps bloquant CD80/CD86 conduisait à une diminution en fréquence et en nombre des Tregs semblable à ce que nous avons observés. De plus, il a été démontré que l'engagement de CD28 par les Tregs en périphérie est aussi important pour leur survie et leur maintien (Tang et coll., 2003).

Nous avons également observé que l'expression continue CTLA-4/Fc impacte profondément les Tregs thymiques lors d'expérience où l'AAV-CTLA-4/Fc seul était administré. Cette donnée n'est pas surprenante puisque l'engagement de CD28 est requis pour l'acquisition du phénotype Tregs et l'expression de FoxP3 (Tai et coll., 2005).

L'impact négatif de CTLA-4/Fc concerne particulièrement la clinique puisque cette molécule sert au traitement de diverses pathologies. Il semble important de souligner le rôle systémique joué par CTLA-4/Fc notamment au niveau thymique, et il serait intéressant d'étudier ce paramètre chez l'Homme.

### E- Effets immunomodulateurs de PD-L1/Fc

Nous avons observé que la co-injection de l'AAV-PD-L1/Fc et de l'AAV-Ova ne permettait pas d'inhiber le priming des réponses immunitaires cellulaires ni la formation d'anticorps anti-Ova. Cela a été plutôt inattendu puisqu'aux temps précoces, les 2 ligands de PD-L1 (PD-1 sur les lymphocytes T et CD80 sur les APC) sont fortement exprimés. De façon intéressante, nous avons observé une amélioration de la persistance du transgène Ova dans les muscles transduits des souris ayant reçu l'AAV-Ova et l'AAV-PD-L1/Fc. Ainsi l'expression de PD-L1/Fc semble prévenir au moins partiellement la cytolysse de certains myocytes suggérant une action lors de la phase effectrice de la réponse immune. L'ensemble des mécanismes d'actions de PD-L1 ne sont pas encore élucidés Il est envisageable que, contrairement à CTLA-4 pour qui la partie extracellulaire a été démontré comme suffisante pour induire un blocage des réponses immunitaires très

efficace, la partie extracellulaire de PD-L1 (seule) n'ai pas un effet aussi robuste. En effet, dans la plupart des études in vivo ayant utilisé PD-L1/Fc seul, ne sont très robustes pour démontrer l'efficacité de la molécule à inhiber les réponses immunes dans différents modèles (Song et al., 2015)

### F- Effet synergique de CTLA-4 et PD-L1

De façon intéressante, nous avons observé qu'une triple injection : AAV-CTLA-4/Fc (faible dose =  $10^{10}$  vg/souris) + AAV-PD-L1/Fc ( $10^{11}$  vg/souris) + l'AAV-Ova=  $3.10^{10}$  vg/souris) entraînait une amélioration de la persistance du transgène comparativement à la co-injection de l'un ou l'autre AAV-codant pour les molécules immunorégulatrices. En plus, bien que l'administration des AAV codant pour les deux molécules n'ait pas diminué la réponse immunitaire cellulaire aux temps précoces, ils ont eu un effet inhibiteur significatif des réponses humorales durant toute la durée de l'expérience. Ce résultat plutôt inattendu suggère que les voies passant par CD80/CD86 et PD-1 sont synergiques pour l'activation des lymphocytes T auxiliaires folliculaires (TFH) qui transmettent un signal activateur aux lymphocytes B pour la sécrétion d'immunoglobulines. En effet, les TFH expriment de fort taux de PD-1, permet de réguler l'activation cellulaire et la sécrétion d'anticorps des lymphocytes B. L'invalidation génétique de *Pd-1* entraîne notamment une diminution des plasmocytes (Good-Jacobson et al, 2010). Par ailleurs, CD28 est également requis pour lors de l'interaction TFH-lymphocytes B (Leibler et al., 2018). Il est possible d'envisager que CTLA-4/Fc et PD-L1/Fc aient une action synergique sur l'inhibition de la des TFH ayant observé une absence de sécrétion d'anticorps.

### G- Les nouvelles constructions dérivées de PD-L1/Fc

Ayant observé l'impact négatif de l'expression de CTLA-4/Fc après 80 jours de traitement sur les Tregs FoxP3<sup>+</sup> centraux et périphériques, nous avons conçu des AAV-VIR codant pour des protéines dérivées de PD-L1/Fc. En effet, nos données indiquent que PD-L1/Fc impacte moins les Tregs mais possède également un effet inhibiteur moins important. Nous avons alors synthétisé des variantes de cette molécule comportant 1(n1), 2 (n2), 3 (n3) ou 4 (n4) domaines fonctionnels espacés par un *linker* protéique. Ces construits sont théoriquement capables de se lier simultanément à plusieurs ligands. Par

## Discussion et Conclusion

l'utilisation de la stratégie VIR, nous avons observé que seul les construits n1 et n2 étaient efficaces pour inhiber les réponses immunitaires dirigées contre l'Ova. Concernant les réponses cellulaires, n1 et n2 ont permis de diminuer environ de moitié le pourcentage de lymphocytes spécifique de l'Ova autour du pic de la réponse immune, dans 3 expériences indépendantes.

Contre toute attente, ces constructions ont également permis l'inhibition complète de la production d'anticorps anti-Ova. PD-L1/Fc qui comporte le même nombre de domaines fonctionnels que n1, pourtant il n'induit pas cet effet inhibiteur de la réponse humorale. Il se peut que l'absence du second domaine immunoglobulinique dans les molécules n1 et n2 ait modifié les capacités de liaison de ces molécules. Cette hypothèse est étayée des données récentes obtenues par Chaudhri et coll., (2017) où les auteurs proposaient que PD-L1 ne pouvait se lier à CD80 que dans une conformation particulièrement flexible. Cela semblait possible que lorsque les deux molécules étaient exprimées à la surface d'une même cellule. Ainsi, cela suggère que la synthèse du seul domaine d'interaction de PD-L1 facilite la liaison à CD80.

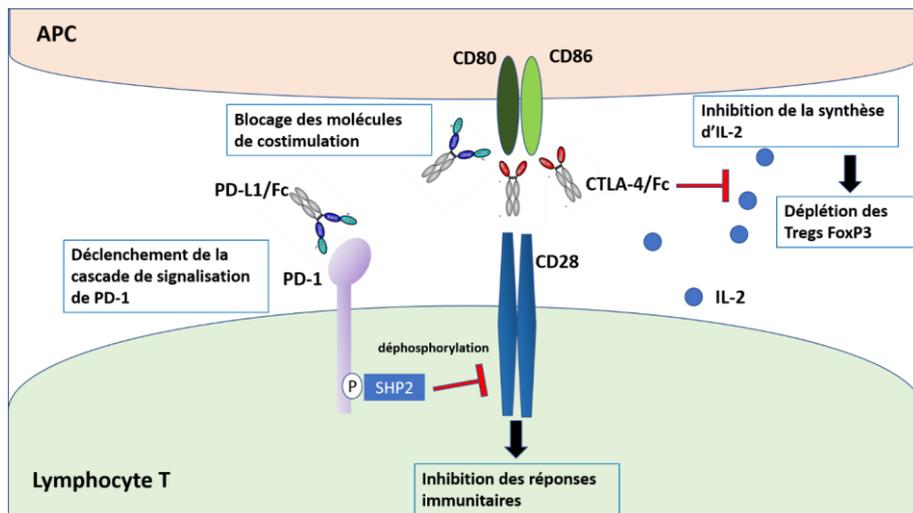
Bien que l'inhibition des réponses immunitaires médiées par ces nouvelles molécules semble intéressante, la production de molécules dans un second temps semble une étape indispensable à la validation d'un hypothétique potentiel clinique. Une piste en faveur d'un intérêt translationnel est une forte homologie de séquence entre PD-L1 murin et son orthologue murin (>70%) mais aussi les travaux menés sur le ciblage de cette voie dans le cancer. Il est important de garder à l'esprit que nombreux sont les paramètres qui peuvent différer entre un modèle murin et primate voire primate humain.

Dans un premier temps, il est envisageable de produire ces molécules et d'évaluer in vitro d'abord leur capacité à se lier à des cellules humaines et, ensuite d'effectuer un certain nombre de tests, permettant d'évaluer leurs capacités inhibitrices.

### *Remarques concernant l'induction de tolérance dans le muscle squelettique*

La tolérance immunologique est un concept comprenant de multiples mécanismes et permettant l'absence de réponses immunitaires vis-à-vis d'un antigène sans pour autant compromettre l'intégrité du système immunitaire. Induire de la tolérance vis-à-vis d'une protéine transgénique immunogène sécrétée et synthétisée dans le muscle est complexe. Les données de la clinique ont néanmoins démontré l'avantage de l'injection intramusculaire, qui préserve au moins en partie les vecteurs des NAb. Toutefois, le

muscle squelettique qui est un organe peu enclin à l'établissement de tolérance et possède une immunité singulière. En cas d'inflammation, le muscle squelettique est notamment capable d'induire l'expression de molécules du CMH et de recruter des cellules immunitaires (Sciorati et al., 2016).



**Figure 16. Schéma récapitulatif des hypothèses du travail sur les mécanismes d'inhibitions de CTLA-4/Fc et PD-L1/Fc.** CTLA-4/Fc et PD-L1/Fc inhibent l'axe principal de costimulation CD80/CD86/CD28 par des mécanismes non-redondants. CTLA-4/Fc limite l'accès de CD28 à ses ligands et bloque l'activation des lymphocytes. Cela engendre la diminution de la production d'IL-2 qui a pour conséquence la déplétion des Tregs. D'autre part, en se liant à PD-1, PD-L1/Fc et les molécules dérivées déclenchent la cascade de signalisation passant par SHP2 et diminuent la quantité de CD28 présente à la surface des lymphocytes.

## V- CONCLUSION

---

Ce travail de thèse a permis de proposer une méthodologie permettant l'évaluation *in vivo* de protéines aux propriétés immunorégulatrices. Cette méthodologie permet de tester un vaste panel de molécules immunorégulatrices pour en évaluer le potentiel thérapeutique dans un cadre préclinique.

Les résultats obtenus ont démontré clairement l'impact négatif de CTLA-4/Fc sur les lymphocytes Tregs exprimant le facteur de transcription FoxP3. Nous avons également mis en évidence la synergie d'action de CTLA-4/Fc et PD-L1/Fc sur l'inhibition des réponses humorales. Par ailleurs, ces travaux ont aussi permis de proposer deux nouvelles protéines permettant d'améliorer la persistance du transgène. Enfin, ce travail suggère que les voies de signalisation passant par PD-L1 et CTLA-4 ciblent toutes deux l'inhibition de la costimulation passant par CD28 bien qu'empruntant des mécanismes différents.

La manipulation des axes majeurs d'immunorégulation passant par B7.1/B7.2 et PD-1 par l'utilisation de CTLA-4/Fc et PD-L1/Fc semble entraîner une lymphopénie des Tregs plus que la tolérance immunitaire. En effet, les deux protéines recombinantes ciblent CD28. Alors que CTLA-4 majoritairement bloque l'accès direct aux molécules B7, l'engagement de PD-L1/Fc à PD-1 probablement diminue la quantité de molécule CD28 à la surface des lymphocytes outre ses autres fonctions inhibitrices. Bien que leurs mécanismes d'action soient différents, ainsi que la localisation anatomique de leurs ligands et leur temporalité d'expression, il semble que leur effet synergique soit plus lié à leur différence mécanistique qu'à leur cible principale (CD28).

Bien que la stratégie VIR ne permette pas de tester directement l'induction de tolérance immunologique, le transfert de splénocytes injectés avec les rAAV-Ova+ rAAV VIR à des souris irradiées à dose subléthale de même fond génétique. Les souris ayant reçu les splénocytes, pourraient alors recevoir une injection intramusculaire d'AAV-Ova. L'absence de réponse immunitaire traduirait l'induction de tolérance. En revanche, les souris témoins ayant reçues l'AAV-Ova seul devraient déclencher une réponse immunitaire de type mémoire de forte intensité.

## Discussion et Conclusion

Bien que menées *in vitro*, certaines expériences ont montré qu'il était possible d'induire des mécanismes de tolérance en manipulant ces axes. Notamment, CTLA-4-Ig en présence d'IL-2 est capable de convertir des lymphocytes CD4 conventionnels en Tregs (Razmara et al., 2008). D'autre part, PD-L1-Ig en présence de TGF- $\beta$  est également capable d'induire des Tregs (Francisco et al., 2009). Il serait intéressant de tester ces combinaisons *in vivo* dans l'objectif d'induire de la tolérance vis-à-vis d'une protéine transgénique. Ces deux études semblent indiquer que l'environnement cytokinique contribue en grande partie à l'induction de Tregs. Dans ce sens, il a été démontré que CTLA-4-Ig avait une action synergique avec l'IL-15 dans la survie de greffe (Mathews et al., 2017).

Les données actuelles des études précliniques et de la clinique révèlent qu'une immunosuppression de courte durée est parfois suffisante pour induire une expression à long-terme d'une protéine transgénique (Corti et al., 2015; Flanigan et al., 2013; Nathwani et al., 2011b). Ces études ne précisent pas clairement les mécanismes responsables d'une tolérance au long court.

Dans l'éventualité où nous parviendrions à induire de la tolérance vis-à-vis de protéine transgénique immunogène, il n'est pas certain que cela suffise au succès de la thérapie. Comme évoqué précédemment, l'AAV est un outil biologique complexe, et il faudra certainement combiner plusieurs stratégies pour parvenir à l'induction de tolérance de tous ces composants.

1  
2

## VI- ANNEXES

---

## Oral-tolerization Prevents Immune Responses and Improves Transgene Persistence Following Gene Transfer Mediated by Adeno-associated Viral Vector

Romain Harget<sup>1,2</sup>, Benjamin Chevalier<sup>1,2</sup>, Léa Dupaty<sup>1,2</sup>, Yassine Naïmi<sup>1,2</sup>, Gaëtan Riou<sup>1,2</sup>, Laurent Drouot<sup>1,2</sup>, Laetitia Jean<sup>1,2</sup>, Anna Salvetti<sup>3-6</sup>, Olivier Boyer<sup>1,2,7</sup> and Sahil Adriouch<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U905, Rouen, France; <sup>2</sup>Normandie University, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Rouen, France; <sup>3</sup>International Center for Research in Infectiology (CIRI), Inserm U1111, CNRS UMR 5308, Lyon, France; <sup>4</sup>Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France; <sup>5</sup>Université de Lyon, UCB-Lyon1, Lyon, France; <sup>6</sup>LabEx Ecofect, Université de Lyon, Lyon, France; <sup>7</sup>Rouen University Hospital, Department of Immunology, Rouen, France

Gene therapy represents a feasible strategy to treat inherited monogenic diseases and intramuscular (i.m.) injection of recombinant adeno-associated viral (AAV) vector is now recognized as a convenient and safe method of gene transfer. However, this approach is hampered by immune responses directed against the vector and against the transgenic protein. We used here to reproduce this situation a mouse model where robust immune responses are induced following injection of an AAV vector coding for an immunogenic transgenic protein. We show that prophylactic oral administration of the immunogenic protein before AAV-mediated gene transfer completely prevented antibody formation and cytotoxic CD8<sup>+</sup> T-cell response. Consistently, prophylactic oral-tolerization considerably improved long-term transgene persistence and expression. Mechanistically, inhibition of the cytotoxic immune response involved abortive proliferation of antigen-specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells, upregulation of the PD-1 immunoregulatory molecule, downregulation of the Bcl-2 antiapoptotic factor, and their deletion in the context of AAV-mediated gene transfer. Hence, gene therapy may represent an ideal situation where oral-tolerization can be adopted before or at the same time as vector injection to efficiently prevent deleterious immune responses directed against the transgenic protein.

Received 28 January 2015; accepted 3 August 2015; advance online publication 8 September 2015. doi:10.1038/mt.2015.146

### INTRODUCTION

The use of viral-derived vectors in gene therapy settings represents a promising strategy to treat monogenic diseases or to induce the expression of a given secreted therapeutic transgenic protein *in vivo*.<sup>1,2</sup> Recombinant adeno-associated viral (AAV) vectors represent a safe and efficient way to achieve *in vivo* gene transfer and, depending on the serotype, can be used to transduce different target tissues.<sup>3,4</sup> AAV vectors also demonstrated several advantages

over other viral-derived vectors, as their lower immunogenicity, their ability to transduce nondividing cells, and their lower risk to induce insertional mutagenesis.<sup>1-5</sup>

AAV-mediated gene transfer and long-term transgene expression has been achieved in several preclinical animal models as well as in clinical trials where it was demonstrated to be safe and effective.<sup>6-8</sup> However, AAV-mediated gene transfer triggers immune responses directed against the viral capsid proteins and/or against the transgenic proteins.<sup>3,7,9-14</sup> Activation of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells mediates the destruction of transduced cells and loss of transgene expression<sup>7,9,14-16</sup> and humoral immunity generates neutralizing antibodies.<sup>3,15-19</sup> To date, administration of immunosuppressive drugs and/or careful patients selection to avoid immune responses directed notably against the transgenic protein represent the only approaches to circumvent this limitation.<sup>7,11,18,20-24</sup> Yet, immune responses have been observed in clinical trials despite the use of immunosuppressive drugs.<sup>15,21</sup> Hence, strategies aiming to circumvent immune responses following AAV vectors injection should greatly enhance long-term transgene expression and may broaden the number of patients eligible for gene therapy.<sup>21,11</sup> In our study, we evaluated an alternative approach to promote antigen-specific oral-tolerization instead of systemic immune suppression.

Oral tolerance is characterized by a specific inhibition of the immune responses directed against defined antigens administered by the oral route. Therefore, it has the advantage over drug-based immunosuppression to be antigen-specific and long-lasting. Tolerance induction represents the "default" response of the intestinal immune system. Intestinal dendritic cells, located in the lamina propria and mesenteric lymph nodes (MLNs), have been implicated in the uptake of orally derived antigens and in their tolerogenic presentation to T cells.<sup>25-30</sup> Several mechanisms have been identified that could account for the induction of oral tolerance as energy and/or deletion of antigen-specific T cells<sup>31,32</sup> or induction of regulatory T cells (Tregs).<sup>25,33</sup>

Encouraging results have been obtained in clinical trials using oral tolerance to treat allergies while partial clinical responses, limited to particular subsets of individuals, were observed in the context of autoimmune diseases. T is

**Correspondence:** Sahil Adriouch, Inserm U905/Institute for Research and Innovation in Biomedicine Faculté de médecine et de pharmacie 22, boulevard Gambetta 76183 Rouen cedex 1, France. E-mail: sahil.adriouch@univ-rouen.fr

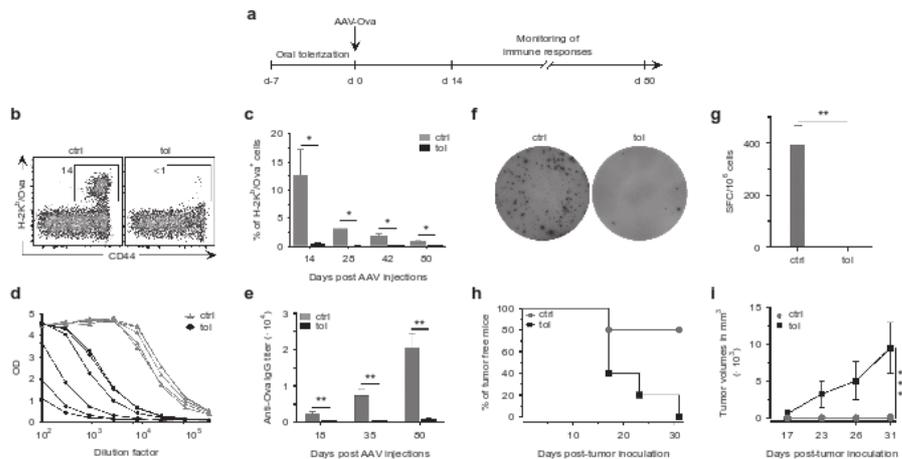
suggests that the efficacy of oral-tolerization might depend on the clinical situation and on the specific immune status of each patient.<sup>34,35</sup> One explanation may reside in the difficulty to tolerate secondary/memory immune responses suggesting that oral-tolerization may be beneficial in prophylactic rather than curative scenarios.<sup>36</sup> Interestingly, gene therapy may offer such clinical situations by providing the possibility to tolerate individuals before vector injection.

We tested in the present study the effects of oral-tolerization in an animal model of AAV-mediated gene transfer. For that, the protein coded by the vector was first orally administered for 7 days prior to AAV-mediated gene transfer. To stringently evaluate the capacity of this protocol to tolerate the immune system, we chose here as a protein model the highly immunogenic ovalbumin (Ova) antigen and the i.m. route. We previously showed that i.m. injection of AAV-Ova induces prominent humoral and cellular immune responses that are associated with rapid loss of transgene expression.<sup>27,28</sup> We provide here the first proof-of-principle that oral-tolerization prior to AAV-mediated gene transfer completely abrogates humoral and cellular immune responses directed against a soluble immunogenic transgenic protein. This was associated with long-term transgene expression and with the maintenance of the secreted transgenic protein in the circulation of tolerized animals.

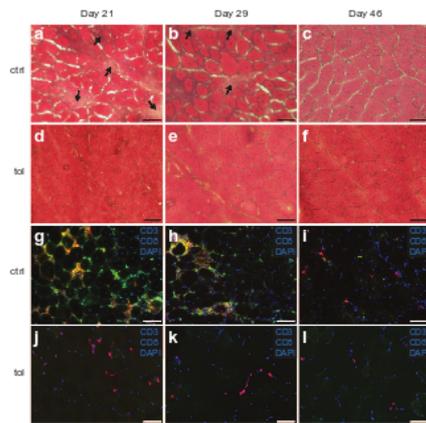
## RESULTS

### Oral-tolerization prevents immune responses directed against the transgenic protein

Intramuscular administration of AAV vectors can lead to a robust immune response that correlates with the elimination of the transduced cells and with the disappearance of the transgenic protein.<sup>27,28</sup> We investigated here, in an animal model, the efficiency of oral-tolerization to prevent the immune response directed against the transgenic protein. For that, mice were orally-tolerized with the model protein ovalbumin (Ova), given at 1% in the drinking water, prior to i.m. administration of AAV-Ova at day 0. Immune responses were then monitored over time from days 14 to 80 (Figure 1a). In untolerized control animals, up to 18% of circulating CD8<sup>+</sup> recognized Ova 14 days post-AAV-Ova transduction. In contrast, orally-tolerized mice displayed little if any cellular immune responses (Figure 1b,c). Ova-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> immune responses were also undetectable by the more sensitive Enzyme-linked immunospot assay in orally-tolerized mice at day 80 (Figure 1f,g). Similarly, oral-tolerization significantly prevented the formation of anti-Ova IgG antibodies (Figure 1d,e). Of note, this oral-tolerization protocol completely blocked immune responses irrespective of the administered dose of AAV-Ova, i.e.,  $3.5 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^{10}$ , or  $10^{11}$



**Figure 1** Oral-tolerization prevents immune responses directed against the transgenic protein. (a) Protocol outline. B6 mice were given 1% of Ova, *ad libitum*, in drinking water during 7 days and then injected with adeno-associated virus (AAV)-Ova ( $5 \times 10^9$  vg/mouse) in both gastrocnemius ( $n = 5$  per group). Immune responses were monitored between days 14 and 80 after injections. (b) Blood samples were collected 14 days post-AAV-Ova transduction and percentage of Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells was determined using H-2K<sup>b</sup>/Ova<sub>237-264</sub> dextramers staining and flow cytometry in control (ctrl) and tolerized (tol) mice. The representative flow cytometric panels shown here represent percentage of Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the gated CD8<sup>+</sup> population. (c) Percentage of Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the blood were determined at the indicated times points post-AAV-Ova transduction. (d,e) Sera were collected at 80 days (d) or at the indicated time points (e) post-AAV-Ova transduction and anti-Ova IgG titers were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Curves represent optical density plotted against dilutions factors from data obtained at day 80 (d). The IgG titers correspond to the dilution yielding the half-maximum optical density obtained with a positive control serum used in all experiments (e). (f,g) At day 80, splenocytes were harvested and analyzed by *ex vivo* enzyme-linked immunospot (ELISpot) assays for their capability to secrete IFN $\gamma$  after restimulation with the Ova<sub>237-264</sub> peptide. (f) Representative ELISpot data obtained with control and tolerized mice. (g) Average number of spot forming cell per  $10^5$  splenocytes obtained in control and tolerized group of mice ( $n = 5$ /group). (h,i)  $10^6$  EG7 Ova-bearing tumor cells were injected 14 days after AAV-Ova or PBS injections ( $n = 5$ /group). Mice were monitored for tumor development (h) and tumor volume (i). Ova, ovalbumin; PBS, phosphate-buffered saline.



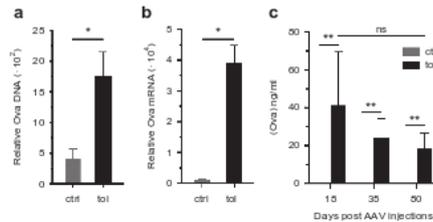
**Figure 2** Oral-tolerization prevents muscle infiltration by CD8<sup>+</sup> T cells. Mice were tolerized or not during 7 days with 1% Ova in drinking water and injected as before with adeno-associated virus (AAV)-Ova ( $5 \times 10^{10}$  vg/mouse) in both gastrocnemius at day 0 ( $n = 6$  per group). Muscles were collected at the indicated time points post-AAV-Ova injection. Muscle sections from control (a-c) and tolerized (d-f) mice were stained with hematoxylin and eosin to evaluate muscle histology and the overall level of mononuclear cell infiltration. Muscle sections from control (g-i) and tolerized (j-l) mice were analyzed by immunofluorescence after immunostaining with anti-CD3 (green) and anti-CD8 (red) antibodies and nucleus counterstaining with DAPI (blue). Scale bars represent 50  $\mu$ m and arrows in (a) and (b) show area containing infiltrating cells. AAV, adeno-associated virus; ctrl, control; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; Ova, ovalbumin; tol, tolerized; vg, vector genome.

vg (Supplementary Figure S1a-c). Also, oral feeding for only 5 days (Supplementary Figure S1d-f), or using a 10-fold lower concentration of Ova (i.e., 0.1%) (Supplementary Figure S1g), similarly resulted in complete prevention of immune responses, suggesting that robust tolerization mechanisms are induced following oral feeding.

We then evaluated the capacity of our tolerization protocol to inhibit immune responses in less favorable conditions resulting from the use of incompletely purified AAV-preparations or from the use of self-complementary AAV vectors (scAAV). Indeed, both conditions are associated with the triggering of Toll-like receptors (TLRs) and activation of innate immune cells. To mimic these situations, we coinjected our AAV-Ova vector with contaminating CpG-ODNs, a potent TLR9 agonist. Our results demonstrate that, even in this more immunogenic situation, oral-tolerization prevented cellular and humoral immune responses directed against Ova and improved its persistence in the circulation (Supplementary Figure S2).

Next, we investigated the functionality of the cytotoxic T cells generated upon AAV-Ova transduction using a well-characterized CD8<sup>+</sup>-dependent antitumor response *in vivo*.<sup>38,40</sup> For that, Ova-bearing EG7 cells were injected s.c. in tolerized or control mice 14 days after AAV-Ova injection and tumor growth was monitored

### Oral-tolerization Improves Transgene Persistence



**Figure 3** Oral-tolerization favors transgene long-term expression. AAV-Ova-injected muscles were harvested at day 80 from tolerized or control mice and transgene persistence and expression were evaluated using quantitative polymerase chain reaction. (a) Transgene persistence in transduced muscle was evaluated by quantification of Ova DNA by quantitative polymerase chain reaction. (b) Transgene expression was evaluated by quantification of the corresponding Ova mRNA by qRT-PCR. Data were normalized against the level of Eef2 mRNA (arbitrary units). (c) Mean concentrations of Ova in the sera of tolerized and control mice were determined 18, 35, and 80 days after AAV-Ova injection by enzyme-linked immunosorbent assay. AAV, adeno-associated virus; ctrl, control; Ova, ovalbumin; tol, tolerized.

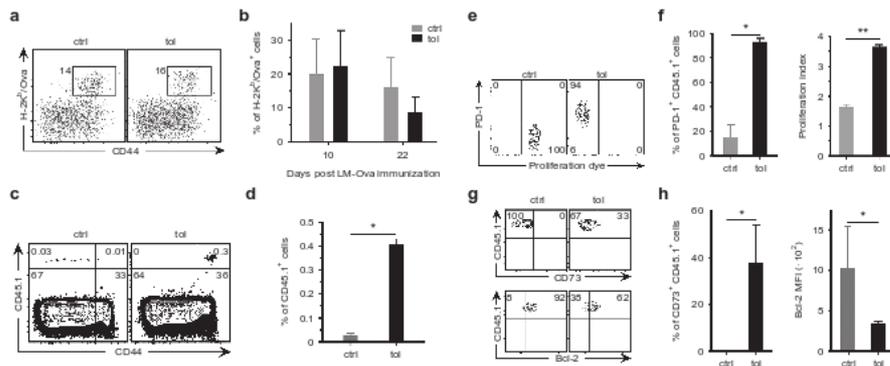
overtime. Results showed that virtually all control mice rejected Ova-bearing tumor cells (Figure 1h). In contrast, all tolerized mice developed tumors within the first 30 days after EG7 inoculation in agreement with the absence of functional anti-Ova cytotoxic T cells response in tolerized mice.

### CD8<sup>+</sup> T cells do not infiltrate muscles in tolerized mice

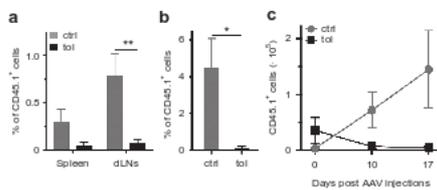
We next investigated the presence of mononuclear cells infiltration in transduced muscle sections. For that, gastrocnemius was harvested 21, 29, or 46 days after gene transfer for histological analyses. Hematoxylin and eosin staining at day 21 and 29 revealed conspicuous mononuclear cell infiltration and myofiber necrosis/regeneration evidenced by the presence of centronucleated fibers in muscle sections of untolerized mice (Figure 2a,b). Immunofluorescence confirmed the presence of cytotoxic T cells expressing both CD3 and CD8 that surrounded muscle fibers (Figure 2g,h). At the latest time point analyzed, histological muscle structure tended to normalize suggesting termination of the immune response and almost complete muscle regeneration (Figure 2c). In contrast, little if any mononuclear cell infiltration was detected in orally-tolerized mice (Figure 2d-f) and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells were virtually absent at all analyzed time points (Figure 2j-l). Only CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells, possibly corresponding to dendritic cells, were sparsely detected. Thus, oral-tolerization prior to AAV-mediated gene transfer protects transduced muscle fibers from CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells.

### Oral-tolerization favors long-term transgene expression

We next examined whether the control of immune responses was associated with the long-term persistence of the transgene. For that, the relative abundance of DNA and mRNA coding for Ova were quantified in transduced muscles 80 days after AAV-Ova



**Figure 4** Oral-tolerization induces abortive proliferation, expression of PD-1, and downregulation of Bcl-2 in adoptively transferred Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells. **(a,b)** Mice were orally-tolerized during 7 days with 1% Ova in drinking water and then injected i.v. with  $10^5$  pfu of a live strain of *Listeria monocytogenes* expressing Ova (Lm-Ova) ( $n = 5$ /group). Blood samples were collected after infection to monitor the cellular levels of Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells by flow cytometry. **(a)** Representative cytometric profiles obtained at day 10 postinfection were gated on the CD8<sup>+</sup> population. **(b)** Percentage of anti-Ova CD8<sup>+</sup> T cells 10 and 22 days postinfection are shown. **(c-h)**  $10^5$  Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells (OT-I CD45.1<sup>+</sup>), stained with a proliferation tracking dye, were adoptively transferred into CD45.2 congenic mice. Recipient mice were then orally-tolerized during 7 days and mesenteric lymph nodes (MLNs) were harvested and analyzed by flow cytometry ( $n = 5$ /group). **(c)** Representative cytometric profiles, gated on the CD8<sup>+</sup> population, and **(d)** percentage of CD45.1<sup>+</sup> cells in MLNs are shown. **(e)** Cytometric profiles representing the level of cell proliferation (dilution of the proliferation dye) and PD-1 expression on gated CD45.1<sup>+</sup> cells. **(f)** Percentage of CD45.1<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> cells in the gated CD8<sup>+</sup> cells and their proliferation index. **(g)** Cytometric profiles showing the expression of CD73 (top) and Bcl-2 (bottom) on the gated CD45.1<sup>+</sup> cells. **(h)** Percentage of CD45.1<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> cells (left) and mean fluorescence intensity (MFI) of Bcl-2 staining (right). ctrl, control; Ova, ovalbumin; tol, tolerized.



**Figure 5** Oral-tolerization induces deletion of Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the context of gene therapy. As in figure 4,  $10^5$  OT-I CD45.1<sup>+</sup> cells were adoptively transferred into CD45.2 congenic recipient mice, which were then orally-tolerized during 7 days. At the end of the oral-tolerization protocol, mice were injected with AAV-Ova in both gastrocnemius ( $3.5 \times 10^5$  vg). Spleen, mesenteric lymph nodes (MLNs), and draining lymph nodes (dLNs) were harvested for flow cytometry analysis ( $n = 5$ /group). **(a)** Percentage of transferred CD45.1<sup>+</sup> cells in the gated CD8<sup>+</sup> population was evaluated in spleen and dLNs 10 days post-transduction. **(b)** In other groups of mice, percentage of transferred CD8<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> cells was also evaluated in the blood at day 14 postinjection. **(c)** Total number of CD45.1<sup>+</sup> transferred CD8<sup>+</sup> cells was enumerated from the harvested pooled lymphoid organs (spleen, dLNs, and MLNs) before AAV-Ova injection (at day 0) and 10 and 17 days thereafter. AAV, adeno-associated virus; ctrl, control; Ova, ovalbumin; tol, tolerized; vg, vector genome.

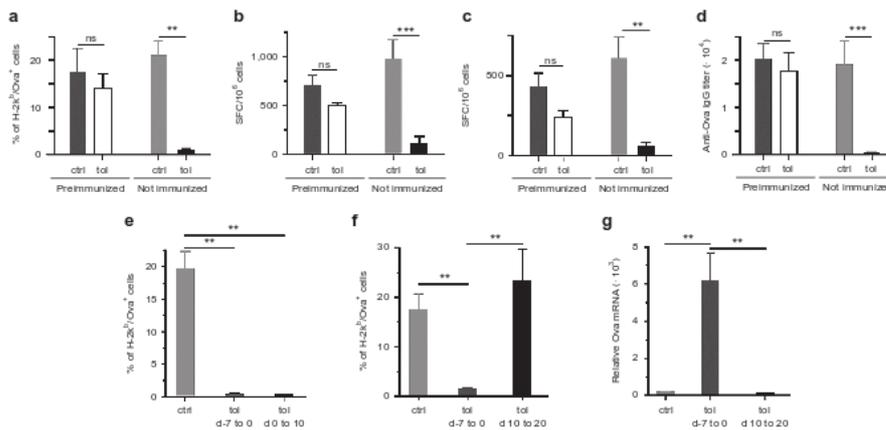
injection. As anticipated, we observed significant higher copy numbers of the transgene and of its corresponding mRNA, in muscle samples of tolerized mice (Figure 3a,b). Concordantly, quantification of Ova in serum confirmed the stable expression of Ova in tolerized mice while Ova were under the limit of detection in control mice (Figure 3c). Hence, these results

show that oral-tolerization sustains transgene persistence and expression, and allows long-term maintenance of the secreted transgenic protein.

#### Oral-tolerization induces abortive proliferation of adoptively transferred Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells

To investigate the mechanisms involved, we first analyzed the cell subsets present in the MLNs. No difference was found in the frequencies nor in the phenotypes of the analyzed subsets, that included Tregs, Bregs, and dendritic cells (Supplementary Figure S3). Also, depletion/inactivation of the vast majority of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs at the end of the oral-tolerization protocol was not sufficient to abrogate the induced tolerance (Supplementary Figure S4). We next investigated the possible induction of anergy and/or deletion of antigen-specific T cells. As anergy can be breached by proinflammatory infections, we next infected orally-tolerized mice with a replicative *Listeria monocytogenes* strain expressing Ova (Lm-Ova). In contrast to what we observed following injection of the replication-defective AAV-Ova (Figure 1), mice responded well to Lm-Ova (Figure 4a,b), indicating that Ova-specific T cells are still present and are energized rather than deleted during the initial step of oral-tolerization.

To study more precisely the fate of anti-Ova CD8<sup>+</sup> T cells, Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells from TCR-Tg OT-I mice harboring the CD45.1 congenic marker (OT-I CD45.1<sup>+</sup> cells) were adoptively transferred into CD45.2 recipients. Transferred cells were significantly more abundant in tolerized mice than in control animals and expressed the CD44 activation marker (Figure 4c,d). Labeling with a fluorescent dye revealed that adoptively transferred OT-I



**Figure 6** Oral-tolerization is very efficient to prophylactically prevent immune responses, but not to suppress already primed immune responses. **(a-c)** Mice were preimmunized or not with CFA/Ova. Three weeks later, mice were orally-tolerized during 7 days with 1% Ova solubilized in their drinking water. At the end of the tolerization protocol, mice were transduced using  $3.5 \times 10^9$  vg of AAV-Ova injected in both gastrocnemius. **(a)** CD8<sup>+</sup> cellular immune responses were monitored by flow cytometry in preimmunized and non-preimmunized groups by collecting blood samples 15 days after AAV-Ova injections. Bar graph represents the percentage of Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells in each indicated groups. **(b,c)** Eighty days after AAV-Ova injections, splenocytes were harvested and Ova-specific CD8<sup>+</sup> **(b)** and CD4<sup>+</sup> **(c)** immune responses were evaluated by Enzyme-linked immunosorbent assays. **(d)** Eighty days after AAV-Ova injections, sera were collected and anti-Ova IgG were titrated by enzyme-linked immunosorbent assay. **(e-g)** Mice were orally-tolerized during 7–10 days with 1% Ova in their drinking water either before (day –7 to 0), at the same time (day 0 to 10), or after (day 10 to 20) AAV-Ova injection. **(e,f)** Blood samples were collected 14 days **(e)** or 21 days **(f)** post-AAV-Ova transduction and the percentage of Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells was determined using H-2K<sup>b</sup>/Ova<sub>233-254</sub> dextramers staining and flow cytometry in the indicated group of mice. **(g)** Transgene persistence and expression was evaluated by quantification of Ova mRNA by qRT-PCR in the indicated group of mice. Data are normalized against the level of Eef2 mRNA (arbitrary units). AAV, adeno-associated virus; ctrl, control; Ova, ovalbumin; tol, tolerized; vg, vector genome.

CD45.1<sup>+</sup> cells indeed proliferated in the MLNs of tolerized mice (Figure 4e), but also acquired expression of the PD-1 exhaustion/anergic marker alongside cell division (Figure 4f). One third of transferred cells also acquired expression of CD73, a regulatory molecule involved in anergy<sup>41</sup> (Figure 4g,h). Finally, as anergic T cells tend to die by apoptosis,<sup>42</sup> we further analyzed the intracellular level of the antiapoptotic factor Bcl-2 and observed that transferred cells displayed reduced levels of Bcl-2 (Figure 4g,h). Taken together, these results suggest that Ova-specific T cells abortively proliferate in the MLNs upon encounter of their nominal antigen brought by the oral route.

#### Oral-tolerization induces deletion of Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the context of AAV-mediated gene therapy

We next addressed the fate of antigen-specific cells, not only after oral-tolerization, but also following AAV-mediated gene transfer. For that, OT-1 CD45.1<sup>+</sup> cells were again injected in congenic CD45.2 recipient mice and followed after AAV-Ova i.m. injection. While previous experiments demonstrated very few transferred CD45.1<sup>+</sup> cells in control animals before injection of AAV-Ova (Figure 4c,d), these cells were clearly visible after gene transfer in spleen, draining lymph nodes, and circulation suggesting cell rebound following antigenic stimulation (Figure 5a,b). In contrast, CD45.1<sup>+</sup> that were more abundant in tolerized animals

before gene transfer (Figure 4c,d), were almost undetectable later in spleen, draining lymph nodes, and circulation of these animals (Figure 5a,b). Lastly, we enumerated transferred cells to ascertain that CD45.1<sup>+</sup> cell percentage faithfully reflected their absolute number. The results confirmed that the absolute number of antigen-specific CD8<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> cells gradually increased in the peripheral lymphoid organs of untolerized mice while, in striking contrast, they completely disappeared from the lymphoid organs of tolerized mice (Figure 5c). Altogether, these data suggest that although antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells divided during oral-tolerization, they acquired PD-1, downregulated Bcl-2 survival factor, and are finally deleted from the repertoire of tolerized mice upon antigen reencounter in the context of AAV-mediated gene transfer.

#### Prophylactic oral-feeding, but not interventional oral-feeding, prevents immune responses elicited by AAV vectors

As oral-tolerization has yielded limited success in the treatment of autoimmune diseases, we next wondered whether oral-tolerization would be more efficient to prevent, rather than to suppress, immune responses. To examine this question, we applied the oral-tolerization protocol to animals preimmunized with complete Freund's adjuvant (CFA)/Ova before initiation of oral-tolerization. Results showed that oral-tolerization was not efficient to

prevent immune responses elicited by AAV-Ova transduction in the preimmunized group of mice (Figure 6a-d). Similar results were obtained with animals preimmunized with Lm-Ova to elicit a memory anti-Ova immune response 35 days before the administration of the AAV-Ova vector (data not shown). Thus, oral-tolerization is very efficient to prevent primary immune responses elicited by AAV-vectors but not secondary/memory immune responses. We next directly compared prophylactic and interventional protocols by initiating antigen feeding either before, at the same time, or after vector transduction. Results showed that initiation of oral-tolerization at the same time as vector transduction was as effective as initiation 7 days before to completely prevent the emergence of the cytotoxic CD8<sup>+</sup> T-cell response (Figure 6e). However, expression of transgenic protein from single-stranded DNA AAV-vectors is known to require at least 7 days *in vivo*, suggesting that oral-tolerization may still have been initiated in this particular situation before the priming of the immune response. Concordantly, when antigen feeding was initiated 10 days after vector transduction (i.e., at a time point where immune responses become detectable), oral feeding was inefficient to suppress cytotoxic CD8<sup>+</sup> T-cell response and to improve long-term transgene persistence (Figure 6f,g). Thus, oral-tolerization by antigen feeding is only effective when applied before or at the same time as vector transduction, two situations that are still fully compatible with the specific clinical context of gene therapy.

## DISCUSSION

Significant progress has been made in the field of AAV gene therapy to improve efficacy and safety of the vectors. One of the main persisting challenges is the better control of adverse immune responses to improve long-term expression of the transgene. Indeed, immune responses directed against the vector not only compromise transduction efficiency during vector reinjections, but also lead to the elimination of transduced cells by capsid-specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells.<sup>31,42</sup> The transgenic protein itself, coded by the vector, also induces immune responses that can impair gene transfer efficacy.<sup>35</sup> Current strategies used in clinic to overcome this limitation include administration of immunosuppressive drugs and careful selection of the patients presenting the lower risk of developing such immune responses notably against the transgenic protein. For instance, patients enrolled in hemophilia gene therapy trials were selected based on the nature of their genetic mutation (i.e., missense rather than nonsense mutations) and based on their absence of immune responses (i.e., inhibitors formation) to protein replacement therapy.<sup>20,22-24</sup> Developing strategies to inhibit these immune responses is therefore of major importance, not only to promote long-term transgenic protein expression, but also to extend gene therapy to other patients. We evaluated here an oral-tolerization strategy to specifically dampen the humoral and cellular immune responses directed against the transgenic protein coded by the AAV vector and demonstrated its efficacy to improve long-term transgene expression (Figures 1 and 3).

We used here as a model an AAV-Ova vector to elicit muscle secretion of Ova following its intramuscular administration. This experimental condition mimics clinical situations where the transgenic protein is meant to be expressed systemically such as gene therapy of hemophilic patients for instance. We chose here a

highly immunogenic protein model to generate a stringent model where protocols designed to inhibit immune responses can be faithfully evaluated. We used this experimental setting to show that prophylactic oral administration of the protein of interest is able to completely prevent both humoral (Figure 1d,e) and cellular immune responses (Figure 1b,c,f,g) induced by AAV-mediated muscle gene transfer. Concordantly, the transgenic Ova protein was persistent in the serum until the latest time-points studied (Figure 3c) as was the corresponding Ova mRNA in transduced muscle (Figure 3a,b). This was in agreement with the absence of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells infiltration in the transduced muscles of orally-tolerized mice (Figure 2f and j-l).

Regarding the mechanism, we evaluated the potential role of Foxp3<sup>+</sup> Tregs in the induction/maintenance of tolerance in our model. Using a robust protocol that we developed to deplete and inactivate Foxp3<sup>+</sup> Tregs, we showed that their depletion/inactivation at the end of the oral-tolerization phase was not sufficient to abrogate orally-induced tolerance and to restore cellular and humoral immune responses (Supplementary Figure S4). This suggests, at best, a minor role of these cells in our model. However, the role of other described subsets of regulatory T cells cannot be excluded. Among the subset that have been previously implicated in oral tolerance, we analyzed the proportion of CD4<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tr1 cells.<sup>44</sup> Indeed, this subset is known to secrete IL-10, a well-known immunoregulatory cytokine, and has been previously involved in the induction of oral tolerance.<sup>45</sup> Our results did not reveal substantial difference in the percentages of CD4<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> found in the mesenteric lymph nodes of tolerized animals as compared to control mice nor in their levels of LAG-3 expression (Supplementary Figure S3 and data not shown). Yet, further functional investigations, as well as the study of their antigen-specificity, and their numbers in lamina propria or Peyer's patches would be required to formally exclude their implication in our model. T<sub>H</sub>3 cells, characterized by their CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> phenotype and by the production of TGF- $\beta$ , represent another regulatory T-cell subset that has been associated with oral tolerance. Indeed, T<sub>H</sub>3 cells have been previously demonstrated to be elicited upon oral administration of myelin basic protein and to prevent the development of autoimmune encephalomyelitis in a mouse model.<sup>46</sup> As we did not specifically study this subset, their role cannot be excluded in our model. This may possibly be of importance as immunoregulatory cytokines akin to IL-10 and/or TGF- $\beta$  produced by Tr1 and T<sub>H</sub>3 subsets are known to considerably affect the differentiation, survival, and functions of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells.

Even if the precise mechanism involved in the regulation of the CD4<sup>+</sup>T-cell compartment still remains to be precisely studied, we provide herein interesting data on the mechanisms involved in the regulation of CD8<sup>+</sup> T cells compartment by oral tolerization. We show here that adoptively transferred antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells gradually acquired high levels of PD-1 expression as they proliferated following initial encounter with the orally-derived antigen in MLNs (Figure 4e,f). Abortive T cells proliferation prior to tolerization has already been documented following oral-tolerization.<sup>47,48</sup> We further followed the fate of Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells upon Ova re-encounter in the context of gene therapy. We then showed that Ova-specific CD8<sup>+</sup> T which expanded

significantly in tolerized animals during the 7 days of Ova-feeding (Figures 4e,f and 5c at day 0), declined rapidly after injection of AAV-Ova while they expanded dramatically in control animals (Figure 5). Hence, CD8<sup>+</sup> T cells that have encountered orally-derived antigen during the tolerization phase are not only incapable to respond to the same antigen in the context of AAV-mediated gene transfer but are also rapidly induced to die.

The data reported herein provide the first proof-of-principle study indicating that oral-tolerization represents a candidate approach to circumvent the bottleneck of the immune response directed toward the transgenic protein. Interestingly, the protein of interest can be given prophylactically before AAV vector injection in patients who are immunologically naïve to the transgene product, provided that they have never been sensitized by protein replacement therapy. Yet, production of large quantities of proteins that would be compatible with oral administration in humans may represent a challenge. Several production systems and/or method of vectorization can however be envisioned. For instance, transgenic probiotics can be administered orally in mice and humans without any conspicuous effect and can possibly be used to directly deliver proteins of interest in the gastrointestinal tract.<sup>49–51</sup> Beside probiotics, transgenic plants represent an alternative low cost method for the production of proteins suitable for oral ingestion. Bioproduction in comestible plants simplify the production steps, eliminate the need of extensive purification, and allow the production of glycosylated proteins that are structurally and functionally closely related to the native protein.<sup>52,53</sup> Moreover, protein synthesized in plants are naturally bio-encapsulated, ensuring their protection from gastric and proteolytic degradation and facilitate their delivery in the gut where plants are digested by the action of commensal bacteria. In addition, protein of interest can be fused to transmucosal carriers that can facilitate their delivery across intestinal epithelium. Plant-based oral tolerance has been recently illustrated in a murine model of hemophilia where prophylactic oral administration of the transplasmomic plant expressing recombinant factor IX (F.IX) protein fused to the cholera toxin carrier B was demonstrated to inhibit antibodies formation in the context of protein replacement therapy.<sup>54–56</sup> In the same line, the present results further illustrate the efficacy of a prophylactic oral-tolerization protocol in the context of AAV-based gene therapy to promote specific and long-term tolerance to the transgenic protein coded by the vector.

Prevention of immune sensitization, rather than control of already primed immune responses, may arguably be more efficient and may partly explain the limited success of oral-tolerization strategies in autoimmune diseases. Consistently, we showed that oral-tolerization is efficient to prevent primary immune responses elicited by AAV vectors but not secondary/memory immune responses (Figure 6a–d). Interestingly, oral-tolerization was still effective when initiated at the same time as AAV-vectors injections, possibly in relation with the known delay necessary for transgene expression when using single-stranded DNA AAV vectors. We thus believe that the present study pave the way for further investigations in larger animals of prophylactic, rather than interventional, oral-tolerization protocols to prevent immune responses against transgenic proteins and/or against the proteins of the vector. Such oral-tolerization protocol could be used in combination with oral rapamycin and/or low-dose i.v. injection of the protein

of interest, that have been shown to prevent and reverse inhibitory antibodies formation elicited by i.m. injection of AAV-FIX in an animal model of hemophilia.<sup>57</sup> Also, given the recently characterized immunoregulatory properties of probiotics, oral administration of modified probiotics expressing the proteins of interest may further improve oral-tolerization protocols by facilitating the tolerization against multiple proteins at the same time and may thus deserve further investigation in the field of gene therapy.

## MATERIALS AND METHODS

**Mice.** Female C57BL/6Rj (B6) mice were obtained from Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, France). T cell receptor (TCR)-transgenic OT-1 mice, and congenic B6 mice expressing the CD45.1 (Ly5.1) allelic marker were obtained from Charles River Laboratories (Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). [OT-1xLy5.1]F1 mice were used as a source of anti-Ova TCR-transgenic CD8<sup>+</sup> T cells expressing the CD45.1 marker. Mice were housed in a specific pathogen-free barrier facility and were between 8–12 weeks of age at beginning of the experiments.

**Plasmidic constructs, preparation of recombinant AAV vectors and muscle transduction.** The plasmidic construct used for the generation of a recombinant AAV2/1 vector, coding for soluble Ova (AAV-Ova), was kindly provided by Roland W. Herzog.<sup>34,35</sup> Recombinant AAV2/1-Ova vectors were generated using a standard helper-virus free transient transfection method and pseudotyped with AAV1 capsid proteins as described before.<sup>37,38</sup> Genome titers, expressed by equivalent vector genomes (vg), were evaluated by dot-blot hybridization and by quantitative polymerase chain reaction. For muscle transduction, mice hind legs were shaved under anesthesia and titrated amounts of AAV-Ova vectors, (i.e.,  $3.5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^8$ , or  $10^9$  vg) were injected in each gastrocnemius muscles. In some experiments, mice received together with AAV-Ova ( $3.5 \times 10^7$  vg/mice), 10 µg of CpG ODNs 1826 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) to mimic situations where vector administrations are associated with TLRs activation.

**Oral Ova protein administration.** Oral-tolerization was induced by offering to mice, *ad libitum*, for 7 consecutive days, a solution of 1% Ova (Sigma-Aldrich, grade II) dissolved in their drinking water. This solution was freshly prepared each day. In some experiments, variation of this protocol was evaluated consisting of oral administration of the protein only for 5 days, or for 7 days at the reduced concentration of 0.1%. All these protocols similarly resulted in the complete prevention of cellular and humoral immune responses directed against Ova following i.m. injections of AAV-Ova vectors (data not shown).

**Mice immunization.** In some experiments, mice were preimmunized 21 days before oral-tolerization. For that, 100 µg of Ova was emulsified in CFA and s.c. injected in their shaved back. In other experiments, mice were immunized after oral-tolerization with a highly immunogenic vaccine consisting of a live strain of *Listeria monocytogenes* expressing Ova (Lm-Ova), kindly provided by G. Lauvau.<sup>28</sup> For that, mice were injected i.v. with  $10^8$  cfu of titrated Lm-Ova preparations diluted in 100 µl of PBS as described previously.<sup>28,40</sup>

**Tumor model.** Mice injected 14 days before with AAV-Ova, were subcutaneously injected in their shaved flanks with  $10^6$  EL4-Ova (EG-7) tumor cells. Mice were then examined every other days and tumor development was monitored for 31 days using a digital caliper as described previously.<sup>28,40</sup>

**Adoptive T-cell transfer.** Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells were obtained from the spleens of [OT-1 x Ly5.1]F1 mice and purified by magnetic sorting using a CD8 negative isolation kit (Invitrogen, Saint-Aubin, France). More than 93% of the purified cells displayed a CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Vα2<sup>+</sup>Vβ5<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup> phenotype as assessed by flow cytometry. For *in vivo* proliferation assay, cells were stained with 20 µmol/l Cell Proliferation Dye eFluor 450

(eBiosciences, Paris, France) for 10 minutes and  $10^7$  washed cells were then adoptively transferred i.v. into each B6 recipient mice.

**Antibodies and flow cytometry.** Fluorochrome-conjugated antibodies were all obtained from eBioscience except for antibodies to Bd-2, CD24, CD73, CD80, CD86, and IFN $\gamma$  obtained from BD Biosciences (LePort de Claix, France), and anti-Nrp-1 from Biologand (London, UK). Intracellular Foxp3, Helios, Bcl-2, IL-10 staining were done using the Intracellular Fixation & Permeabilization kit (eBiosciences).<sup>39,40</sup> PE-conjugated H-2K<sup>b</sup>/Ova<sub>257-264</sub> dextramers were used to detect CD8<sup>+</sup> T cells that specifically recognize the immunodominant Ova<sub>257-264</sub> peptide using the manufacturer's protocol (Immudex, Copenhagen, Denmark). Single-cell suspensions derived from spleen, lymph nodes, or peripheral blood were analyzed by flow cytometry using a FACSCanto-I or an LSRFortessa (BD Biosciences), and using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

**Enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunosorbent assays.** Quantification of soluble Ova concentration in serum and titration of anti-Ova IgG antibodies were performed by enzyme-linked immunosorbent assay as previously described.<sup>37</sup> Anti-Ova IgG titers were defined as the dilution yielding the half-maximum optical density obtained with a positive control serum that was used throughout the all study. Titers were calculated using sigmoid curve fitting performed in Prism software (Graphpad). Enzyme-linked immunosorbent assays were used to quantify the numbers of Ova-specific CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T cells secreting IFN $\gamma$  upon *in vitro* restimulation as previously described.<sup>37</sup> For that,  $2.5 \times 10^6$  to  $10^7$  splenocytes per well were cultured overnight in RPMI medium in the presence of 10  $\mu$ g/ml Ova<sub>257-264</sub> or Ova<sub>223-239</sub> peptides for detection of, respectively, MHC I or MHC II restricted cellular immune responses, or, with peptides SYNAKSANV, MIPQYGYL, and PQYGYLTL for detection of anti-capsid AAV1 cellular immune responses. Cultures were stopped and treated according to manufacturer's instructions (Diatec, Besançon, France). Number of spots in each well was analyzed with an Enzyme-linked immunosorbent plate reader and dedicated ImmunoSpots software (C.T.L., Bonn, Germany).

**Histology and immunofluorescence microscopy.** Whole gastrocnemius was snap-frozen in isopentane precooled in liquid nitrogen. Transversally cryosectioned slices were either stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological evaluations or prepared for immunofluorescence. Briefly, muscles slices were fixed with 1% paraformaldehyde and incubated with fluorochrome-conjugated anti-mouse CD8 (53-6.7) and anti-CD3 (500A.2) antibodies, obtained from eBiosciences. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Slides were viewed with a Zeiss AxioPlan 2 microscope, and data collected using Zeiss Apotome and Axiovision 4.1 software.

**Quantification of Ova cDNA and mRNA in transduced muscles.** Ova DNA and corresponding Ova mRNA were quantified from transduced muscles by real-time polymerase chain reaction using SYBR green Mastermix (Roche, Meylan, France) in a final volume of 10  $\mu$ l as described previously.<sup>37,38</sup> All quantitative polymerase chain reactions were performed with a LightCycler 480 (Roche). The relative amount of Ova DNA or Ova mRNA were determined using a standard curve obtained after serial dilutions of a plasmidic construct coding for Ova, and normalized for each sample by the amount of Eef2.

**Statistical analysis.** All data are shown as mean values and error bars represent standard error of the mean. Nonparametric tests were used for statistical comparison between experimental groups using one-way analysis of variance (Kruskal-Wallis tests). Unless otherwise stated, all the experiments have been repeated at least three times and illustrations shown here are representative of all experiments. Differences were considered statistically significant when *P* values were less than 0.05 (\*), 0.01 (\*\*), or 0.001 (\*\*\*)). All calculations were performed using the Prism software (Graphpad, La Jolla, CA).

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Figure S1.** Evaluation of oral-tolerization protocols differing in duration and antigen dose.

**Figure S2.** Oral-tolerization inhibits immune responses even in situations where AAV vector administration is associated with concomitant TLR9 activation.

**Figure S3.** Oral-tolerization is not associated with obvious modification of immune cell subsets in mesenteric lymph nodes.

**Figure S4.** Tregs depletion/inactivation is not sufficient to abrogate oral tolerance.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Roland W. Herzog and Grégoire Lauvau for kindly providing the plasmidic construct necessary for the preparation of viral AAV-Ova vector and the Lm-Ova vaccine, respectively. We also thank the flow cytometry facility of the Institute for Research and Innovation in Biomedicine for technical expertise, and Normandy University and INSERM for starting funds and infrastructures. R.H. is recipient of a PhD fellowship from the French Ministry of higher education and research. This work was supported by a grant from the Association Française contre les Myopathies (AFM #15909). R.H., B.C., Y.N., and G.R. performed the experiments; L.D. and L.J. provided expert technical help and animal care; A.S. prepared the AAV vectors; R.H., O.B., and S.A. designed the experiments; R.H. and S.A. analyzed and interpreted the data; R.H., A.S., O.B., and S.A. drafted the manuscript; R.H. and S.A. revised and finalized the manuscript. The authors declare no competing financial interests.

#### REFERENCES

- Wang, L and Herzog, RW (2005). AAV-mediated gene transfer for treatment of hemophilia. *Curr Gene Ther* 5: 349-360.
- Mingozzi, F and High, KA (2011). Therapeutic *in vivo* gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* 12: 341-355.
- Zincarelli, C, Soltys, S, Rengo, G and Rabinowitz, JE (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 16: 1073-1080.
- Peters-Silva, H and Linden, R (2013). Advances in recombinant adeno-associated viral vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther* 13: 335-345.
- Mays, LE and Wilson, JM (2011). The complex and evolving story of T cell activation to AAV vector-encoded transgene products. *Mol Ther* 19: 16-27.
- Maguire, AM, Simonelli, F, Pierce, EA, Rugh, BN Jr, Mingozzi, F, Bennicelli, J et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358: 2240-2248.
- Manno, CS, Pierce, GF, Anuda, VR, Glaser, B, Ragni, M, Rasko, J et al. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 12: 342-347.
- Gaudet, D, Méthot, J, Déry, S, Brisson, D, Essembre, C, Tremblay, G et al. (2013). Efficacy and long-term safety of allipogene tiparvovect (AAV1-LPLSH47X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene Ther* 20: 361-369.
- Mingozzi, F, Maus, MV, Hu, D, Sabatino, DE, Murphy, SL, Rasko, J et al. (2007). CD6(+)-T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* 13: 419-422.
- Nayak, S and Herzog, RW (2010). Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther* 17: 295-304.
- Mingozzi, F and High, KA (2011). Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther* 11: 321-330.
- Manning, WC, Zhou, S, Bland, M P, Escobedo, JA and Dworkin, V (1998). Transient immunosuppression allows transgene expression following readministration of adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* 9: 477-485.
- Fields, PK, Kowalczyk, DW, Anuda, VR, Armstrong, E, McClelland, ML, Hagstrom, JN et al. (2000). Role of vector in activation of T cell subsets in immune responses against the secreted transgene product factor IX. *Mol Ther* 1: 225-235.
- Yusa, K, Yoshimura, M, Urasawa, N, Ohshima, S, Howell, JM, Nakamura, A et al. (2007). Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene Ther* 14: 1249-1260.
- Gao, G, Wang, Q, Calcedo, R, Wags, L, Bell, P, Wang, L et al. (2009). Adeno-associated virus-mediated gene transfer to nonhuman primate liver can elicit destructive transgene-specific T cell responses. *Hum Gene Ther* 20: 930-942.
- Wang, L, Dobrzynski, E, Schachterman, A, Cao, O and Herzog, RW (2005). Systemic protein delivery by muscle-gene transfer is limited by a local immune response. *Blood* 105: 4226-4234.
- Wang, Z, Tapscott, SJ, Chamberlain, JS and Storb, R (2011). Immunity and AAV-Mediated Gene Therapy for Muscular Dystrophies in Large Animal Models and Human Trials. *Front Microbiol* 2: 201.
- Ferreira, V, Twisk, J, Kwilkers, K, Aronica, E, Brisson, D, Methot, J et al. (2014). Immune responses to intramuscular administration of allipogene tiparvovect (AAV1-LR(SH47X)) in a phase II clinical trial of lipoprotein lipase deficiency gene therapy. *Hum Gene Ther* 25: 180-188.
- Wang, L, Cao, O, Swalm, B, Dobrzynski, E, Mingozzi, F and Herzog, RW (2005). Major role of local immune responses in antibody formation to factor IX in AAV gene transfer. *Gene Ther* 12: 1453-1464.

20. Manno, CS, Chew, AJ, Hutchison, S, Larson, PJ, Herzog, RW, Arruda, VR *et al.* (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* **101**: 2963-2972.
21. Ferreira, V, Patry, H and Salimon, F (2014). Immune Responses to AAV-Vectors, the Glycra Example from Bench to Bedside. *Front Immunol* **5**: 62.
22. Mingozzi, F and High, KA (2013). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* **122**: 23-36.
23. Nathwani, AC, Tuddenham, EG, Rangarajan, S, Rosales, C, McIntosh, J, Lynch, DC *et al.* (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* **365**: 2357-2365.
24. Nathwani, AC, Reiss, UM, Tuddenham, EG, Rosales, C, Chowdhury, P, McIntosh, J *et al.* (2014). Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* **371**: 1994-2004.
25. Coombes, JL, Siddiqui, KR, Arancibia-Carcamo, CV, Hall, J, Sun, CM, Bekkaid, Y *et al.* (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* **204**: 1757-1764.
26. Schulz, O, Jaenson, E, Persson, BK, Liu, X, Wörbs, T, Agace, WW *et al.* (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med* **206**: 3101-3114.
27. Weiner, HL, da Cunha, AP, Quintana, F and Wu, H (2011). Oral tolerance. *Immunity* **34**: 241-259.
28. Groux, H, O'Garra, A, Bigler, M, Rouleau, M, Antonenko, S, de Vries, JE *et al.* (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**: 737-742.
29. Blibourough, J, George, TC, Norment, A and Viney, J (2003). Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* **108**: 481-492.
30. Goubier, A, Dubois, B, Gheit, H, Bubert, G, Villard-Truc, F, Asselin-Paturel, C *et al.* (2008). Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* **29**: 464-475.
31. Chen, Y, Inobe, J, Marks, R, Gonnella, P, Kuchroo, VK and Weiner, HL (1995). Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* **376**: 177-180.
32. Friedman, A and Weiner, HL (1994). Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6688-6692.
33. Zhang, X, Izikson, L, Liu, L and Weiner, HL (2001). Activation of CD25(+)-CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* **167**: 4245-4253.
34. Wherrett, DK, Bundy, B, Becker, DJ, DiMeglio, LA, Gitelman, SE, Goland, R *et al.*; Type 1 Diabetes TrialNet GAD Study Group. (2011). Antigen-based therapy with glutamic acid decarboxylase (GAD) vaccine in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised double-blind trial. *Lancet* **378**: 319-327.
35. Dello Iacono, I, Tripodi, S, Calvani, M, Panetta, V, Verga, MC and Miceli Sopo, S (2013). Specific oral tolerance induction with raw hen's egg in children with very severe egg allergy: a randomized controlled trial. *Pediatr Allergy Immunol* **24**: 66-74.
36. Chung, Y, Chang, SY and Kang, CY (1999). Kinetic analysis of oral tolerance: memory lymphocytes are refractory to oral tolerance. *J Immunol* **163**: 3692-3696.
37. Adinouch, S, Franck, E, Drouot, L, Bonneau, C, Jolinnon, N, Salvetti, A *et al.* (2011). Improved Immunological Tolerance Following Combination Therapy with CTLA-4/Ig and AAV-Mediated PD-L1/2 Muscle Gene Transfer. *Front Microbiol* **2**: 199.
38. Franck, E, Bonneau, C, Jan, L, Henry, P, Lacoume, Y, Salvetti, A *et al.* (2012). Immunological tolerance to muscle autoantigens involves peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells. *PLoS One* **7**: e36444.
39. Dobrzynski, E, Mingozzi, F, Liu, YL, Bendo, E, Cao, O, Wang, L *et al.* (2004). Induction of antigen-specific CD4+ T-cell anergy and deletion by *in vivo* viral gene transfer. *Blood* **104**: 969-977.
40. Hubert, S, Rissek, B, Klages, K, Huehn, J, Sparwasser, T, Haag, F *et al.* (2010). Extracellular NAD+ shapes the Foxp3+ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *J Exp Med* **207**: 2561-2568.
41. Resta, R, Yamashita, Y and Thompson, LF (1996). Ecb-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunity* **161**: 95-109.
42. Parish, IA, Rao, S, Smyth, GK, Jelich, T, Denyer, GS, Davey, GM *et al.* (2009). The molecular signature of CD8+ T cells undergoing deletion tolerance. *Blood* **113**: 4575-4585.
43. Manning, WC, Pallard, X, Zhou, S, Pat Bland, M, Lee, AY, Hong, K *et al.* (1997). Genetic immunization with adeno-associated virus vectors expressing herpes simplex virus type 2 glycoproteins B and D. *J Virol* **71**: 7960-7962.
44. Gagliani, N, Magnani, CF, Huber, S, Gianolini, M, Pala, M, Ucciani-Limon, P *et al.* (2013). Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med* **19**: 739-746.
45. Tsuji, NM, Mizumachi, K and Kutsak, J (2001). Interleukin-10-secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. *Immunology* **103**: 458-464.
46. Chen, Y, Inobe, J, Kuchroo, VK, Baron, J, Jenevay, CA Jr and Weiner, HL (1996). Oral tolerance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice: suppression of autoimmune encephalomyelitis and dose-dependent induction of regulatory cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 388-391.
47. Castro-Junior, AB, Horta, BC, Gomes-Santos, AC, Cunha, AP, Silva Steinberg, R, Nascimento, DS *et al.* (2012). Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity. *Cel Immunol* **280**: 171-181.
48. Sun, J, Dirden-Kramer, B, Ito, K, Ernst, PB and Van Houten, N (1999). Antigen-specific T cell activation and proliferation during oral tolerance induction. *J Immunol* **162**: 5868-5875.
49. Robert, S, Gysemans, C, Takishii, T, Korff, H, Spagnuolo, I, Sebastiani, G *et al.* (2014). Oral delivery of glutamic acid decarboxylase (GAD)-65 and IL10 by *Lactococcus lactis* reverses diabetes in recent-onset NOD mice. *Diabetes* **63**: 2876-2887.
50. Takishii, T, Korff, H, Van Belle, TL, Robert, S, Grieco, FA, Caluwaerts, S *et al.* (2012). Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified *Lactococcus lactis* in mice. *J Clin Invest* **122**: 1717-1725.
51. Rottiers, P, De Smet, T and Steidler, L (2009). Modulation of gut-associated lymphoid tissue functions with genetically modified *Lactococcus lactis*. *Trends Immunol* **28**: 465-486.
52. Wang, X, Sherman, A, Liao, G, Leong, KW, Daniell, H, Terhorst, C *et al.* (2013). Mechanism of oral tolerance induction to therapeutic proteins. *Adv Drug Deliv Rev* **65**: 759-773.
53. Kwon, KC, Verma, D, Singh, ND, Herzog, R and Daniell, H (2013). Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells. *Adv Drug Deliv Rev* **65**: 782-799.
54. Verma, D, Mughimi, B, LoDuca, RA, Singh, HD, Hoffman, BE, Herzog, RW *et al.* (2010). Oral delivery of bioencapsulated coagulation factor IX prevents inhibitor formation and fatal anaphylaxis in hemophilia B mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 7101-7106.
55. Sherman, A, Su, J, Lin, S, Wang, X, Herzog, RW and Daniell, H (2014). Suppression of inhibitor formation against FVIII in a murine model of hemophilia A by oral delivery of antigens bioencapsulated in plant cells. *Blood* **124**: 1659-1668.
56. Wang, X, Su, J, Sherman, A, Rogers, GL, Liao, G, Hoffman, BE *et al.* (2015). Plant-based oral tolerance to hemophilia therapy employs a complex immune regulatory response including LAP+CD4+ T cells. *Blood* **125**: 2418-2427.
57. Nayak, S, Sarker, D, Perin, GQ, Mughimi, B, Hoffman, BE, Zhou, S *et al.* (2011). Prevention and Reversal of Antibody Responses Against Factor IX in Gene Therapy for Hemophilia B. *Front Microbiol* **2**: 244.
58. Lauvaai, G, Vijh, S, Kong, P, Hong, T, Kerkselek, K, Serbina, N *et al.* (2001). Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine. *Science* **294**: 1735-1739.

**Vector uncoating limits adeno-associated viral vector-mediated transduction of human dendritic cells and vector immunogenicity**

Axel Rossi<sup>1,2†</sup>, **Léa Dupaty**<sup>3‡</sup>, Ludovic Aillot<sup>1,‡,‡</sup>, Liang Zhang<sup>4,‡</sup>, Célia Gallien<sup>1</sup>, Michael Hallek<sup>5</sup>, Margarete Odenthal<sup>6</sup>, Sahil Adriouch<sup>3\*</sup>, Anna Salvetti<sup>1,‡\*</sup>, Hildegard Büning<sup>2,4,7\*</sup>

<sup>1</sup>International Center for Research in Infectiology, INSERM U1111 – Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon, Lyon, France

<sup>2</sup>Institute of Experimental Hematology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

<sup>3</sup>Normandie Université, UNIROUEN, INSERM, U1234, Physiopathologie, Autoimmunité, maladies Neuromusculaires et Thérapies Régénératrices, Rouen, France

<sup>4</sup>Center for Molecular Medicine Cologne, University of Cologne, Cologne, Germany

<sup>5</sup>Clinic I of Internal Medicine, University Hospital Cologne, Cologne, Germany

<sup>6</sup>Institute of Pathology, University Hospital Cologne, Cologne, Germany

<sup>7</sup>German Center for Infection Research, partner site Hannover-Braunschweig

<sup>#</sup>Current Address: Cancer Research Center of Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR5206, Lyon, France

<sup>†</sup>Co-corresponding authors

[buening.hildegard@mh-hannover.de](mailto:buening.hildegard@mh-hannover.de)

[anna.salvetti@inserm.fr](mailto:anna.salvetti@inserm.fr)

[sahil.adriouch@univ-rouen.fr](mailto:sahil.adriouch@univ-rouen.fr)

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>‡</sup>These authors contributed equally to this work

Papier en cours de révision.

**12 Abstract**

13 AAV vectors poorly transduce Dendritic cells (DC), a feature invoked to explain AAV's low  
14 immunogenicity. However, the reason for this non-permissiveness remained elusive. Here, we performed an  
15 in-depth analysis using human monocyte-derived immature DC (iDC) as model. iDC internalized AAV  
16 vectors of various serotypes, but even the most efficient serotype failed to transduce iDC above background.  
17 Since AAV vectors reached the cell nucleus, we hypothesized that AAV's intracellular processing occurs  
18 suboptimal. On this basis, we screened an AAV peptide display library for capsid variants more suitable for  
19 DC transduction and identified the I/VSS family which transduced DC with efficiencies of up to 38%. This  
20 property correlated with an improved vector uncoating. To determine the consequence of this novel feature  
21 for AAV's *in vivo* performance, we engineered one of the lead candidates to express a cytoplasmic form of  
22 ovalbumin, a highly immunogenic model antigen, and assayed transduction efficiency as well as  
23 immunogenicity. The capsid variant clearly outperformed the parental serotype in muscle transduction and  
24 in inducing antigen-specific humoral and T cell responses. Hence, vector uncoating represents a major barrier  
25 hampering AAV vector-mediated transduction of DC and may impact on its use as vaccine platform.

## 26 **Introduction**

27 Adeno-associated viral (AAV) vectors have become standard tools for *in vivo* gene transfer <sup>1</sup>. They are  
28 composed of a single-stranded (ss) DNA genome packaged within an icosahedral capsid of 20-25 nm in  
29 diameter <sup>1</sup>. The 60 viral protein (VP) monomers that assemble into the mature capsid are encoded by a single  
30 viral open reading frame (ORF), the *cap* ORF. The two minor VP proteins, VP1 (90 kDa) and VP2 (72 kDa),  
31 are N-terminal extensions of the major capsid protein VP3 (60 kDa) but harbor distinct functional domains  
32 <sup>2,3</sup>. The common VP3 region - shared by all capsid proteins - forms the basic capsid structure with protrusions  
33 at the 3-fold and pores at the 5-fold axis of symmetry <sup>4</sup>. To date, at least 12 AAV serotypes have been isolated  
34 from human and non-human primate tissues <sup>1</sup>, which mainly differ in the so-called hypervariable regions of  
35 the protrusions <sup>4-11</sup>. These changes in amino acid sequence translate into the serotype-specific tropism that  
36 make AAV broadly applicable for gene therapy.

37 As suggested by pre-clinical *in vivo* studies and now confirmed in human clinical trials, AAV vectors mediate  
38 long-term transgene expression in post-mitotic or slowly dividing cells. A critical factor in this regard are  
39 unique immunological properties of AAV <sup>12</sup>. More precisely, innate immune responses are only induced at  
40 high particle-per-cell ratios and are less pronounced compared to other viral vectors and short-lived <sup>12,13</sup>.  
41 Antibodies against the capsid are readily induced upon vector application, and AAV vectors are efficient as  
42 vaccines to induce antigen-specific humoral immune responses <sup>14</sup>. However, antigen-specific CD8<sup>+</sup> T-cell  
43 responses appear to be impaired both in intensity and functionality as shown in several mouse and non-human  
44 primates models <sup>14</sup>. The latter is a clear advantage for a vector used in gene therapy where induction of  
45 transgene-specific T-cell responses results in loss of vector-modified cells <sup>15</sup>.

46 Generally, T-cell responses are initiated through the capture, processing and presentation of antigens by  
47 antigen-presenting cells (APC), and in particular by DC <sup>16-18</sup>. In their immature state, DC are specialized to  
48 sense cellular stress, and to detect and engulf pathogens as well as soluble or particulate antigens <sup>18</sup>. DC are  
49 rich in pattern recognition receptors (PRR), which, upon pathogen-encounter, induce cell autonomous innate  
50 immune signaling leading to cytokine and chemokine secretion, upregulation of adhesion and co-stimulatory  
51 molecules, and antigen processing and presentation to CD4<sup>+</sup> T cells in the context of major histocompatibility  
52 complex (MHC) class II molecules. In addition, DC can activate CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells via MHC class I

53 presentation. The latter route, which is commonly reserved to intracellular antigens, has evolved through a  
54 mechanism termed cross-presentation to enable presentation of endocytosed antigens to CD8<sup>+</sup> T cells. The  
55 PRR-induced DC maturation also leads to profound structural and functional reorganization of DC, including  
56 changes in uptake routes and profound modifications of the endosomal compartment, including decreased  
57 intraluminal pH and increased protease activity <sup>16,19</sup>.

58 Due to the key function of DC in inducing and shaping adaptive immune responses, the DC-AAV interaction  
59 determines vector and transgene-product immunogenicity with a major impact on long-term transgene  
60 expression when AAV are used in gene therapy and, conversely, on vaccination efficiency when used as  
61 vaccines <sup>14,20</sup>. However, the DC-AAV interaction itself is still poorly characterized. Therefore, we aimed  
62 here to study early steps of this interaction and to identify barriers that limit transduction using monocyte-  
63 derived immature DC (iDC) as a model system. These analyses revealed that AAV particles are internalized  
64 into DC, and that a significant fraction of these particles is also found in the nucleus, suggesting that AAV  
65 processing rather than entry or intracellular transport represents the limiting step in transduction. By *in vitro*  
66 high-throughput selection screening of our AAV2 peptide display library on iDC we identified a family of  
67 capsid variants (I/VSS group) that showed improved transduction of human DC. This property correlated  
68 with improved uncoating capacity as compared to the parental serotype. Interestingly, DC maturation  
69 considerably influenced the level of transduction, a finding in line with the assumption that efficacy of  
70 intracellular processing defines the efficiency of DC transduction by AAV. *In vivo* assays of the AAV capsid  
71 variant VSSTSPR, our lead candidate, in an immunogenic transgene model revealed superior transduction  
72 efficacy as compared to the parental serotype. In addition, the VSSTSPR variant induced robust antigen-  
73 specific antibody and T cell immune responses. Hence, inefficient intracellular processing of AAV particles  
74 and, consequently, inefficient vector uncoating are barriers that limit AAV vector-mediated transduction of  
75 DC. Such barriers, however, can be overcome by capsid modifications, such as those selected for the  
76 VSSTSPR variant, which significantly improved transgene expression levels and help advance this promising  
77 vector system for novel applications.

78 Results

79 **AAV vectors are efficiently internalized, but do not transduce human DC**

80 Several studies, including ours (Supplementary Fig. S1), indicated inefficient transduction of human DC with  
81 AAV even when using vectors at high particle-per-cell ratios (GOI) with a self-complementary vector  
82 genome conformation that bypass the need for DNA second-strand synthesis <sup>21</sup>. Aiming to decipher the  
83 determinants of this non-permissiveness, we first compared a set of AAV serotypes regarding their cell entry  
84 efficiency. Therefore, we incubated iDC with equal amounts of indicated serotype vectors and quantified the  
85 number of intracellular vector genomes by qPCR (Fig. 1a).

86 All AAV serotypes were internalized, albeit with remarkable differences in efficiency. Cell entry was most  
87 efficient for AAV2 followed by AAV1 and AAV9. For the most efficient serotype, AAV2, we then  
88 determined the presence and quantity of AAV vectors in the cytosolic, membrane and nuclear fraction of  
89 iDC at 24 and 48 hrs p.i. (Supplementary Fig. S2). For both time points, highest vector genome numbers  
90 were measured in the membrane fraction, which also contains endosomes. While at 24 hrs p.i. slightly more  
91 vector genomes were detected in the cytosolic compared to the nuclear fraction, the opposite was seen at 48  
92 hrs p.i. Interestingly, however, at both time points substantial amounts of AAV vector genomes were present  
93 in the nuclear fraction. To confirm this result by an independent method, we analyzed AAV2-transduced iDC  
94 by confocal microscopy (Fig. 1b). Our staining strategy did not allow to distinguish between cytosol and  
95 vesicles. Nevertheless, as shown in the representative image, the majority of AAV particles were found in  
96 the cytoplasm in discrete foci, suggesting an association with the vesicular system, which is in line with our  
97 qPCR-based analyses. Of particular importance, the microscopic analyses also confirmed the presence of  
98 AAV in the nucleus. Altogether, the results points toward a post-entry processing step that occurs suboptimal  
99 and therefore limits DC transduction.

100 **High-throughput selection of AAV peptide display library on iDC strongly selects for**  
101 **heparan sulfate proteoglycan-binding capsid variants**

102 Since the capsid is the main target of the intracellular processing of AAV particles, we performed an AAV  
103 peptide display library-based screening on iDC to select for better suited AAV capsid variants. The results  
104 of our serotype comparison (Fig. 1a) led us to choose AAV2 for the library backbone. Our library consists  
105 of capsid mutants displaying 7mer random peptides at position 587 of the *cap* ORF <sup>22</sup>. Peptide insertion at

106 this position destroys the natural AAV2 heparan sulfate proteoglycan (HSPG) binding epitope, which is  
107 responsible for primary receptor binding<sup>23-25</sup>. In addition, we preselected our library by heparin affinity  
108 chromatography to enrich the library for variants displaying non-HSPG binding peptides<sup>26</sup> and thus infect  
109 target cells through a novel, HSPG-independent pathway. Furthermore, we applied stringent selection  
110 conditions for our two selection rounds: i) usage of iDC from different donors, ii) short incubation time (6  
111 hrs), and iii) recovery of viral genomes from the nuclear compartment (Supplementary Figs. S3a and S3b).  
112 DNA isolated following the nuclear fraction was analyzed by next generation sequencing (NGS) to identify  
113 and quantify the variants that accumulated in iDC (Fig. 2a).

114 Phylogenetic analysis of the top variants, *i.e.* those that most strongly accumulated in the nuclear fraction of  
115 iDC, indicated that they could be classified into two families, “NNP” and “I/VSS”, with NNPLPQR as the  
116 strongest representative of the first, and VSSTSPR and ISSSTAR as lead candidates for the second (Fig. 2b).  
117 Of interest, although our library was pre-selected against HSPG-binding variants, all of the most frequently  
118 identified variants contained an arginine at peptide position 7, a characteristic feature of HSPG-binding  
119 capsids<sup>25,27</sup>. Based on this finding, we repeated the high-throughput screen on iDC, this time in the presence  
120 of heparin, a soluble analogue of HSPG. In addition, we reduced the incubation from 6 to 4 hrs  
121 (Supplementary Fig. S3b). Again, we observed a strong selection of variants displaying peptides belonging  
122 to the same two groups (Supplementary Fig. S3c). However, in the second screen, *i.e.* in the presence of  
123 heparin, in addition to members of the “NNP” or “I/VSS” families, motifs LPSRPSL and NSARPNS were  
124 also selected as top candidates. These peptides do not share the preference for “R” in position 7, but still  
125 possess an overall positive charge, a feature that in previous studies could be correlated with an HSPG  
126 binding phenotype<sup>25,27</sup>.

127 Since the two independent AAV peptide display screenings revealed a strong selection of variants belonging  
128 to the “NNP” or “I/VSS” family, we decided to focus on NNPLPQR, which was the most strongly selected  
129 motif in both screens, and ISSSTAR and VSSTSPR as prominent representatives of the “I/VSS” group. We  
130 produced the candidates as viral vectors encoding for GFP in a self-complementary genome conformation  
131 and named them according to the peptide insert (*e.g.* VSSTSPR: AAV with VSSTSPR insertion at position  
132 587 of the *cap* ORF). All three variants were produced with yields and infectivity ratios comparable to the

133 parental serotype (Supplementary Tables S1 and S2). In addition, we verified HSPG-dependency for cell  
134 transduction by a heparin competition assay on HeLa cells (Supplementary Fig. S3d).

### 135 **The maturation process of human DC strongly modulates AAV transduction** 136 **efficiency**

137 We then focused on DC, our target cells, and compared our newly selected variants to the parental serotype.  
138 Since maturation of the capsid requires endosomal acidification and protease activity<sup>2,3,27</sup> and since, in  
139 contrast to many other cell types, endosomal pH and proteolytic activity change with the state of DC  
140 maturation<sup>28</sup>, we tested iDC as well as more mature DC. Specifically, we incubated vectors with either iDC,  
141 or DC treated with lipopolysaccharide (LPS), a strong inducer of DC maturation, following two different  
142 protocols (Fig. 3a): either 24 hrs before incubation with the vectors (named here mDC for fully mature DC),  
143 or 2 hrs after vector addition (named here mDCpi for maturation post-infection). The effect of LPS on DC  
144 maturation was confirmed by immunofluorescence using high level of HLA-DR externalization as marker  
145 (Supplementary Fig. S4a).

146 Remarkably, the highest transduction efficiencies for all vectors were obtained with mDCpi and ranged  
147 between  $25.7 \pm 13.5\%$  GFP<sup>+</sup> DC for VSSTSPR and  $2.9 \pm 1.5\%$  for AAV2 (Fig. 3b). This result strongly  
148 indicates that the maturation state influences DC permissivity to AAV transduction. Regardless of DC  
149 maturation state, however, highest transduction efficiencies were obtained with VSSTSPR and ISSSTAR,  
150 the two variants belonging to the same group, and these were at least 10-fold more efficient than AAV2 (Fig.  
151 3b, upper-right inset). We confirmed this improvement in transduction by fluorescence microscopy of vector-  
152 treated iDC using VSSTSPR as an example (Supplementary Fig. S4b). In contrast, the NNPLPQR variant  
153 that was selected with the highest frequency (and despite being highly infectious on HeLa cells,  
154 Supplementary Fig. S3d and Supplementary Table S2) did not show significant improvement when compared  
155 to AAV2.

156 In order to exclude that differences in entry efficiency and/or intracellular distribution rather than the assumed  
157 endosomal maturation and intracellular processing were responsible for the enhanced transduction, we next  
158 compared distinct steps of the infection path of VSSTSPR, one of the two best performers, and of AAV2 as  
159 our reference in iDC and mDCpi.

160 Firstly, we determined whether binding to HSPG is required for mDCpi transduction through a heparin  
161 competition experiment. As indicated in Fig. 4a, transduction of mDCpi with VSSTSPR and AAV2 was  
162 impaired in the presence of heparin, again confirming the importance of HSPG for DC transduction. Next,  
163 we compared immature and mature DC with regard to vector entry (Fig. 4b). For this, we incubated iDC and  
164 mDCpi with VSSTSPR and AAV2, respectively, at a GOI of  $10^4$ . As before, membrane-bound particles were  
165 removed, and vector genomes were quantified by qPCR. As indicated in Fig. 4b, iDC and mDCpi contained  
166 comparable amounts of vector genomes for both vectors, thus excluding preferential vector internalization  
167 as a possible reason for improved performance of both vectors in mDCpi compared to iDC, or of VSSTSPR  
168 compared to AAV2. Since DC maturation leads to profound structural reorganization of the endosomal  
169 compartment in addition to changes in the endosomal pH and activity of endosomal proteases <sup>16,19</sup>, we next  
170 compared the intracellular distribution of VSSTSPR and AAV2 in iDC and mDCpi (Fig. 4c). Again, we did  
171 not observe any differences, irrespective of the stage of DC maturation. However, the level of vector genomes  
172 in the nucleus tended to be higher in mDCpi than in iDC.

173 In summary, these results indicated that the maturation status of human DC strongly influences transduction  
174 efficiency of AAV2 and of our selected capsid variants. For the latter, display of the I/VSS group peptides  
175 mediated significantly higher levels of transduction at all DC maturation stages tested here, arguing that these  
176 capsids have gained novel features.

### 177 **The I/VSS insertion affects capsid stability and improves vector uncoating in human DC**

178 Since AAV2 and VSSTSPR were present in the nuclear fraction at comparable levels (Fig. 4c) but differed  
179 significantly with regard to DC transduction (Figs. 3b and 4a), we hypothesized that they might differ in their  
180 uncoating efficiency, *i.e.* the efficiency of vector genome release from the capsid.

181 To evaluate this step, we developed an assay based on the ability of AAV genomes to form circular molecules  
182 (episomes) in the nucleus of the infected cell. The episomal form of the AAV DNA is very stable and cannot  
183 be degraded by exonucleases <sup>29</sup>. Therefore, the detection of AAV genomes following nuclease treatment can  
184 be used to indirectly measure the level of genome uncoating. For these analyses, we used the T5 exonuclease,  
185 which demonstrated a higher selectivity than plasmid-Safe<sup>TM</sup> exonuclease for episomal DNA detection in  
186 related viral models <sup>30</sup>. Since HeLa cells are highly permissive for AAV2 and should therefore contain a

187 detectable number of free vector genomes, these cells were chosen for comparison to iDC for development  
188 of this assay. Cells were first incubated with AAV2 at a GOI of  $10^4$ , followed by total DNA extraction at 9  
189 hrs p.i. Half of the DNA was treated with T5 exonuclease, while the remaining half was left untreated.  
190 Subsequently, the amount of vector genomes was quantified by qPCR. At this time point, the percentage of  
191 AAV2 episomal DNA was at least 10-fold higher in HeLa cells compared to iDC (Fig. 5a), a result that  
192 correlates with respective transduction efficiencies (Fig. 5b). We then used this indirect assay to compare the  
193 uncoating efficiencies of VSSTSPR and AAV2 in iDC and mDCpi at 24 and 48 hrs p.i. The entry and the  
194 transduction efficiency were also monitored in parallel (Supplementary Fig. S5). These analyses indicated  
195 the presence of higher amounts of episomes in iDC and mDCpi transduced with VSSTSPR compared to  
196 AAV2 at 24 hrs p.i. (Fig. 5c). The difference in episomal DNA between VSSTSPR and AAV2 was also  
197 apparent at 48 hrs p.i. in mDCpi (Fig. 5d). Importantly, analysis of entry efficiencies again confirmed that  
198 these differences are not due to an increased level of vector uptake (Supplementary Figs. S5a and S5c).  
199 Furthermore, results correlated with the amount of GFP<sup>+</sup> cells measured at both time points (Supplementary  
200 Figs. S5b and S5d).

201 The mechanism underlying the AAV uncoating process is still unknown. However, capsid stability is likely  
202 to impact uncoating efficiency<sup>31,32</sup>. Accordingly, our recent analysis of AAV physical properties by Atomic  
203 Force microscopy suggests that genome release can occur via two alternative pathways: either the capsid  
204 remains intact and ssDNA molecules are ejected, or the capsid is disassembled, leaving ssDNA in a compact  
205 entangled conformation<sup>33</sup>. To investigate whether VSSTSPR and AAV2 differ in this regard, we performed  
206 a destabilization assay.

207 In brief, we subjected AAV particles to increasing temperatures at neutral (7.2) and acidic (5.2) pH followed  
208 by native dot blotting using A20 and B1 antibodies for detection of intact, *i.e.* assembled, and disassembled  
209 capsids, respectively (Fig. 6a). Interestingly, for both VSSTSPR and AAV2, capsids demonstrated a higher  
210 resistance to temperature in acidic compared to neutral conditions. Specifically, a significant number of the  
211 AAV2 particles were still intact at 75°C and pH 5.2, while disassembled capsids were detectable at pH 7.2  
212 already at 65°C. The same trend was observed for VSSTSPR, however, at lower temperature. To determine  
213 whether the measured lower capsid stability is a unique feature for VSSTSPR, shared between the I/VSS

214 family members, or a general property of capsids modified by peptide insertion at 587, we included ISSSTAR  
215 and NNPLPQR in a follow-up experiment and used the LightCycler® apparatus to generate a temperature  
216 gradient to further increase the sensitivity of the assay (Fig. 6b). Again, the AAV2 capsid showed the highest  
217 resistance towards temperature, with most of the AAV2 particles still intact at 63°C. In contrast, no detectable  
218 A20 signal was observed for VSSTSPR or ISSSTAR capsid variants at the same temperature. Based on the  
219 absence of detectable A20 and the strong B1 signals, it is conceivable to assume that capsids of the I/VSS  
220 group were already completely disassembled at this temperature, interestingly with similar A20/B1 patterns.  
221 In contrast, NNPLPQR showed a strikingly different pattern. Specifically, most of the NNPLPQR capsids  
222 lost the A20 signal at 51°C, but were still not recognized by B1, a pattern that argues for a higher flexibility  
223 rather than complete denaturation of the capsid.

224 Altogether, these results indicated that insertion of peptides at position 587 affects the physical parameters  
225 of the capsid. In case of the I/VSSS/T sequences, the capsid stability is reduced, which appears to favor  
226 genome uncoating and human DC transduction.

#### 227 **Intra-muscular injection of VSSTSPR in mice improves transgene expression and increases immune** 228 **responses**

229 In order to investigate the impact of our capsid modifications on AAV performance *in vivo*, a comparative  
230 study between VSSTSPR and AAV2 was performed. For this, we used vectors encoding for the cytoplasmic  
231 form of ovalbumin (cOVA), an intracellular model antigen that offers the possibility to readily monitor AAV-  
232 induced immune responses<sup>34,35</sup>. We injected mice intra-muscularly with  $3 \times 10^9$  particles of VSSTSPR or  
233 AAV2 and quantified the level of transgene expression and of Ova-specific immune responses at day 7, 14  
234 or 21 p.i. (Fig. 7).

235 Remarkably, quantification of transgene expression at day 7, which corresponds to an early time point when  
236 immune responses are still barely detectable, showed 6- to 10-fold higher transgene expression when  
237 VSSTSPR was used as the delivery tool (Fig. 7a, right panel). Quantification of the amount of transgene at  
238 the DNA level confirmed that similar doses of VSSTSPR vector particles, if not lower, had been injected  
239 (Fig. 7a, left panel), suggesting an improved infectivity.

240 We next evaluated the levels of immune responses induced upon intramuscular injection of these vectors.  
241 We first assessed the percentages of Ova-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in blood and spleen 21 days post-  
242 vector delivery using flow cytometry (Fig. 7b). In the group injected with the VSSTSPR, we observed that a  
243 large fraction of CD8<sup>+</sup> cells in the blood were directed against the Ova<sub>257-264</sub> immunodominant peptide  
244 (10.3% in VSSTPR group vs 2.8% in the control group, p=0.0056, n=5). Phenotypically, Ova-specific T cells  
245 were all contained in the fraction corresponding to activated or memory CD8<sup>+</sup> cells expressing high levels of  
246 CD44 cell surface marker. For comparison, in the control group injected with the AAV2, the percentages of  
247 anti-Ova CD8<sup>+</sup> T cells in spleen and blood compartments were at least 3-fold lower. We also monitored the  
248 humoral immune responses in these mice by measuring the presence of anti-Ova IgG by ELISA. Results  
249 confirmed significant increased levels of anti-Ova IgG in the sera of mice injected with VSSTSPR (Fig. 7c).  
250 As production of IgG requires activation of CD4<sup>+</sup> helper T cells, this suggested that anti-Ova CD4<sup>+</sup> T cells  
251 were also increased in this group. To directly evaluate this possibility, we estimated the levels of splenic T  
252 cells responding to MHC class I and MHC class II restricted immunodominant Ova peptides using ELISpot  
253 assays. In line, significant higher numbers of T cells from the VSSTSPR group secreted IFN $\gamma$  when incubated  
254 *in vitro* with either one of these peptides (Fig. 7d). Thus, higher levels of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> immune responses  
255 were induced in the group injected with the VSSTSPR capsid variant. These findings were consistent with  
256 the progressive decline of *Ova* mRNA observed between days 7 and 21 p.i. (Fig. 7a, right panel), most  
257 probably reflecting elimination of transduced muscle cells by infiltrating functional cytotoxic CD8<sup>+</sup> immune  
258 cells. Altogether, these results indicate that VSSTSPR transduces cells with higher efficiency and that novel  
259 properties of the VSSTSPR variant correlate with a higher level of antigen-specific antibody and cellular  
260 immune responses directed against the transgene product.

## 261 Discussion

262 As for other viral vectors, AAV interaction with DC constitutes the critical parameter that controls long-term  
263 transgene expression<sup>20</sup>. As DC were previously described as refractory toward efficient productive AAV  
264 vector transduction, we aimed to identify barrier/s that limit this process. Our results indicate that vector  
265 uncoating is severely impaired in human DC. We also show that DC maturation greatly improves efficacy of  
266 vector transduction, in particular during its intermediate phase, suggesting that intracellular processing of  
267 AAV vectors in immature DC is suboptimal. A high-throughput selection screen of our AAV2-based capsid

268 library identified variants that overcome such barriers through display of distinct peptide motifs and a  
269 subsequent change in the vector-DC interaction. Finally, we show that these modifications of the viral capsid  
270 impact the level of adaptive immune responses induced *in vivo*.

271 DC are professional APC. They differentiate from bone-marrow progenitor cells into either plasmacytoid  
272 (pDC) or pre-conventional DC (pre-cDC)<sup>36</sup>. The latter migrate via the blood stream into lymphoid and non-  
273 lymphoid tissues, where they differentiate further into different subsets of cDC<sup>37</sup>. Here, we focused on  
274 human iDC, a subset of DC generated *in vitro* by culturing blood monocytes in the presence GM-CSF and  
275 IL-4. iDC are considered as a suitable model system to study human DC biology and function<sup>38</sup>. Like *in vivo*  
276 derived immature DC, iDC endocytose exogenous particles<sup>39</sup>. Well-described receptors in this regard are  
277 HSPG, the primary or attachment receptor for AAV2, expressed on iDC in the form of glypican-1, -4, -5,  
278 and syndecan-1, -4<sup>40</sup>, and  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  integrin<sup>41,39</sup>. The latter represents one of AAV2's internalization  
279 receptors<sup>41</sup> that are engaged by the viral capsid after binding to HSPG<sup>42</sup>, likely explaining why this serotype  
280 accumulated in iDC with higher efficiency than other AAV serotypes (Fig. 1a). The HSPG motif is unique  
281 for AAV2 and located at the 3-fold symmetry axis. Residues R448/585 and R451/588 from one capsid  
282 subunit and R350/487 from another are critical for binding the negatively charged sugar hydroxyls of HSPGs  
283<sup>23,24,43</sup>. This motif is destroyed when inserting peptide ligands at N587<sup>25,44</sup>. In addition, variants that re-gain  
284 the ability to bind to HSPG via the peptide insertion can be counter-selected from the library by heparin  
285 affinity chromatography as accomplished in this study<sup>26</sup>. Interestingly, despite these two measures, capsid  
286 variants were selected that involved HSPG for cell infection as demonstrated by the heparin competition  
287 assay performed on HeLa and on DC (Supplementary Fig. S3d and Fig. 4a). Furthermore, repeating the  
288 screening in the presence of heparin to further increase the selection pressure for non-HSPG-binding variants  
289 resulted in selection of the same capsid variants, revealing the importance of this surface molecule for the  
290 AAV-iDC interaction (Supplementary Fig. S3c). Based on this, we may speculate that HSPG binding is  
291 required for guiding our capsid variants into an intracellular pathway that leads to nuclear accumulation, a  
292 feature we specifically selected for since we isolated viral genomes from the nuclear fraction of iDC  
293 (Supplementary Fig. S3a). Indeed, HSPG-mediated transport of various cargos, including chemokines,  
294 cytokines, growth factors as well as viral proteins, to the nucleus has been described<sup>45,46</sup>. An alternative  
295 explanation could involve structural rearrangement of the capsid induced upon HSPG binding, which

296 revealed modifications at the threefold protrusions and fivefold axes of symmetry <sup>42</sup>. These regions contain  
297 the pores that are widened as a consequence of HSPG binding and thus may prime the viral capsid for  
298 uncoating <sup>42</sup>.

299 Besides adjustments in capsid structure induced at the cell surface, capsid binding to receptors initiates  
300 particle uptake through clathrin-dependent endocytosis as well as rearrangements of the cytoskeleton that  
301 prepare for the transport of AAV containing vesicles <sup>42,47</sup>. Clathrin-mediated endocytosis and the  
302 CLIC/GEEC clathrin-independent endocytic pathway are the two main entry routes described for AAV  
303 <sup>27,48,49</sup>. Once inside an endosome, AAV particles are transported within the vesicular system towards the  
304 trans-Golgi network (TGN). This involves trafficking from early to late and/or recycling endosomes before  
305 TGN is reached <sup>49</sup>. On this route, a second conformational change of the capsid – induced by a low endosomal  
306 pH and proteases - further prepares the capsid for nuclear entry and uncoating <sup>2,3,50-52</sup>. Given the importance  
307 of the intracellular vesicular system, it is not surprising that the majority of intracellular AAV particles are  
308 found within the membrane fractions of both HeLa and DC (Figs. 1 and 4). Interestingly, the intracellular  
309 distributions of AAV2 and VSSTSPR in DC did not differ significantly despite a one-log higher transduction  
310 efficiency of the latter. This argues that our capsid variant follows the same intracellular pathway with similar  
311 efficiency (at least based on the resolution offered by bio-distribution assays). The higher transduction  
312 efficiency of the VSSTSPR variant (Fig. 3b) correlated instead with a qualitative and quantitative difference  
313 in vector stability and vector uncoating (Figs. 5c and 5d). This feature seems to be shared by the members of  
314 the I/VSS family, which showed a similar capsid stability in our destabilization assay (Fig. 6) and a  
315 comparably higher transduction efficiency on DC (Fig. 3b).

316 Under normal steady-state conditions, DC exist in an immature form particularly efficient to capture and  
317 uptake exogenous particles and antigens. Therefore, DC are endowed with a continuous endocytic activity  
318 and are equipped with a specialized antigen processing machinery. Specifically, in order to avoid complete  
319 degradation of endocytosed particles and/or antigens, the pH in phagosomes and endosomes is less acidic in  
320 DC than in other phagocytic immune cells. Also, the pH remains alkaline (pH 7 to 7.5) during the first three  
321 hours after particle uptake in part by recruiting the NADPH oxidase NOX2 and inactivating V-ATPase (the  
322 main proton transporter in lysosomes). As a consequence, most proteases are less efficient in these sub-

323 optimal pH conditions <sup>16,53</sup>. In light of the dependency for an acidic pH and proteases, it is conceivable that  
324 the endosomal compartment in iDC is not optimal to prepare the capsid for uncoating. In this scenario, only  
325 a very minute population of AAV2 particles reaching the nuclear compartment would be capable to uncoat  
326 and to contribute to transduction. Insertion of peptides of the I/VSS family, however, may have changed the  
327 capsid properties and favor vector uncoating despite the suboptimal endosomal conditions encountered in  
328 iDC. Alternatively or maybe additionally, use of I/VSS binding receptor (instead of natural receptors for  
329 AAV) for cell entry induces an intracellular signal pathway that promotes AAV endosomal processing. This  
330 latter assertion is based on the finding that DC process antigens differentially depending on the specific  
331 receptor engaged upon pathogen encounter <sup>16</sup>.

332 Interestingly, AAV transduction efficiency was further enhanced through LPS-mediated stimulation of iDC  
333 2 hrs p.i. (Fig. 3b). Enhancement was similarly efficient for both I/VSS engineered vectors, NNPLPQR, and  
334 AAV2, hinting towards a general enhancement of AAV processing. Stimulation of iDC by LPS or other  
335 agents that induce their maturation, is known to be accompanied by a profound reorganization of the  
336 endosomal compartment, including augmented endocytosis and phagocytosis during its early phases, as well  
337 as an enhancement in antigen translocation into the cytosol followed by changes in endosomal pH and  
338 protease activities <sup>16,53,54</sup>. These changes may result in an endosomal environment that is more appropriate  
339 albeit still not optimal for AAV particle processing, and might explain why iDC stimulation 2 hrs after AAV  
340 transduction strongly increased transduction efficiency independently of the capsid (Fig. 3b). Whether it is a  
341 matter of pH, availability of proteases or modification of intracellular pathways used by the vector, remains  
342 to be investigated. Of note, infection of fully mature DC resulted in lower transduction levels than those  
343 measured in iDC (Fig. 3b). This most probably reflects the known lower capacity of fully mature DC to  
344 uptake and internalize antigens and particles (data not shown) as well as a possible modification in the  
345 intracellular environment <sup>16</sup>.

346 As transduction of DC can have an important impact on immune responses, we next evaluated this aspect  
347 using cOva as transgene <sup>34,35</sup>. Our results indicate that cOva delivered by VSSTSPR resulted in a robust  
348 immune response consisting of antibody and CD8<sup>+</sup> T-cell responses against the transgene product (Figs. 7c  
349 and 7d), a feature that may qualify capsids displaying peptides of the I/VSS family as scaffolds for the design

350 of novel vaccines. Interestingly, we observed that at early time points (day 7), transgene expression occurred  
351 at a higher level with VSSTSPR compared to AAV2 (Fig. 7a, right panel). Although this remains to be  
352 investigated, the improved transduction efficiency of VSSTSPR may have resulted in antigen presentation  
353 by transduced muscle cells, which are known to express MHC class I and class II molecules in some  
354 circumstances and can thus behave as surrogate APC. Alternatively, transduction of muscle-resident DC  
355 and/or DC localized in the draining lymph nodes may have also contributed to the higher immune responses  
356 <sup>55,56</sup>. However, even if we have chosen a cytoplasmic form of Ova, we cannot completely exclude that the  
357 higher level of expression observed with the VSSTSPR variant caused a higher level of cOva release by  
358 dying muscle cells and thereby improved presentation and/or cross-presentation by the surrounding APC to  
359 T cells <sup>12,57</sup>. Future studies performed with vectors encoding for non- or less-immunogenic proteins such as  
360 GFP will indicate whether a higher immunogenicity of the VSSTSPR variant is equally observed.

361 In summary, our study reveals for the first time that genetic engineering can be used to improve capsid  
362 uncoating, which we demonstrate is a major barrier that limits AAV-mediated transduction of DC and  
363 possibly of further cell types. Additionally, this work shows the importance of improving our knowledge  
364 about factors that govern capsid stability and vector uncoating as these appear to have considerable impact  
365 on the efficiency of AAV-mediated gene therapy and vaccination approaches.

366

367

**368 Material and Methods****369 Ethics Statement**

370 Human blood was purchased from “Etablissement Français du sang” (EFS). Monocytes were derived from  
371 these samples and were differentiated as outlined below. All animal studies were conducted conforming to  
372 the guidelines of local institutional care and ethical committee and following the national and European  
373 directives. Animal protocols were approved by the committee for research and ethics and the French ministry  
374 (N/02-02-11/06/02-511 14 and 01979.03).

**375 Cell lines and primary cells**

376 The human cervix carcinoma cell line HeLa (kindly provided by Alessandra Recchia, UNIMORE, Modena)  
377 and human embryonic kidney cell line HEK-293 (kindly provided by Philippe Moullier, INSERM U1089,  
378 Nantes) cells were maintained in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM; Life Technologies)  
379 supplemented with 10% fetal bovine serum (FCS; HyClone) and 1% penicillin-streptomycin (P/S; 5,000  
380 U/ml; Invitrogen), and cultivated at 37°C, 5% of CO<sub>2</sub>. Monocytes were purified from peripheral blood  
381 (purchased from EFS) of healthy donors by two successive density gradients (Ficoll (GE Healthcare Life  
382 Sciences) and Percoll (GE Healthcare Life Sciences). Differentiation of monocytes into iDC was performed  
383 by incubating monocytes for 5d in DC medium (RPMI with, 10% of FCS, 1% P/S, 10mM HEPES, 2.5mM  
384 NEAA; 1mM sodium-pyruvate and 0.05mM β-mercaptoethanol) complemented with IL-4 and GM-CSF  
385 (100 ng/mL). The differentiated status of iDC was verified by FACS analysis, using the level of CD209 (DC-  
386 Sign, MACS), CD14 (BD Biosciences) and CD86 (BD Biosciences) as markers. Every experiment was  
387 performed with iDC derived from at least two different donors and two AAV vector batches.

**388 In vitro AAV peptide display selection on DC**

389 AAV capsid variants were selected by screening an AAV2 peptide display library<sup>22</sup> on iDC. Library was  
390 subjected to a phenotype/genotype coupling step followed by heparin affinity chromatography<sup>26</sup>. Flow-

391 through was concentrated and again purified by iodixanol density gradient centrifugation. This pre-selected  
392 library was used for two independent screens each consisting of two rounds of selection. In the first screen,  
393 cells were transduced with the library at GOI  $10^3$  and harvested 6 hrs p.i. Cells are then fractionated as  
394 described below and AAV viral genomes that accumulated in the nuclear fraction were used to generate a  
395 new library. For this, viral DNA was amplified using primers flanking the peptide insertion site allowing to  
396 re-clone the target sequences into the pLG shuttle plasmid (Zhang et al., manuscript in preparation).  
397 Sublibrary was produced as described above and screened on iDC from a different healthy blood donor. After  
398 cell fractionation, viral DNA from the nuclear fraction was sequenced by NGS on the 454-pyrosequencing  
399 platform (GS Junior, Roche). For the second screening, heparin was added during selection and time to  
400 harvest was reduced to 4 hrs p.i. (Supplementary Fig. S3). Based on the NGS results, candidates were picked  
401 as described and respective peptide sequences were introduced into the *cap* ORF of pRC'99<sup>58</sup>.

#### 402 **AAV vector production**

403 Stocks of wild type and recombinant AAV2 particles were generated by calcium phosphate transfection of  
404 HEK-293 cells followed by gradient purification<sup>59,60</sup>. The number of vector / viral genome containing  
405 particles per milliliter (vg/ml) was determined by qPCR using transgene or *cap* ORF specific primers, while  
406 the transducing titer was determined by serial dilution of viral vectors assayed on HeLa cells followed by  
407 flow cytometry analysis as described<sup>26</sup>.

#### 408 **Cell transduction assays**

409 Cells were plated and then transduced with complete medium containing vector particles diluted at the  
410 indicated GOI (vg/cell). At the indicated time point, cells were harvested by extensive trypsin treatment and  
411 washed in PBS. When indicated, iDC were additionally treated with lipopolysaccharide (LPS; 0.5 - 1  $\mu$ g/mL).  
412 For competition assays, the medium containing vector particles was supplemented with heparin (25  $\mu$ g/mL).  
413 Subcellular fractionation was performed using Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissue  
414 (ThermoFisher Scientific). Purity of fractions was confirmed by Western blot (Supplementary Fig. S2) using  
415 anti-Rab 5 (Santa Cruz sc 46692; 1:100), anti-Tubulin (SIGMA T5198; 1:5000), anti-Lamin B1 (Abcam  
416 antibody 16048; 1:5000), and anti-Calreticulin (Affinity BioReagents PA3-900, 1:100) antibodies,  
417 respectively. Fractions were spiked with 1 ng of murine TOPO-GAPDH plasmid followed by DNA extraction

418 (Blood & Tissue kit, Qiagen). The qPCR reactions were conducted with the FastStart universal SYBR green  
 419 master reagent (Roche Diagnostics) on the Step One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems). All  
 420 samples were run in duplicate, and the results were analyzed using ABI StepOne software v2.3. Primers used  
 421 to quantify viral or vector genomes or for normalization are listed in Table 1.

422 **Table 1. List of primers**

Primers	Sequence
<b>GFP-R</b>	ACG ACG GCA ACT ACA AGA CC
<b>GFP-F</b>	CTC CTT GAA GTC GAT GCC CT
<b><math>\beta</math>-Globin-F</b>	CCC TTG GAC CCA GAG GTT CT
<b><math>\beta</math>-Globin-R</b>	CGA GCA CTT TCT TGC CAT GA
<b>mGAPDH-F</b>	GCA TGG CTT TCC GTG TTC
<b>mGAPDH-R</b>	TGT CAT CAT ACT TGG CAG GTT TCT
<b>OVA-F</b>	AAG CAG GCA GAG AGG TGG TA
<b>OVA-R</b>	GAA TGG ATG GTC AG CCC TAA

423

424 For immunofluorescence analyses, iDC were harvested and plated in a 96-Well Optical-Bottom Plates  
 425 (Fisher Scientific) or in a Labtek, both pre-coated with poly-lysine, followed by antibody staining using  
 426 standard protocols<sup>61</sup>. Antibody used were: A20<sup>(62)</sup>, 1:50), anti-HLA-DR (anti human HLA DR-biotin clone  
 427 L243, Novus Biologicals) used at 1/1000 dilution, and anti-Lamin B1 (Abcam antibody 16048; 1:5000).  
 428 Nuclei were stained with DAPI or Hoechst as specified in the figure legend.

#### 429 ***In vitro* uncoating assay**

430 Briefly, cells treated with AAV-GFP were harvested at the indicated time point, washed with PBS,  
 431 extensively treated with trypsin and washed again. Then the DNA was extracted (Qiagen kit) and eluted in  
 432 100  $\mu$ L. Twenty-five  $\mu$ L of DNA were treated with T5 exonuclease (Biolabs, M0363, 30 Unit) at 37°C

433 overnight, then incubated 10 min at 70°C and diluted 2 times to inactivate the enzyme. In parallel, 25 µL of  
434 the same DNA sample were mock treated. The quantification of vector genomes was performed by qPCR  
435 using GFP-specific primers. The percentage of episomal DNA was calculated from the ratio of T5 resistant  
436 GFP DNA to total GFP DNA.

#### 437 **Capsid thermal-stability assay**

438 For the first assay (Fig. 6a), 10<sup>8</sup> vg of indicated AAV vectors were adjusted to the “pH buffer” (citric acid /  
439 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) at pH 7.2 and pH 5.2, for 15 min. at room temperature. Then samples were exposed to indicated  
440 temperatures (50, 55, 60, 65, 70, 75, 80°C) for 15 min and then diluted in PBS. For the second assay (Fig.  
441 6b), wells of qPCR plate were loaded with 5x10<sup>8</sup> vg of indicated AAV vectors diluted in PBS. The  
442 temperature gradient was generated by a LightCycler® 96 System (Roche Life Science) using a self-designed  
443 program (Supplementary Table S3). After the run, PBS was used to dilute samples. In both experiments, after  
444 PBS dilution, samples are transferred to a nitrocellulose membrane using a vacuum blotter for a native dot  
445 blot assay. After saturation, the membranes were incubated overnight at 4°C with A20, or B1 antibodies <sup>62</sup>.  
446 A horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (Sigma, 1/10,000 dilution) was then applied for 1  
447 h at room temperature. Finally, the membranes were incubated with an enhanced chemiluminescence reagent  
448 (West Dura; Pierce) and analyzed by autoradiography film exposure or FusionFX device (Piqlab).

#### 449 **Animal experiments and analyses**

450 Female C57BL/6 mice were obtained from Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, France). Mice were all  
451 between 8–10 weeks of age at the beginning of the experiments and were housed in our animal facility in a  
452 specific pathogen-free barrier facility. The following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies were  
453 used for phenotypic analysis of mouse T cells by flow cytometry: FITC anti-CD44 (IM7), PerCP/Cy5.5 anti-  
454 CD45 (30-f11), APC anti-CD8α (53-6.7), APC-Cy7 anti-CD4 (G41.5) (all from Sony biotechnology). PE-  
455 conjugated H-2K<sup>b</sup>/Ova<sub>257-264</sub> dextramers were used to detect CD8<sup>+</sup> T cells that specifically recognize the  
456 immunodominant Ova<sub>257-264</sub> peptide (Immudex, Copenhagen, Denmark). Single-cell suspensions derived  
457 from spleen, lymph nodes, or peripheral blood were analyzed by flow cytometry using a FACSCanto-I or an  
458 LSRFortessa (BD Biosciences), and using FlowJo software (Tree Star, Ashland). Anti-Ova IgG antibodies

459 were detected by ELISA as previously described<sup>34,35</sup>. ELISpot were used to quantify the numbers of Ova-  
460 specific CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T cells secreting IFN $\gamma$  upon *in vitro* restimulation as previously described<sup>34,35</sup>.  
461 Briefly, 10<sup>5</sup> to 2.5  $\times$  10<sup>5</sup> splenocytes per well were cultured overnight in RPMI medium in the presence of 10  
462  $\mu$ g/ml Ova<sub>257-264</sub> or Ova<sub>323-339</sub> peptides for detection of MHC class I or MHC class II restricted CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup>  
463 T cells Ova-specific T cells, respectively. Cultures were stopped 16 to 20 hrs later and treated according to  
464 manufacturer's instructions (Diaclone, Besançon, France). Number of spots in each well was analyzed with  
465 an Enzyme-linked immunospot plate reader and a dedicated ImmunoSpots software (C.T.L., Bonn,  
466 Germany). Ova DNA and corresponding Ova mRNA were quantified from transduced muscles by qPCR  
467 using SYBR green Mastermix (Roche, Meylan, France)<sup>34,35</sup>. Values were normalization using Eef2 as target.  
468 All qPCRs were performed using a LightCycler 480 apparatus (Roche).

#### 469 **Statistical analysis**

470 Non-parametric test was performed for statistical comparison between groups using one-way analysis of  
471 variance (Kruskal-Wallis test), this test was performed on Stata (vs13) software. P values are indicated as  
472 follows [\*]: p<0.05; [\*\*]: p< 0.01; [\*\*\*]: p< 0.001.

#### 473 **Acknowledgements**

474 The authors acknowledge the contribution of the PLATIM (PLAteau Technique d'Imagerie et de  
475 Microscopie, UMS3444, Lyon, FRANCE) and qPCR teams of SFR Bio-Sciences Gerland-Lyon Sud  
476 (UMS3444/US8) for their help. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche  
477 Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ecole Normale Supérieure de  
478 Lyon (ENSL), Université Claude Bernard Lyon-1 (UCBL-1), and by the Center for Molecular Medicine  
479 Cologne (CMMC), Hannover Medical School, BMBF (Professorinnenprogramm II), by grants from  
480 Association Française contre les Myopathies (AFM), notably grant number #14806 to A.S. and H.B., #18030  
481 to S.A, and a PhD fellowship #21354 to L.D and by PhD program from la Région Rhône-Alpes to A.R.

482

#### 483 **Author contributions**

484 A.R. performed experiments and contributed to writing of the manuscript. L.D, L.A., L.A.Z., C.G. performed  
485 experiments. L.A.Z., M.O., H.B. improved high-throughput selection protocols. M.H. contributed reagent.  
486 M.O. performed NGS. A.S., S.A., H.B. conceived and designed the study, supervised work, acquired grants,  
487 and wrote the manuscript.

488

489 **Conflicts of interest**

490 The authors declare no conflict of interest.

## References

- 1 Salganik, M., Hirsch, M. L. & Samulski, R. J. Adeno-associated Virus as a Mammalian DNA Vector. *Microbiol Spectr* **3**, doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0052-2014 (2015).
- 2 Popa-Wagner, R. *et al.* Impact of VP1-specific protein sequence motifs on adeno-associated virus type 2 intracellular trafficking and nuclear entry. *J Virol* **86**, 9163-9174, doi:10.1128/JVI.00282-12 (2012).
- 3 Sonntag, F., Bleker, S., Leuchs, B., Fischer, R. & Kleinschmidt, J. A. Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J Virol* **80**, 11040-11054, doi:10.1128/JVI.01056-06 (2006).
- 4 Xie, Q. *et al.* The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10405-10410, doi:10.1073/pnas.162250899 (2002).
- 5 DiMattia, M. A. *et al.* Structural insight into the unique properties of adeno-associated virus serotype 9. *J Virol* **86**, 6947-6958, doi:10.1128/JVI.07232-11 (2012).
- 6 Govindasamy, L. *et al.* Structurally mapping the diverse phenotype of adeno-associated virus serotype 4. *J Virol* **80**, 11556-11570, doi:10.1128/JVI.01536-06 (2006).
- 7 Gurda, B. L. *et al.* Capsid antibodies to different adeno-associated virus serotypes bind common regions. *J Virol* **87**, 9111-9124, doi:10.1128/JVI.00622-13 (2013).
- 8 Gurda, B. L. *et al.* Mapping a neutralizing epitope onto the capsid of adeno-associated virus serotype 8. *J Virol* **86**, 7739-7751, doi:10.1128/JVI.00218-12 (2012).
- 9 Nam, H. J. *et al.* Structural studies of adeno-associated virus serotype 8 capsid transitions associated with endosomal trafficking. *J Virol* **85**, 11791-11799, doi:10.1128/JVI.05305-11 (2011).

- 10 Ng, R. *et al.* Structural characterization of the dual glycan binding adeno-associated virus serotype 6. *J Virol* **84**, 12945-12957, doi:10.1128/JVI.01235-10 (2010).
- 11 Tseng, Y. S. & Agbandje-McKenna, M. Mapping the AAV Capsid Host Antibody Response toward the Development of Second Generation Gene Delivery Vectors. *Front Immunol* **5**, 9, doi:10.3389/fimmu.2014.00009 (2014).
- 12 Jooss, K., Yang, Y., Fisher, K. J. & Wilson, J. M. Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J Virol* **72**, 4212-4223 (1998).
- 13 Zhu, J., Huang, X. & Yang, Y. The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. *J Clin Invest* **119**, 2388-2398, doi:10.1172/JCI37607 (2009).
- 14 Nieto, K. & Salvetti, A. AAV Vectors Vaccines Against Infectious Diseases. *Front Immunol* **5**, 5, doi:10.3389/fimmu.2014.00005 (2014).
- 15 Colella, P., Ronzitti, G. & Mingozzi, F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* **8**, 87-104, doi:10.1016/j.omtm.2017.11.007 (2018).
- 16 Alloatti, A., Kotsias, F., Magalhaes, J. G. & Amigorena, S. Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunological Reviews* **272**, 97-108 (2016).
- 17 Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* **31**, 563-604, doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950 (2013).
- 18 Pulendran, B. The varieties of immunological experience: of pathogens, stress, and dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **33**, 563-606, doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075049 (2015).

- 19 Savina, A. & Amigorena, S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* **219**, 143-156, doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x (2007).
- 20 Rogers, G. L. *et al.* Plasmacytoid and conventional dendritic cells cooperate in crosspriming AAV capsid-specific CD8(+) T cells. *Blood* **129**, 3184-3195, doi:10.1182/blood-2016-11-751040 (2017).
- 21 Pandya, J., Ortiz, L., Ling, C., Rivers, A. E. & Aslanidi, G. Rationally designed capsid and transgene cassette of AAV6 vectors for dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* **92**, 116-123, doi:10.1038/icb.2013.74 (2014).
- 22 Perabo, L. *et al.* In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display. *Mol Ther* **8**, 151-157 (2003).
- 23 Kern, A. *et al.* Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *J Virol* **77**, 11072-11081 (2003).
- 24 Opie, S. R., Warrington, K. H., Jr., Agbandje-McKenna, M., Zolotukhin, S. & Muzyczka, N. Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. *J Virol* **77**, 6995-7006 (2003).
- 25 Perabo, L. *et al.* Heparan sulfate proteoglycan binding properties of adeno-associated virus retargeting mutants and consequences for their in vivo tropism. *J Virol* **80**, 7265-7269, doi:10.1128/JVI.00076-06 (2006).
- 26 Sallach, J. *et al.* Tropism-modified AAV vectors overcome barriers to successful cutaneous therapy. *Mol Ther* **22**, 929-939, doi:10.1038/mt.2014.14 (2014).
- 27 Uhrig, S. *et al.* Successful target cell transduction of capsid-engineered rAAV vectors requires clathrin-dependent endocytosis. *Gene Ther* **19**, 210-218, doi:10.1038/gt.2011.78 (2012).

- 28 McCullough, K. C., Ruggli, N. & Summerfield, A. Dendritic cells--at the front-line of pathogen attack. *Vet Immunol Immunopathol* **128**, 7-15, doi:10.1016/j.vetimm.2008.10.290 (2009).
- 29 Schnepp, B. C., Clark, K. R., Klemanski, D. L., Pacak, C. A. & Johnson, P. R. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* **77**, 3495-3504 (2003).
- 30 Li, X., Zhao, J., Yuan, Q. & Xia, N. Detection of HBV Covalently Closed Circular DNA. *Viruses* **9**, doi:10.3390/v9060139 (2017).
- 31 Thomas, C. E., Storm, T. A., Huang, Z. & Kay, M. A. Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol* **78**, 3110-3122 (2004).
- 32 Horowitz, E. D. *et al.* Biophysical and ultrastructural characterization of adeno-associated virus capsid uncoating and genome release. *J Virol* **87**, 2994-3002, doi:10.1128/JVI.03017-12 (2013).
- 33 Barnaud, J. *et al.* Characterization of AAV vector particles stability at the single capsid level. *J. Biol. Phys* **In press** (2018).
- 34 Adriouch, S. *et al.* Improved Immunological Tolerance Following Combination Therapy with CTLA-4/Ig and AAV-Mediated PD-L1/2 Muscle Gene Transfer. *Front Microbiol* **2**, 199, doi:10.3389/fmicb.2011.00199 (2011).
- 35 Hardet, R. *et al.* Oral-tolerization Prevents Immune Responses and Improves Transgene Persistence Following Gene Transfer Mediated by Adeno-associated Viral Vector. *Mol Ther* **24**, 87-95, doi:10.1038/mt.2015.146 (2016).
- 36 Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B. & Lawrence, T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J* **33**, 1104-1116, doi:10.1002/emboj.201488027 (2014).

- 37 Autenrieth, S. E. *et al.* Profiling of primary peripheral blood- and monocyte-derived dendritic cells using monoclonal antibodies from the HLDA10 Workshop in Wollongong, Australia. *Clin Transl Immunology* **4**, e50, doi:10.1038/cti.2015.29 (2015).
- 38 Schinnerling, K., Garcia-Gonzalez, P. & Aguillon, J. C. Gene expression profiling of human monocyte-derived dendritic cells - searching for molecular regulators of tolerogenicity. *frontiers in Immunology* **6**, doi:10.3389/ (2015).
- 39 Hotta, C., Fujimaki, H., Yoshinari, M., Nakazawa, M. & Minami, M. The delivery of an antigen from the endocytic compartment into the cytosol for cross-presentation is restricted to early immature dendritic cells. *Immunology* **117**, 97-107, doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02270.x (2006).
- 40 Wegrowski, Y. *et al.* Cell surface proteoglycan expression during maturation of human monocytes-derived dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol* **144**, 485-493, doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03059.x (2006).
- 41 Summerford, C., Bartlett, J. S. & Samulski, R. J. AlphaVbeta5 integrin a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nature Medicine* **5**, 78-82 (1999).
- 42 Levy, H. C. *et al.* Heparin binding induces conformational changes in Adeno-associated virus serotype 2. *J Struct Biol* **165**, 146-156, doi:10.1016/j.jsb.2008.12.002 (2009).
- 43 O'Donnell, J., Taylor, K. A. & Chapman, M. S. Adeno-associated virus-2 and its primary cellular receptor--Cryo-EM structure of a heparin complex. *Virology* **385**, 434-443, doi:10.1016/j.virol.2008.11.037 (2009).
- 44 Buning, H., Huber, A., Zhang, L., Meumann, N. & Hacker, U. Engineering the AAV capsid to optimize vector-host-interactions. *Curr Opin Pharmacol* **24**, 94-104, doi:10.1016/j.coph.2015.08.002 (2015).

- 45 Sandgren, S., Cheng, F. & Belting, M. Nuclear targeting of macromolecular polyanions by an HIV-Tat derived peptide. Role for cell-surface proteoglycans. *J Biol Chem* **277**, 38877-38883, doi:10.1074/jbc.M205395200 (2002).
- 46 Stewart, M. D. & Sanderson, R. D. Heparan sulfate in the nucleus and its control of cellular functions. *Matrix Biol* **35**, 56-59, doi:10.1016/j.matbio.2013.10.009 (2014).
- 47 Greber, U. Signalling in viral entry. *Cell. Mol. Life Sci* **59**, 608-626 (2002).
- 48 Nonnenmacher, M. & Weber, T. Adeno-Associated Virus 2 Infection Requires Endocytosis through the CLIC/GEEC Pathway. *Cell Host & Microbe* **10**, 563-576, doi:10.1016/j.chom.2011.10.014 (2011).
- 49 Nonnenmacher, M. & Weber, T. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Therapy*, 1-10, doi:10.1038/gt.2012.6 (2012).
- 50 Flatt, J. W. & Greber, U. F. Viral mechanisms for docking and delivering at nuclear pore complexes. *Semin Cell Dev Biol* **68**, 59-71, doi:10.1016/j.semcdb.2017.05.008 (2017).
- 51 Girod, A. *et al.* The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J Gen Virol* **83**, 973-978, doi:10.1099/0022-1317-83-5-973 (2002).
- 52 Stahnke, S. *et al.* Intrinsic phospholipase A2 activity of adeno-associated virus is involved in endosomal escape of incoming particles. *Virology* **409**, 77-83, doi:10.1016/j.virol.2010.09.025 (2011).
- 53 Savina, A. *et al.* NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* **126**, 205-218, doi:10.1016/j.cell.2006.05.035 (2006).

- 54 Drutman, S. B. & Trombetta, E. S. Dendritic cells continue to capture and present antigens after maturation in vivo. *J Immunol* **185**, 2140-2146, doi:10.4049/jimmunol.1000642 (2010).
- 55 Langlet, C. *et al.* CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J Immunol* **188**, 1751-1760, doi:10.4049/jimmunol.1102744 (2012).
- 56 Arnold, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* **204**, 1057-1069, doi:10.1084/jem.20070075 (2007).
- 57 Ghenassia, A. *et al.* Intradermal Immunization with rAAV1 Vector Induces Robust Memory CD8(+) T Cell Responses Independently of Transgene Expression in DCs. *Mol Ther* **25**, 2309-2322, doi:10.1016/j.ymthe.2017.06.019 (2017).
- 58 Nicklin, S. A. *et al.* Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. *Mol Ther* **4**, 174-181, doi:10.1006/mthe.2001.0424 (2001).
- 59 Salvetti, A. *et al.* Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* **9**, 695-706, doi:10.1089/hum.1998.9.5-695 (1998).
- 60 Zolotukhin, S. *et al.* Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods* **28**, 158-167 (2002).
- 61 Alazard-Dany, N. *et al.* Definition of herpes simplex virus type 1 helper activities for adeno-associated virus early replication events. *PLoS Pathog* **5**, e1000340, doi:10.1371/journal.ppat.1000340 (2009).
- 62 Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D. & Kleinschmidt, J. A. Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol* **71**, 1341-1352 (1997).

## Figure legends

**Figure 1. Early steps in iDC transduction by AAV vectors. a.** Entry efficiency of AAV vectors derived from different serotypes. iDC were incubated with AAV vectors encoding for enhanced green fluorescent protein (GFP) at a GOI of  $10^4$  for 48 hrs. Cells were harvested by extensive trypsin treatment to remove membrane-bound particles<sup>27</sup>. Total DNA was extracted and analyzed by qPCR using primers specific for GFP (vector genome) and for the host cell gene ( $\beta$ -globin), respectively. Results are presented as the mean GFP-to- $\beta$ -globin ratio (R.U.). Error bars represent standard deviation (n=3). **b.** AAV2 vectors are delivered to the nucleus. iDC were incubated with AAV2 vectors at a GOI of  $10^4$  for 7 hrs. Cells were fixed, permeabilized, and incubated with antibodies directed against the AAV capsid (A20) and nuclear Lamin B1, respectively. The nucleus was stained with DAPI. Cells were imaged by confocal microscopy. Arrow heads indicate A20 signals in the nucleus.

**Figure 2. Selection of AAV capsid variants on iDC. a.** Quantification of NGS results. Variants that accumulated after two rounds of AAV2-based peptide library selection on iDC from different donors (Supplementary Fig. S3) were subjected to NGS using *cap*-specific primers to identify peptide sequences that mediated cell infection. Shown are sequences of peptide inserts present with amounts >1.5%. **b.** Phylogenetic analysis of top AAV variants. Amino acid sequences of peptide inserts were aligned. A phylogenetic tree was constructed using the maximum likelihood method. Selected variants were thereby classed into two main families. Numbers indicate bootstrap values.

**Figure 3. Influence of the DC maturation process on transduction. a.** Outline of the experimental procedure. DC maturation was induced by adding LPS (0.5 - 1  $\mu$ g/mL) either 24 hrs before (mDC) or 2 hrs after (mDCpi) vector application. Cells were – in both cases - incubated for 24 hrs with AAV vectors. **b.** Transduction efficiencies of AAV capsid variants. iDC, mDCpi or mDC were incubated with AAV2 (black bars), VSSTSPR (light grey bars), ISSSTAR (white bars) or NNPLPQR (dark grey bars) at a GOI of  $10^4$  for 48 hrs. Cells were harvested and percentage of GFP<sup>+</sup> cell was determined by flow cytometry. Inset: results obtained in iDC and mDC presented at increased scale. Error bars represent standard deviation of at least

three independent experiments for AAV2, VSSTSPR and ISSSTAR. For NNPLPQR, two independent experiments were performed. Asterisks indicate the p value: \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ ; \*\*\* $<0.001$ .

**Figure 4. Comparison of AAV2 and VSSTSPR for DC transduction.** **a.** Heparin competition assay. mDCpi were incubated with AAV2 (black bars) or VSSTSPR (grey bars) at a GOI of  $10^4$  in the absence or presence of heparin (25  $\mu\text{g}$  per mL). Cells were harvested 48 hrs p.i. and the percentage of GFP<sup>+</sup> cells was determined by flow cytometry. Error bars represent standard deviation (n=4). **b.** Entry efficiency of AAV vectors on iDC and mDCpi. DC were incubated with AAV2 (black bars) and VSSTSPR (grey bars) at a GOI of  $10^4$  for 24 hrs. Cells were harvested by intensive treatment with trypsin and analyzed by qPCR using transgene-specific and  $\beta$ -globin-specific primers. Entry efficiency of AAV2 for iDC were set to 100%. Error bars represent standard deviation (n=4). **c.** Intracellular distribution of AAV in iDC and mDCpi. DC were incubated with AAV2 (black bars) or VSSTSPR (grey bars) at a GOI of  $10^3$  for 48 hrs. Cells were harvested by trypsin treatment and indicated cell fractions were isolated. Total DNA from each fraction was extracted and vector genome amounts were quantified by qPCR using transgene-specific primers. Error bars represent standard deviation (n=3). Asterisks indicate the p value: \*  $<0.05$ .

**Figure 5. Quantification of episomal vector DNA as indication for uncoating efficiency.** **a-b.** Uncoating efficiency of AAV2. iDC or HeLa cells were incubated with AAV2 at a GOI of  $10^4$  for 9 (A) or 48 hrs (B). Total DNA was extracted from cells harvested at 9 hrs p.i., DNA was then divided and either treated with T5 exonuclease or not, followed by quantification by qPCR. Cells harvested at 48 hrs p.i. were subjected to flow cytometry to determine the amount of GFP<sup>+</sup> cells. **c-d.** Uncoating efficiency of AAV2 and VSSTRPS on DC. iDC or mDCpi were incubated with AAV2 (black bars) or VSSTSPR (grey bars) at a GOI of  $10^3$  for 24 (C) or 48 hrs (D). Total DNA was extracted from cells harvested at 24 hrs p.i. and used for the uncoating efficiency assay as described in a. Again, cells harvested at 48 hrs were analyzed by flow cytometry to determine the percentage of GFP<sup>+</sup> cells. Error bars represent standard deviation (n>3). Asterisks indicate the p value: \*  $<0.05$ .

**Figure 6. Thermal stability assay.** **a.** Capsid destabilization assay for AAV2 and VSSTSPR at different pH values. Vector preparations were adjusted in pH and then incubated for 15 minutes at indicated temperatures. A native dot blot was then performed using A20 and B1 antibodies to recognize intact and disassembled

## Annexe

AAV capsids, respectively. Representative results for three independent experiments are shown **b**. Comparative analysis of all capsid variants. AAV2, VSSTSPR, ISSSTAR and NNPLPQR were subjected to a temperature gradient followed by a native dot blot analysis. The integrity of the capsid was analyzed as described for a.

**Figure 7. Characterization of transduction efficiency and immune responses following muscle gene transfer of AAV2-cOva and VSSTSPR-cOva. a.** Transduction efficiency. Gastrocnemius muscles were analyzed for the presence of vector genomes (at day 7; left panel) and corresponding mRNA expression (at days 7, 14 and 21, right panel) using Ova-specific primers. **b.** Cellular immune responses. Flow cytometry profiles (representative) and bar graphs (n=5) showing the percentage of Ova-specific CD8<sup>+</sup> T cells positively stained with H-2K<sup>b</sup>/Ova dextramers in spleen (upper panels) and blood (lower panels) 21 days after gene transfer. **c.** Humoral responses. Sera were harvested from individual mice at day 21 and analyzed by ELISA to detect anti-Ova IgG. **d.** Interferon- $\gamma$  secreting cells. Bar graph and representative picture showing number of spot forming units (SFU) for 10<sup>6</sup> splenocytes harvested at day 21 post gene transfer and re-stimulated with the immunodominant MHC class I restricted Ova<sub>257-264</sub> peptide (left panel) or MHC class II restricted Ova<sub>323-339</sub> peptide (right panel) to stimulate interferon- $\gamma$  secretion by antigen specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells, respectively (n=5). [\*]: p<0.05; [\*\*]: p< 0.01; [\*\*\*]: p< 0.001.

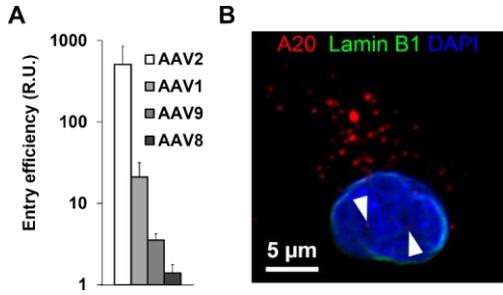


Figure 1.

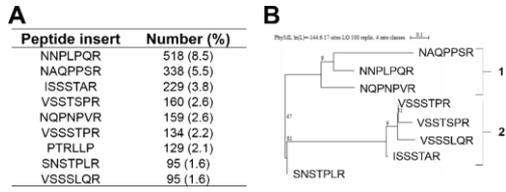


Figure 2.

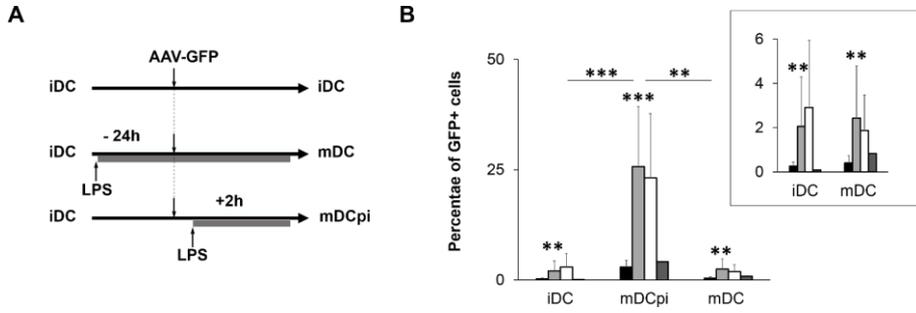


Figure 3.

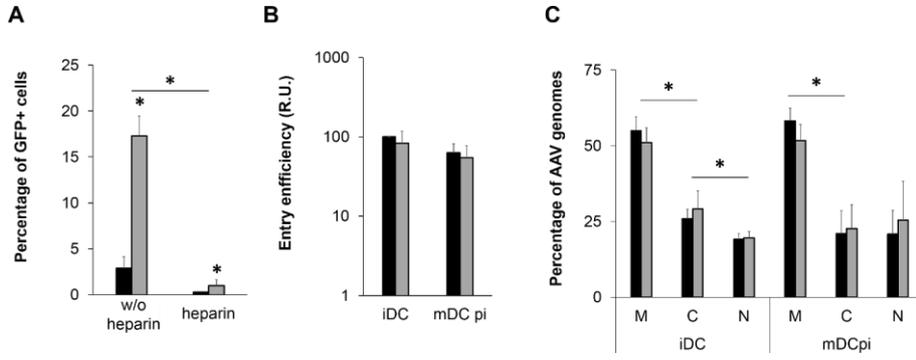


Figure 4.

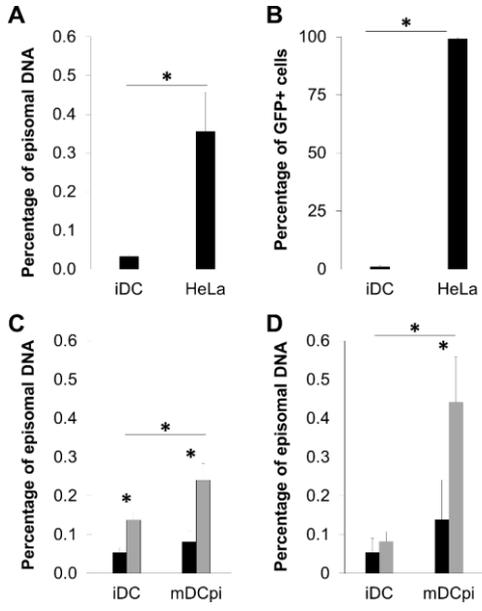


Figure 5.

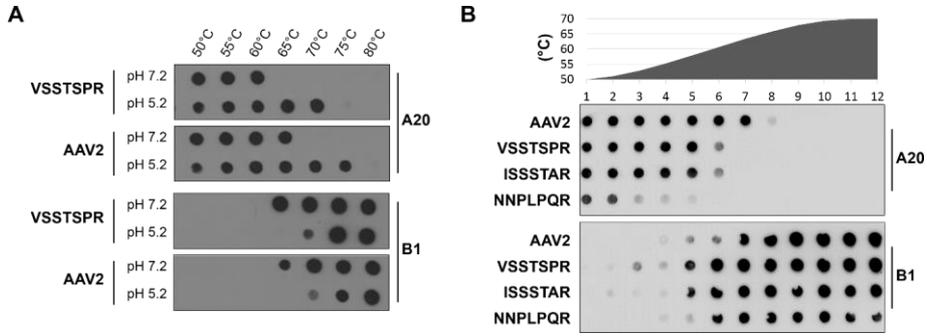


Figure 6.

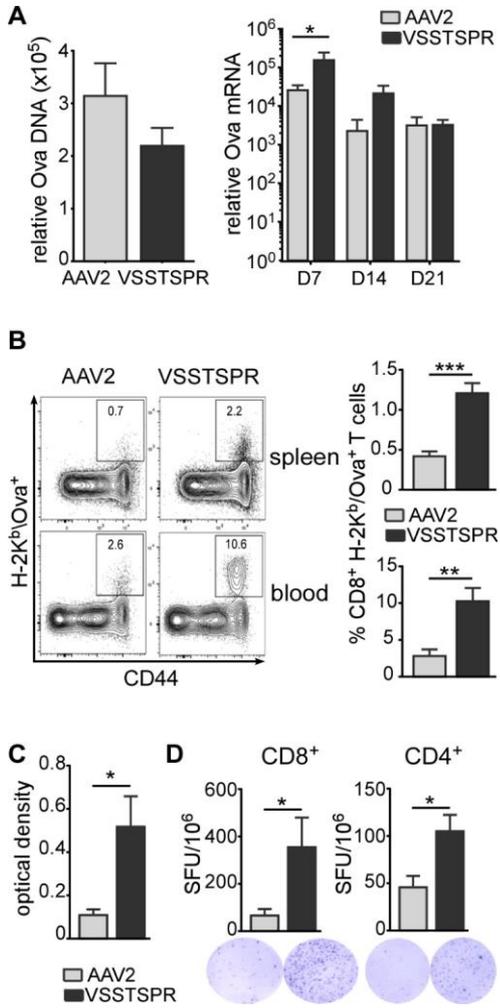


Figure 7.

## VII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adriouch, S., Franck, E., Drouot, L., Bonneau, C., Jolinon, N., Salvetti, A., and Boyer, O. (2011). Improved Immunological Tolerance Following Combination Therapy with CTLA-4/Ig and AAV-Mediated PD-L1/2 Muscle Gene Transfer. *Front. Microbiol.* 2.
- Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149, 754–755.
- Bachmann, M.F., Köhler, G., Ecabert, B., Mak, T.W., and Kopf, M. (1999). Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 163, 1128–1131.
- Balakrishnan, B., and Jayandharan, G.R. (2014). Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 14, 86–100.
- Balazs, A.B., Chen, J., Hong, C.M., Rao, D.S., Yang, L., and Baltimore, D. (2011). Antibody-based Protection Against HIV Infection by Vectored ImmunoProphylaxis. *Nature* 481, 81–84.
- Baroja, M.L., Luxenberg, D., Chau, T., Ling, V., Strathdee, C.A., Carreno, B.M., and Madrenas, J. (2000). The Inhibitory Function of CTLA-4 Does Not Require Its Tyrosine Phosphorylation. *J. Immunol.* 164, 49–55.
- Bartlett, J.S., Wilcher, R., and Samulski, R.J. (2000). Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* 74, 2777–2785.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27, 20–21.
- Bhatt, P., Khatri, N., Kumar, M., Baradia, D., and Misra, A. (2015). Microbeads mediated oral plasmid DNA delivery using polymethacrylate vectors: an effectual groundwork for colorectal cancer. *Drug Deliv.* 22, 849–861.
- Biswas, M., Sarkar, D., Kumar, S.R.P., Nayak, S., Rogers, G.L., Markusic, D.M., Liao, G., Terhorst, C., and Herzog, R.W. (2015). Synergy between rapamycin and FLT3 ligand enhances plasmacytoid dendritic cell-dependent induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg. *Blood* 125, 2937–2947.
- Björkström, N.K., Kekäläinen, E., and Mjösberg, J. (2013). Tissue-specific effector functions of innate lymphoid cells. *Immunology* 139, 416–427.
- Borriello, F., Sethna, M.P., Boyd, S.D., Schweitzer, A.N., Tivol, E.A., Jacoby, D., Strom, T.B., Simpson, E.M., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (1997). B7-1 and B7-2 Have Overlapping, Critical Roles in Immunoglobulin Class Switching and Germinal Center Formation. *Immunity* 6, 303–313.
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Mitri, D.D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M.L., et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110, 1225–1232.

## Références

- Brantly, M.L., Chulay, J.D., Wang, L., Mueller, C., Humphries, M., Spencer, L.T., Rouhani, F., Conlon, T.J., Calcedo, R., Betts, M.R., et al. (2009). Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 16363–16368.
- Brennan, T.V., and Yang, Y. PD-L1 serves as a double agent in separating GVL from GVHD. *J. Clin. Invest.* *127*, 1627–1630.
- Brockstedt, D.G., Podsakoff, G.M., Fong, L., Kurtzman, G., Mueller-Ruchholtz, W., and Engleman, E.G. (1999). Induction of immunity to antigens expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *92*, 67–75.
- Brunet, J.F., Denizot, F., Luciani, M.F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M.G., and Golstein, P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature* *328*, 267–270.
- Buller, R.M.L., Janik, J.E., Sebring, E.D., and Rose, J.A. (1981). Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Completely Help Adenovirus-Associated Virus Replication. *J. Virol.* *40*, 241–247.
- Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2007). Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* *27*, 111–122.
- Calbo, S., Delagrèverie, H., Arnoult, C., Authier, F.-J., Tron, F., and Boyer, O. (2008). Functional Tolerance of CD8+ T Cells Induced by Muscle-Specific Antigen Expression. *J. Immunol.* *181*, 408–417.
- Calcedo, R., and Wilson, J.M. (2013). Humoral Immune Response to AAV. *Front. Immunol.* *4*.
- Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Gao, G., Lin, J., and Wilson, J.M. (2009). Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *J. Infect. Dis.* *199*, 381–390.
- Calcedo, R., Franco, J., Qin, Q., Richardson, D.W., Mason, J.B., Boyd, S., and Wilson, J.M. (2015). Preexisting Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Virus Capsids in Large Animals Other Than Monkeys May Confound In Vivo Gene Therapy Studies. *Hum. Gene Ther. Methods* *26*, 103–105.
- Carpentier, M., Lorain, S., Chappert, P., Lalfer, M., Hardet, R., Urbain, D., Peccate, C., Adriouch, S., Garcia, L., Davoust, J., et al. (2015). Intrinsic Transgene Immunogenicity Gears CD8+ T-cell Priming After rAAV-Mediated Muscle Gene Transfer. *Mol. Ther.* *23*, 697–706.
- Carreno, B.M., Bennett, F., Chau, T.A., Ling, V., Luxenberg, D., Jussif, J., Baroja, M.L., and Madrenas, J. (2000). CTLA-4 (CD152) Can Inhibit T Cell Activation by Two Different Mechanisms Depending on Its Level of Cell Surface Expression. *J. Immunol.* *165*, 1352–1356.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., Basile, G. de S., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.-L., et al. (2000). Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science* *288*, 669–672.
- Cecchini, S., Virag, T., and Kotin, R.M. (2011). Reproducible High Yields of Recombinant Adeno-Associated Virus Produced Using Invertebrate Cells in 0.02- to 200-Liter Cultures. *Hum. Gene Ther.* *22*, 1021–1030.
- Charbonnier, L.-M., Vokaer, B., Lemaître, P.H., Field, K.A., Leo, O., and Moine, A.L. (2012). CTLA4-Ig Restores Rejection of MHC Class-II Mismatched Allografts by Disabling IL-2-Expanded Regulatory T Cells. *Am. J. Transplant.* *12*, 2313–2321.

## Références

- Chaudhri, A., Xiao, Y., Zhu, B., and Freeman, G.J. (2017). PD-L1 binds with B7-1 only in cis on the same cell surface. *J. Immunol.* *198*, 154.11-154.11.
- Chaudhri, A., Xiao, Y., Klee, A.N., Wang, X., Zhu, B., and Freeman, G.J. (2018). PD-L1 Binds to B7-1 Only In Cis on the Same Cell Surface. *Cancer Immunol. Res.* *6*, 921–929.
- Chen, W., Jin, W., and Wahl, S.M. (1998). Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. *J. Exp. Med.* *188*, 1849–1857.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor Foxp3. *J. Exp. Med.* *198*, 1875–1886.
- Cheng, X., Dai, H., Wan, N., Moore, Y., Vankayalapati, R., and Dai, Z. (2009). Interaction of programmed death-1 and programmed death-1 ligand-1 contributes to testicular immune privilege. *Transplantation* *87*, 1778–1786.
- Chirmule, N., Xiao, W., Truneh, A., Schnell, M.A., Hughes, J.V., Zoltick, P., and Wilson, J.M. (2000). Humoral Immunity to Adeno-Associated Virus Type 2 Vectors following Administration to Murine and Nonhuman Primate Muscle. *J. Virol.* *74*, 2420–2425.
- Choudhury, S.R., Fitzpatrick, Z., Harris, A.F., Maitland, S.A., Ferreira, J.S., Zhang, Y., Ma, S., Sharma, R.B., Gray-Edwards, H.L., Johnson, J.A., et al. (2016). In Vivo Selection Yields AAV-B1 Capsid for Central Nervous System and Muscle Gene Therapy. *Mol. Ther.* *24*, 1247–1257.
- Chun, N., Fairchild, R.L., Li, Y., Liu, J., Zhang, M., Baldwin, W.M., and Heeger, P.S. (2017). Complement Dependence of Murine Costimulatory Blockade-Resistant Cellular Cardiac Allograft Rejection. *Am. J. Transplant.* *17*, 2810–2819.
- Collins, A.V., Brodie, D.W., Gilbert, R.J.C., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D.I., Merwe, P.A. van der, and Davis, S.J. (2002). The Interaction Properties of Costimulatory Molecules Revisited. *Immunity* *17*, 201–210.
- Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomini, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., et al. (2010). Interleukin-35-mediated induction of a novel regulatory T cell population. *Nat. Immunol.* *11*, 1093–1101.
- Cordier, L., Hack, A.A., Scott, M.O., Barton-Davis, E.R., Gao, G., Wilson, J.M., McNally, E.M., and Sweeney, H.L. (2000). Rescue of Skeletal Muscles of  $\gamma$ -Sarcoglycan- Deficient Mice with Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer. *Mol. Ther.* *1*, 119–129.
- Cordier, L., Gao, G.-P., Hack, A.A., McNally, E.M., Wilson, J.M., Chirmule, N., and Sweeney, H.L. (2001). Muscle-Specific Promoters May Be Necessary for Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer in the Treatment of Muscular Dystrophies. *Hum. Gene Ther.* *12*, 205–215.
- Corti, M., Cleaver, B., Clément, N., Conlon, T.J., Faris, K.J., Wang, G., Benson, J., Tarantal, A.F., Fuller, D., Herzog, R.W., et al. (2015). Evaluation of Readministration of a Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Expressing Acid Alpha-Glucosidase in Pompe Disease: Preclinical to Clinical Planning. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* *26*, 185–193.

## Références

- Cretney, E., Xin, A., Shi, W., Minnich, M., Masson, F., Miasari, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Busslinger, M., Nutt, S.L., et al. (2011). The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *12*, 304–311.
- Darlington, P.J., Kirchoff, M.G., Criado, G., Sondhi, J., and Madrenas, J. (2005). Hierarchical Regulation of CTLA-4 Dimer-Based Lattice Formation and Its Biological Relevance for T Cell Inactivation. *J. Immunol.* *175*, 996–1004.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enyoloji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* *204*, 1257–1265.
- Denard, J., Marolleau, B., Jenny, C., Rao, T.N., Fehling, H.J., Voit, T., and Svinartchouk, F. (2013). C-Reactive Protein (CRP) Is Essential for Efficient Systemic Transduction of Recombinant Adeno-Associated Virus Vector 1 (rAAV-1) and rAAV-6 in Mice. *J. Virol.* *87*, 10784–10791.
- Devarajan, P., Miska, J., Lui, J.B., Swieboda, D., and Chen, Z. (2014). Opposing Effects of CTLA4 Insufficiency on Regulatory versus Conventional T Cells in Autoimmunity Converge on Effector Memory in Target Tissue. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 4368–4380.
- De-Zolt, S., Schnütgen, F., Seisenberger, C., Hansen, J., Hollatz, M., Floss, T., Ruiz, P., Wurst, W., and von Melchner, H. (2006). High-throughput trapping of secretory pathway genes in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* *34*, e25.
- Ding, Y., Han, R., Jiang, W., Xiao, J., Liu, H., Chen, X., Li, X., and Hao, J. (2016). Programmed Death Ligand 1 Plays a Neuroprotective Role in Experimental Autoimmune Neuritis by Controlling Peripheral Nervous System Inflammation of Rats. *J. Immunol.* 1601083.
- Douar, A.-M., Poulard, K., Stockholm, D., and Danos, O. (2001). Intracellular Trafficking of Adeno-Associated Virus Vectors: Routing to the Late Endosomal Compartment and Proteasome Degradation. *J. Virol.* *75*, 1824–1833.
- Earley, L.F., Powers, J.M., Adachi, K., Baumgart, J.T., Meyer, N.L., Xie, Q., Chapman, M.S., and Nakai, H. (2017). Adeno-associated Virus (AAV) Assembly-Activating Protein Is Not an Essential Requirement for Capsid Assembly of AAV Serotypes 4, 5, and 11. *J. Virol.* *91*.
- Eppihimer, M.J., Gunn, J., Freeman, G.J., Greenfield, E.A., Chernova, T., Erickson, J., and Leonard, J.P. (2002). Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirc. N. Y. N* *1994* *9*, 133–145.
- Esposito, L., Hunter, K.M.D., Clark, J., Rainbow, D.B., Stevens, H., Denesha, J., Duley, S., Dawson, S., Coleman, G., Nutland, S., et al. (2014). Investigation of Soluble and Transmembrane CTLA-4 Isoforms in Serum and Microvesicles. *J. Immunol.* 1303389.
- Faust, S.M., Bell, P., Cutler, B.J., Ashley, S.N., Zhu, Y., Rabinowitz, J.E., and Wilson, J.M. (2013). CpG-depleted adeno-associated virus vectors evade immune detection. *J. Clin. Invest.* *123*, 2994–3001.
- Fayyad-Kazan, H., Rouas, R., Fayyad-Kazan, M., Badran, R., El Zein, N., Lewalle, P., Najjar, M., Hamade, E., Jebbawi, F., Merimi, M., et al. (2012). MicroRNA Profile of Circulating CD4-positive Regulatory T Cells in Human Adults and Impact of Differentially Expressed MicroRNAs on Expression of Two Genes Essential to Their Function. *J. Biol. Chem.* *287*, 9910–9922.

## Références

- Ferreira, V., Twisk, J., Kwikkers, K., Aronica, E., Brisson, D., Methot, J., Petry, H., and Gaudet, D. (2014). Immune Responses to Intramuscular Administration of Alipogene Tiparovec (AAV1-LPLS447X) in a Phase II Clinical Trial of Lipoprotein Lipase Deficiency Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* 25, 180–188.
- Fields, P.A., Arruda, V.R., Armstrong, E., Chu, K., Mingozzi, F., Hagstrom, J.N., Herzog, R.W., and High, K.A. (2001). Risk and Prevention of Anti-factor IX Formation in AAV-Mediated Gene Transfer in the Context of a Large Deletion of F9. *Mol. Ther.* 4, 201–210.
- Fife, B.T., Pauken, K.E., Eagar, T.N., Obu, T., Wu, J., Tang, Q., Azuma, M., Krummel, M.F., and Bluestone, J.A. (2009). Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat. Immunol.* 10, 1185–1192.
- Fitzpatrick, Z., Leborgne, C., Barbon, E., Masat, E., Ronzitti, G., van Wittenberghe, L., Vignaud, A., Collaud, F., Charles, S., Simon Sola, M., et al. (2018). Influence of Pre-existing Anti-capsid Neutralizing and Binding Antibodies on AAV Vector Transduction. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 9, 119–129.
- Flanigan, K.M., Campbell, K., Viollet, L., Wang, W., Gomez, A.M., Walker, C.M., and Mendell, J.R. (2013). Anti-Dystrophin T Cell Responses in Duchenne Muscular Dystrophy: Prevalence and a Glucocorticoid Treatment Effect. *Hum. Gene Ther.* 24, 797–806.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3. *Immunity* 22, 329–341.
- Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Sharpe, A.H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206, 3015–3029.
- Freedman, A.S., Freeman, G., Horowitz, J.C., Daley, J., and Nadler, L.M. (1987). B7, a B-cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells. *J. Immunol.* 139, 3260–3267.
- Freeman, G.J., Gribben, J.G., Boussiotis, V.A., Ng, J.W., Restivo, V.A., Lombard, L.A., Gray, G.S., and Nadler, L.M. (1993). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262, 909–911.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., et al. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192, 1027–1034.
- Fuhrman, C.A., Yeh, W.-I., Seay, H.R., Lakshmi, P.S., Chopra, G., Zhang, L., Perry, D.J., McClymont, S.A., Yadav, M., Lopez, M.-C., et al. (2015). Divergent phenotypes of human regulatory T cells expressing the receptors TIGIT and CD226. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 195, 145–155.
- Gao, G., Vandenberghe, L.H., and Wilson, J.M. (2005). New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr. Gene Ther.* 5, 285–297.
- Gao, G.-P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11854–11859.

## Références

- Ghenassia, A., Gross, D.-A., Lorain, S., Tros, F., Urbain, D., Benkhelifa-Ziyyat, S., Charbit, A., Davoust, J., and Chappert, P. (2017). Intradermal Immunization with rAAV1 Vector Induces Robust Memory CD8+ T Cell Responses Independently of Transgene Expression in DCs. *Mol. Ther.* *25*, 2309–2322.
- Ghetie, V., Popov, S., Borvak, J., Radu, C., Matesoi, D., Medesan, C., Ober, R.J., and Ward, E.S. (1997). Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* *15*, 637–640.
- Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 594–606.
- Gondek, D.C., DeVries, V., Nowak, E.C., Lu, L.-F., Bennett, K.A., Scott, Z.A., and Noelle, R.J. (2008). Transplantation Survival Is Maintained by Granzyme B+ Regulatory Cells and Adaptive Regulatory T Cells. *J. Immunol.* *181*, 4752–4760.
- Green, J.M., Noel, P.J., Sperling, A.I., Walunas, T.L., Gray, G.S., Bluestone, J.A., and Thompson, C.B. (1994). Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* *1*, 501–508.
- Grieger, J.C., Soltys, S.M., and Samulski, R.J. (2016). Production of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector From the Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *24*, 287–297.
- Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., et al. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* *3*, 1097–1101.
- Gu, P., Fang Gao, J., D'Souza, C.A., Kowalczyk, A., Chou, K.-Y., and Zhang, L. (2012). Trogocytosis of CD80 and CD86 by induced regulatory T cells. *Cell. Mol. Immunol.* *9*, 136–146.
- Guo, F., Iclozan, C., Suh, W.-K., Anasetti, C., and Yu, X.-Z. (2008). CD28 Controls Differentiation of Regulatory T Cells from Naive CD4 T Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 2285–2291.
- György, B., Sage, C., Indzhukulian, A.A., Scheffer, D.I., Brisson, A.R., Tan, S., Wu, X., Volak, A., Mu, D., Tamvakologos, P.I., et al. (2017). Rescue of Hearing by Gene Delivery to Inner-Ear Hair Cells Using Exosome-Associated AAV. *Mol. Ther.* *25*, 379–391.
- Hacein-Bey-Abina, S., Kalle, C.V., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., et al. (2003). LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science* *302*, 415–419.
- Hajjar, R.J., Zsebo, K., Deckelbaum, L., Thompson, C., Rudy, J., Yaroshinsky, A., Ly, H., Kawase, Y., Wagner, K., Borow, K., et al. (2008). Design of a phase 1/2 trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with heart failure. *J. Card. Fail.* *14*, 355–367.
- Halbert, C.L., Standaert, T.A., Wilson, C.B., and Miller, A.D. (1998). Successful Readministration of Adeno-Associated Virus Vectors to the Mouse Lung Requires Transient Immunosuppression during the Initial Exposure. *J. Virol.* *72*, 9795–9805.
- Han, S., Li, S., Brooks, E.D., Masat, E., Leborgne, C., Banugaria, S., Bird, A., Mingozi, F., Waldmann, H., and Koeberl, D. (2015). Enhanced Efficacy from Gene Therapy in Pompe Disease Using Coreceptor Blockade. *Hum. Gene Ther.* *26*, 26–35.

## Références

- Hansen, J., Qing, K., and Srivastava, A. (2001). Infection of Purified Nuclei by Adeno-associated Virus 2. *Mol. Ther.* *4*, 289–296.
- Hardet, R., Chevalier, B., Dupaty, L., Naïmi, Y., Riou, G., Drouot, L., Jean, L., Salvetti, A., Boyer, O., and Adriouch, S. (2016). Oral-tolerization Prevents Immune Responses and Improves Transgene Persistence Following Gene Transfer Mediated by Adeno-associated Viral Vector. *Mol. Ther.* *24*, 87–95.
- Harper, K., Balzano, C., Rouvier, E., Mattéi, M.G., Luciani, M.F., and Golstein, P. (1991). CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J. Immunol.* *147*, 1037–1044.
- Haxhinasto, S., Mathis, D., and Benoist, C. (2008). The AKT–mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J. Exp. Med.* *205*, 565–574.
- Hermonat, P.L. (1994). Down-regulation of the human c-fos and c-myc proto-oncogene promoters by adeno-associated virus Rep78. *Cancer Lett.* *81*, 129–136.
- Herrmann, A.-K., Grosse, S., Börner, K., Krämer, C., Wiedtke, E., Gunkel, M., and Grimm, D. (2018). Impact of the assembly-activating protein (AAP) on molecular evolution of synthetic Adeno-associated virus (AAV) capsids. *Hum. Gene Ther.*
- Herzog, R.W., Hagstrom, J.N., Kung, S.-H., Tai, S.J., Wilson, J.M., Fisher, K.J., and High, K.A. (1997). Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 5804–5809.
- Herzog, R.W., Mount, J.D., Arruda, V.R., High, K.A., and Lothrop, C.D. (2001). Muscle-Directed Gene Transfer and Transient Immune Suppression Result in Sustained Partial Correction of Canine Hemophilia B Caused by a Null Mutation. *Mol. Ther.* *4*, 192–200.
- Herzog, R.W., Fields, P.A., Arruda, V.R., Brubaker, J.O., Armstrong, E., McClintock, D., Bellinger, D.A., Couto, L.B., Nichols, T.C., and High, K.A. (2002). Influence of Vector Dose on Factor IX-Specific T and B Cell Responses in Muscle-Directed Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* *13*, 1281–1291.
- Hodi, F.S., O’Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *363*, 711–723.
- Hoffman, B.E., Dobrzynski, E., Wang, L., Hirao, L., Mingozzi, F., Cao, O., and Herzog, R.W. (2007). Muscle as a Target for Supplementary Factor IX Gene Transfer. *Hum. Gene Ther.* *18*, 603–613.
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., and Taniguchi, T. (2005). Spatiotemporal regulation of MyD88–IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* *434*, 1035–1040.
- Hösel, M., Broxtermann, M., Janicki, H., Esser, K., Arzberger, S., Hartmann, P., Gillen, S., Kleeff, J., Stabenow, D., Odenthal, M., et al. (2012). Toll-like receptor 2-mediated innate immune response in human nonparenchymal liver cells toward adeno-associated viral vectors. *Hepatology* *55*, 287–297.
- Hösel, M., Lucifora, J., Michler, T., Holz, G., Gruffaz, M., Stahnke, S., Zoulim, F., Durantel, D., Heikenwalder, M., Nierhoff, D., et al. (2014). Hepatitis B virus infection enhances susceptibility toward adeno-associated viral vector transduction *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology* *59*, 2110–2120.

## Références

- Hu, C., Cela, R.G., Suzuki, M., Lee, B., and Lipshutz, G.S. (2011). Neonatal helper-dependent adenoviral vector gene therapy mediates correction of hemophilia A and tolerance to human factor VIII. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 2082–2087.
- Huang, Y.-H., Zhu, C., Kondo, Y., Anderson, A.C., Gandhi, A., Russell, A., Dougan, S.K., Petersen, B.-S., Melum, E., Pertel, T., et al. (2015). CEACAM1 regulates TIM-3–mediated tolerance and exhaustion. *Nature* *517*, 386–390.
- Huard, B., Prigent, P., Tournier, M., Bruniquel, D., and Triebel, F. (1995). CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur. J. Immunol.* *25*, 2718–2721.
- Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M.J., Wallweber, H.A., Sasmal, D.K., Huang, J., Kim, J.M., Mellman, I., et al. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* *355*, 1428–1433.
- Ise, W., Kohyama, M., Nutsch, K.M., Lee, H.M., Suri, A., Unanue, E.R., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2010). CTLA-4 suppresses the pathogenicity of self antigen-specific T cells by cell-intrinsic and cell-extrinsic mechanisms. *Nat. Immunol.* *11*, 129–135.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* *11*, 3887–3895.
- Janeway, C.A. (1989). Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *54*, 1–13.
- Kattenhorn, L.M., Tipper, C.H., Stoica, L., Geraghty, D.S., Wright, T.L., Clark, K.R., and Wadsworth, S.C. (2016). Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Liver Disease. *Hum. Gene Ther.* *27*, 947–961.
- Kaufman, H.L., Kohlhapp, F.J., and Zloza, A. (2015). Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 642–662.
- Keir, M.E., Liang, S.C., Guleria, I., Latchman, Y.E., Qipo, A., Albacker, L.A., Koulmanda, M., Freeman, G.J., Sayegh, M.H., and Sharpe, A.H. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* *203*, 883–895.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 677–704.
- Kelich, J.M., Ma, J., Dong, B., Wang, Q., Chin, M., Magura, C.M., Xiao, W., and Yang, W. (2015). Super-resolution imaging of nuclear import of adeno-associated virus in live cells. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* *2*, 15047.
- Khattari, R., Auger, J.A., Griffin, M.D., Sharpe, A.H., and Bluestone, J.A. (1999). Lymphoproliferative disorder in CTLA-4 knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses. *J. Immunol. Baltim. Md* *162*, 5784–5791.
- Kim, E.J., Kwun, J., Gibby, A.C., Hong, J.J., Farris, A.B., Iwakoshi, N.N., Villinger, F., Kirk, A.D., and Knechtle, S.J. (2014). Costimulation blockade alters germinal center responses and prevents antibody-mediated rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *14*, 59–69.

## Références

- Kim, J.M., Rasmussen, J.P., and Rudensky, A.Y. (2007). Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* *8*, 191–197.
- Klocke, K., Sakaguchi, S., Holmdahl, R., and Wing, K. (2016). Induction of autoimmune disease by deletion of CTLA-4 in mice in adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E2383-2392.
- Kong, K.-F., Fu, G., Zhang, Y., Yokosuka, T., Casas, J., Canonigo-Balancio, A.J., Becart, S., Kim, G., Yates, J.R., Kronenberg, M., et al. (2014). Protein Kinase C- $\eta$  Controls CTLA-4-Mediated Regulatory T Cell Function. *Nat. Immunol.* *15*, 465–472.
- Kristjansdottir, H., Steinsson, K., Gunnarsson, I., Gröndal, G., Erlendsson, K., and Alarcón-Riquelme, M.E. (2010). Lower expression levels of the programmed death 1 receptor on CD4+CD25+ T cells and correlation with the PD-1.3A genotype in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *62*, 1702–1711.
- Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* *182*, 459–465.
- Kumar, S.R.P., Hoffman, B.E., Terhorst, C., de Jong, Y.P., and Herzog, R.W. (2017). The Balance between CD8+ T Cell-Mediated Clearance of AAV-Encoded Antigen in the Liver and Tolerance Is Dependent on the Vector Dose. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *25*, 880–891.
- Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 149–159.
- Leibler, C., Thiolat, A., Hénique, C., Samson, C., Pilon, C., Tamagne, M., Pirenne, F., Vingert, B., Cohen, J.L., and Grimbert, P. (2018). Control of Humoral Response in Renal Transplantation by Belatacept Depends on a Direct Effect on B Cells and Impaired T Follicular Helper-B Cell Crosstalk. *J. Am. Soc. Nephrol. ASN.2017060679*.
- Li, C.-W., Lim, S.-O., Xia, W., Lee, H.-H., Chan, L.-C., Kuo, C.-W., Khoo, K.-H., Chang, S.-S., Cha, J.-H., Kim, T., et al. (2016). Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat. Commun.* *7*, 12632.
- Li, H., Lasaro, M.O., Jia, B., Lin, S.W., Haut, L.H., High, K.A., and Ertl, H.C. (2011). Capsid-specific T-cell Responses to Natural Infections With Adeno-associated Viruses in Humans Differ From Those of Nonhuman Primates. *Mol. Ther.* *19*, 2021–2030.
- Lin, J., Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Bell, P., Somanathan, S., and Wilson, J.M. (2009). A new genetic vaccine platform based on an adeno-associated virus isolated from a rhesus macaque. *J. Virol.* *83*, 12738–12750.
- Linsley, P.S., and Golstein, P. (1996). Lymphocyte activation: T-cell regulation by CTLA-4. *Curr. Biol.* *6*, 398–400.
- Linsley, P.S., Greene, J.L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J.A., and Peach, R. (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* *1*, 793–801.
- Lisowski, L., Dane, A.P., Chu, K., Zhang, Y., Cunningham, S.C., Wilson, E.M., Nygaard, S., Grompe, M., Alexander, I.E., and Kay, M.A. (2014). Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. *Nature* *506*, 382–386.

## Références

- LoDuca, P.A., Hoffman, B.E., and Herzog, R.W. (2009). Hepatic gene transfer as a means of tolerance induction to transgene products. *Curr. Gene Ther.* *9*, 104–114.
- Lorain, S., Gross, D.-A., Goyenville, A., Danos, O., Davoust, J., and Garcia, L. (2008). Transient Immunomodulation Allows Repeated Injections of AAV1 and Correction of Muscular Dystrophy in Multiple Muscles. *Mol. Ther.* *16*, 541–547.
- Lu, L., Qian, X.F., Rao, J.H., Wang, X.H., Zheng, S.G., and Zhang, F. (2010). Rapamycin Promotes the Expansion of CD4+ Foxp3+ Regulatory T Cells After Liver Transplantation. *Transplant. Proc.* *42*, 1755–1757.
- Lu, Y., Schneider, H., and Rudd, C.E. (2012). Murine regulatory T cells differ from conventional T cells in resisting the CTLA-4 reversal of TCR stop-signal. *Blood* *120*, 4560–4570.
- Lucas, J.A., Menke, J., Rabacal, W.A., Schoen, F.J., Sharpe, A.H., and Kelley, V.R. (2008). PD-L1 Regulates a Critical Checkpoint for Autoimmune Myocarditis and Pneumonitis in MRL mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 2513–2521.
- Lusby, E., Fife, K.H., and Berns, K.I. (1980). Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* *34*, 402–409.
- Mandelbrot, D.A., McAdam, A.J., and Sharpe, A.H. (1999). B7-1 or B7-2 Is Required to Produce the Lymphoproliferative Phenotype in Mice Lacking Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4 (CTLA-4). *J. Exp. Med.* *189*, 435–440.
- Manning, W.C., Paliard, X., Zhou, S., Pat Bland, M., Lee, A.Y., Hong, K., Walker, C.M., Escobedo, J.A., and Dwarki, V. (1997). Genetic immunization with adeno-associated virus vectors expressing herpes simplex virus type 2 glycoproteins B and D. *J. Virol.* *71*, 7960–7962.
- Manno, C.S., Pierce, G.F., Arruda, V.R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J.J., Rasko, J., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., et al. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* *12*, 342–347.
- Martino, A.T., Suzuki, M., Markusic, D.M., Zolotukhin, I., Ryals, R.C., Moghimi, B., Ertl, H.C.J., Muruve, D.A., Lee, B., and Herzog, R.W. (2011a). The genome of self-complementary adeno-associated viral vectors increases Toll-like receptor 9-dependent innate immune responses in the liver. *Blood* *117*, 6459–6468.
- Martino, A.T., Herzog, R.W., Anegon, I., and Adjali, O. (2011b). Measuring Immune Responses to recombinant AAV Gene Transfer. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *807*, 259–272.
- Masteller, E.L., Chuang, E., Mullen, A.C., Reiner, S.L., and Thompson, C.B. (2000). Structural Analysis of CTLA-4 Function In Vivo. *J. Immunol.* *164*, 5319–5327.
- Mathews, D., Wakwe, W., Kim, S., Lowe, M., Breeden, C., Roberts, M., Farris, A., Strobert, E., Jenkins, J., Larsen, C., et al. (2017). Belatacept Resistant Rejection is Associated with CD28+ Memory CD8 T cells. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *17*, 2285–2299.
- McCaffrey, A.P., Fawcett, P., Nakai, H., McCaffrey, R.L., Ehrhardt, A., Pham, T.-T.T., Pandey, K., Xu, H., Feuss, S., Storm, T.A., et al. (2008). The Host Response to Adenovirus, Helper-dependent Adenovirus, and Adeno-associated Virus in Mouse Liver. *Mol. Ther.* *16*, 931–941.

## Références

- McCarty, D.M. (2008a). Self-complementary AAV Vectors; Advances and Applications. *Mol. Ther.* **16**, 1648–1656.
- McCarty, D.M. (2008b). Self-complementary AAV Vectors; Advances and Applications. *Mol. Ther.* **16**, 1648–1656.
- Mellor, A.L., Chandler, P., Baban, B., Hansen, A.M., Marshall, B., Pihkala, J., Waldmann, H., Cobbold, S., Adams, E., and Munn, D.H. (2004). Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int. Immunol.* **16**, 1391–1401.
- Mendell, J.R., Campbell, K., Rodino-Klapac, L., Sahenk, Z., Shilling, C., Lewis, S., Bowles, D., Gray, S., Li, C., Galloway, G., et al. (2010). Dystrophin Immunity in Duchenne’s Muscular Dystrophy. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1429–1437.
- Mendell, J.R., Rodino-Klapac, L., Sahenk, Z., Malik, V., Kaspar, B.K., Walker, C.M., and Clark, K.R. (2012). Gene Therapy for Muscular Dystrophy: Lessons Learned and Path Forward. *Neurosci. Lett.* **527**, 90–99.
- Mendell, J.R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W.D., Rodino-Klapac, L.R., Prior, T.W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., et al. (2017a). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1713–1722.
- Mendell, J.R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W.D., Rodino-Klapac, L.R., Prior, T.W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., et al. (2017b). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy.
- Mettananda, S., Gibbons, R.J., and Higgs, D.R. (2015).  $\alpha$ -Globin as a molecular target in the treatment of  $\beta$ -thalassemia. *Blood* **125**, 3694–3701.
- Miao, C.H., Snyder, R.O., Schowalter, D.B., Patijn, G.A., Donahue, B., Winther, B., and Kay, M.A. (1998). The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nat. Genet.* **19**, 13–15.
- Mingozi, F., and Büning, H. (2015). Adeno-Associated Viral Vectors at the Frontier between Tolerance and Immunity. *Front. Immunol.* **6**.
- Mingozi, F., Liu, Y.-L., Dobrzynski, E., Kaufhold, A., Liu, J.H., Wang, Y., Arruda, V.R., High, K.A., and Herzog, R.W. (2003). Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer. *J. Clin. Invest.* **111**, 1347–1356.
- Mingozi, F., Meulenberg, J.J., Hui, D.J., Basner-Tschakarjan, E., Hasbrouck, N.C., Edmonson, S.A., Hutnick, N.A., Betts, M.R., Kastelein, J.J., Stroes, E.S., et al. (2009). AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood* **114**, 2077–2086.
- Mitchison, N.A. (1971). The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. I. Measurement of the effect with transferred cells and objections to the local environment hypothesis. *Eur. J. Immunol.* **1**, 10–17.
- Miyazaki, T., Dierich, A., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Independent Modes of Natural Killing Distinguished in Mice Lacking Lag3. *Science* **272**, 405–408.
- Monahan, P.E., Lothrop, C.D., Sun, J., Hirsch, M.L., Kafri, T., Kantor, B., Sarkar, R., Tillson, D.M., Elia, J.R., and Samulski, R.J. (2010). Proteasome Inhibitors Enhance Gene Delivery by AAV Virus Vectors Expressing

## Références

- Large Genomes in Hemophilia Mouse and Dog Models: A Strategy for Broad Clinical Application. *Mol. Ther.* **18**, 1907–1916.
- Monteilhet, V., Saheb, S., Boutin, S., Leborgne, C., Veron, P., Montus, M.-F., Moullier, P., Benveniste, O., and Masurier, C. (2011). A 10 Patient Case Report on the Impact of Plasmapheresis Upon Neutralizing Factors Against Adeno-associated Virus (AAV) Types 1, 2, 6, and 8. *Mol. Ther.* **19**, 2084–2091.
- Moskalenko, M., Chen, L., van Roey, M., Donahue, B.A., Snyder, R.O., McArthur, J.G., and Patel, S.D. (2000). Epitope Mapping of Human Anti-Adeno-Associated Virus Type 2 Neutralizing Antibodies: Implications for Gene Therapy and Virus Structure. *J. Virol.* **74**, 1761–1766.
- Mount, J.D., Herzog, R.W., Tillson, D.M., Goodman, S.A., Robinson, N., McClelland, M.L., Bellinger, D., Nichols, T.C., Arruda, V.R., Lothrop, C.D., et al. (2002). Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood* **99**, 2670–2676.
- Mueller, C., Chulay, J.D., Trapnell, B.C., Humphries, M., Carey, B., Sandhaus, R.A., McElvaney, N.G., Messina, L., Tang, Q., Rouhani, F.N., et al. (2013). Human Treg responses allow sustained recombinant adeno-associated virus-mediated transgene expression. *J. Clin. Invest.* **123**, 5310–5318.
- Mueller, C., Gernoux, G., Gruntman, A.M., Borel, F., Reeves, E.P., Calcedo, R., Rouhani, F.N., Yachnis, A., Humphries, M., Campbell-Thompson, M., et al. (2017). 5 Year Expression and Neutrophil Defect Repair after Gene Therapy in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Mol. Ther.* **25**, 1387–1394.
- Munn, D.H., Shafizadeh, E., Attwood, J.T., Bondarev, I., Pashine, A., and Mellor, A.L. (1999). Inhibition of T Cell Proliferation by Macrophage Tryptophan Catabolism. *J. Exp. Med.* **189**, 1363–1372.
- Murlidharan, G., Crowther, A., Reardon, R.A., Song, J., and Asokan, A. (2016). Glymphatic fluid transport controls paravascular clearance of AAV vectors from the brain. *JCI Insight* **1**, e88034.
- Nathwani, A.C., Gray, J.T., Ng, C.Y.C., Zhou, J., Spence, Y., Waddington, S.N., Tuddenham, E.G.D., Kembell-Cook, G., McIntosh, J., Boon-Spijker, M., et al. (2006). Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* **107**, 2653–2661.
- Nathwani, A.C., Tuddenham, E.G.D., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D.C., Chowdary, P., Riddell, A., Pie, A.J., Harrington, C., et al. (2011a). Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2357–2365.
- Nathwani, A.C., Rosales, C., McIntosh, J., Rastegarlar, G., Nathwani, D., Raj, D., Nawathe, S., Waddington, S.N., Bronson, R., Jackson, S., et al. (2011b). Long-term Safety and Efficacy Following Systemic Administration of a Self-complementary AAV Vector Encoding Human FIX Pseudotyped With Serotype 5 and 8 Capsid Proteins. *Mol. Ther.* **19**, 876–885.
- Nathwani, A.C., Reiss, U.M., Tuddenham, E.G.D., Rosales, C., Chowdary, P., McIntosh, J., Della Peruta, M., Lheriteau, E., Patel, N., Raj, D., et al. (2014). Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1994–2004.
- Nault, J.-C., Datta, S., Imbeaud, S., Franconi, A., Mallet, M., Couchy, G., Letouzé, E., Pilati, C., Verret, B., Blanc, J.-F., et al. (2015). Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat. Genet.* **47**, 1187–1193.

## Références

- Nayak, S., Cao, O., Hoffman, B.E., Cooper, M., Zhou, S., Atkinson, M.A., and Herzog, R.W. (2009). Prophylactic immune tolerance induced by changing the ratio of antigen-specific effector to regulatory T cells. *J. Thromb. Haemost. JTH* 7, 1523–1532.
- Nicolson, S.C., and Samulski, R.J. (2014). Recombinant Adeno-Associated Virus Utilizes Host Cell Nuclear Import Machinery To Enter the Nucleus. *J. Virol.* 88, 4132–4144.
- Nishimura, H., Honjo, T., and Minato, N. (2000). Facilitation of  $\beta$  Selection and Modification of Positive Selection in the Thymus of Pd-1–Deficient Mice. *J. Exp. Med.* 191, 891–898.
- Nonnenmacher, M., and Weber, T. (2011). Adeno-Associated Virus 2 Infection Requires Endocytosis through the CLIC/GEEC Pathway. *Cell Host Microbe* 10, 563–576.
- Nowrouzi, A., Penaud-Budloo, M., Kaepfel, C., Appelt, U., Le Guiner, C., Moullier, P., Kalle, C. von, Snyder, R.O., and Schmidt, M. (2012). Integration Frequency and Intermolecular Recombination of rAAV Vectors in Non-human Primate Skeletal Muscle and Liver. *Mol. Ther.* 20, 1177–1186.
- Ogston, P., Raj, K., and Beard, P. (2000). Productive Replication of Adeno-Associated Virus Can Occur in Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) Episome-Containing Keratinocytes and Is Augmented by the HPV-16 E2 Protein. *J. Virol.* 74, 3494–3504.
- Oishi, M., Nagatsugi, F., Sasaki, S., Nagasaki, Y., and Kataoka, K. (2005). Smart polyion complex micelles for targeted intracellular delivery of PEGylated antisense oligonucleotides containing acid-labile linkages. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 6, 718–725.
- Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S. (2008). Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10113–10118.
- Ozkaynak, E., Wang, L., Goodearl, A., McDonald, K., Qin, S., O'Keefe, T., Duong, T., Smith, T., Gutierrez-Ramos, J.-C., Rottman, J.B., et al. (2002). Programmed death-1 targeting can promote allograft survival. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 169, 6546–6553.
- Parish, I.A., Rao, S., Smyth, G.K., Juelich, T., Denyer, G.S., Davey, G.M., Strasser, A., and Heath, W.R. (2009). The molecular signature of CD8+ T cells undergoing deletional tolerance. *Blood* 113, 4575–4585.
- Park, K.-J., Lee, J., Park, J.-H., Joh, J.-W., Kwon, C.H.D., and Kim, J.-W. (2016). Adeno-Associated Virus 2-Mediated Hepatocellular Carcinoma is Very Rare in Korean Patients. *Ann. Lab. Med.* 36, 469–474.
- Paterson, A.M., Lovitch, S.B., Sage, P.T., Juneja, V.R., Lee, Y., Trombley, J.D., Arancibia-Cárcamo, C.V., Sobel, R.A., Rudensky, A.Y., Kuchroo, V.K., et al. (2015). Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity. *J. Exp. Med.* 212, 1603–1621.
- Pedros, C., Canonigo-Balancio, A.J., Kong, K.-F., and Altman, A. Requirement of Treg-intrinsic CTLA4/PKC $\eta$  signaling pathway for suppressing tumor immunity. *JCI Insight* 2.
- Perez-Witzke, D., Miranda-García, M.A., Suárez, N., Becerra, R., Duque, K., Porras, V., Fuenmayor, J., and Montano, R.F. (2016). CTLA4Fc $\epsilon$ , a novel soluble fusion protein that binds B7 molecules and the IgE receptors, and reduces human in vitro soluble CD23 production and lymphocyte proliferation. *Immunology* 148, 40–55.

## Références

- Pillay, S., Meyer, N.L., Puschnik, A., Davulcu, O., Diep, J., Ishikawa, Y., Jae, L.T., Wosen, J.E., Nagamine, C.M., Chapman, M., et al. (2016). An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature* 530, 108–112.
- Poon, M.-W., Tsang, W.-H., Chan, S.-O., Li, H.-M., Ng, H.-K., and Waye, M.M.-Y. (2011). Dyslexia-Associated Kiaa0319-Like Protein Interacts with Axon Guidance Receptor Nogo Receptor 1. *Cell. Mol. Neurobiol.* 31, 27–35.
- Pyzik, M., and Piccirillo, C.A. (2007). TGF-beta1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets. *J. Leukoc. Biol.* 82, 335–346.
- Quandt, D., Hoff, H., Rudolph, M., Fillatreau, S., and Brunner-Weinzierl, M.C. (2007). A New Role of CTLA-4 on B Cells in Thymus-Dependent Immune Responses In Vivo. *J. Immunol.* 179, 7316–7324.
- Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., et al. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332, 600–603.
- Rabinowitz, J.E., and Samulski, R.J. (2000). Building a Better Vector: The Manipulation of AAV Virions. *Virology* 278, 301–308.
- Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G., Wilson, J.M., and Batshaw, M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 80, 148–158.
- Razmara, M., Hilliard, B., Ziarani, A.K., Chen, Y.H., and Tykocinski, M.L. (2008). CTLA-4-Ig converts naive CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 20, 471–483.
- Rogers, G.L., Martino, A.T., Aslanidi, G.V., Jayandharan, G.R., Srivastava, A., and Herzog, R.W. (2011). Innate Immune Responses to AAV Vectors. *Front. Microbiol.* 2.
- Rogers, G.L., Suzuki, M., Zolotukhin, I., Markusic, D.M., Morel, L.M., Lee, B., Ertl, H.C.J., and Herzog, R.W. (2015). Unique Roles of TLR9- and MyD88-Dependent and -Independent Pathways in Adaptive Immune Responses to AAV-Mediated Gene Transfer. *J. Innate Immun.* 7, 302–314.
- Rollins, M.R., and Gibbons Johnson, R.M. (2017). CD80 Expressed by CD8+ T Cells Contributes to PD-L1-Induced Apoptosis of Activated CD8+ T Cells. *J. Immunol. Res.* 2017.
- Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M.K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* 212, 28–50.
- Sabatos, C.A., Chakravarti, S., Cha, E., Schubart, A., Sánchez-Fueyo, A., Zheng, X.X., Coyle, A.J., Strom, T.B., Freeman, G.J., and Kuchroo, V.K. (2003). Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 4, 1102–1110.
- Sakaguchi, T.T. and S. (2003). Naturally Arising CD25+CD4+ Regulatory T Cells in Maintaining Immunologic Self-Tolerance and Preventing Autoimmune Disease.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133, 775–787.

## Références

- Santiago-Ortiz, J.L., and Schaffer, D.V. (2016). Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *240*, 287–301.
- Schlehofer, J.R., Ehrbar, M., and zur Hausen, H. (1986). Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus. *Virology* *152*, 110–117.
- Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Santra, S., Sasseville, V.G., Simon, M.A., Lifton, M.A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B.J., et al. (1999). Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* *283*, 857–860.
- Schneider, H., and Coutelle, C. (1999). *In utero* gene therapy: The case for.
- Schneider, H., Downey, J., Smith, A., Zinselmeyer, B.H., Rush, C., Brewer, J.M., Wei, B., Hogg, N., Garside, P., and Rudd, C.E. (2006). Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science* *313*, 1972–1975.
- Schnepf, B.C., Clark, K.R., Klemanski, D.L., Pacak, C.A., and Johnson, P.R. (2003). Genetic Fate of Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Genomes in Muscle. *J. Virol.* *77*, 3495–3504.
- Schnepf, B.C., Jensen, R.L., Clark, K.R., and Johnson, P.R. (2009). Infectious Molecular Clones of Adeno-Associated Virus Isolated Directly from Human Tissues. *J. Virol.* *83*, 1456–1464.
- Sciorati, C., Rigamonti, E., Manfredi, A.A., and Rovere-Querini, P. (2016). Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. *Cell Death Differ.* *23*, 927–937.
- Selot, R., Arumugam, S., Mary, B., Cheemadan, S., and Jayandharan, G.R. (2017). Optimized AAV rh.10 Vectors That Partially Evade Neutralizing Antibodies during Hepatic Gene Transfer. *Front. Pharmacol.* *8*.
- Shen, F., Kuo, R., Milon-Camus, M., Han, Z., Jiang, L., Young, W.L., and Su, H. (2013). Intravenous delivery of AAV9 vector mediates effective gene expression in ischemic stroke lesion and brain angiogenic foci. *Stroke J. Cereb. Circ.* *44*, 252–254.
- Sidiropoulos, P.I., and Boumpas, D.T. (2004). Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* *13*, 391–397.
- Sim, J.H., Park, M.J., Park, S., and Lee, E.-S. (2011). Altered expression of costimulatory molecules in Behçet's disease according to clinical activity. *Br. J. Dermatol.* *164*, 1285–1291.
- Siva, K., Covello, G., and Denti, M.A. (2014). Exon-Skipping Antisense Oligonucleotides to Correct Missplicing in Neurogenetic Diseases. *Nucleic Acid Ther.* *24*, 69–86.
- Smith, A.J., Schlichtenbrede, F.C., Tschernutter, M., Bainbridge, J.W., Thrasher, A.J., and Ali, R.R. (2003). AAV-Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa. *Mol. Ther.* *8*, 188–195.
- Snyder, R.O. (1999). Adeno-associated virus-mediated gene delivery. *J. Gene Med.* *1*, 166–175.
- Snyder, R.O., Miao, C.H., Patijn, G.A., Spratt, S.K., Danos, O., Nagy, D., Gown, A.M., Winther, B., Meuse, L., Cohen, L.K., et al. (1997). Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat. Genet.* *16*, 270–276.

## Références

- Song, M., Chen, D., Lu, B., Wang, C., Zhang, J., Huang, L., Wang, X., Timmons, C.L., Hu, J., Liu, B., et al. (2013). PTEN Loss Increases PD-L1 Protein Expression and Affects the Correlation between PD-L1 Expression and Clinical Parameters in Colorectal Cancer. *PLoS ONE* *8*.
- Song, M.-Y., Hong, C.-P., Park, S.J., Kim, J.-H., Yang, B.-G., Park, Y., Kim, S.W., Kim, K.S., Lee, J.Y., Lee, S.-W., et al. (2015). Protective effects of Fc-fused PD-L1 on two different animal models of colitis. *Gut* *64*, 260–271.
- Sonkoly, E., Janson, P., Majuri, M.-L., Savinko, T., Fyhrquist, N., Eidsmo, L., Xu, N., Meisgen, F., Wei, T., Bradley, M., et al. (2010). MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Allergy Clin. Immunol.* *126*, 581-589.e20.
- Stallone, G., Infante, B., Di Lorenzo, A., Rascio, F., Zaza, G., and Grandaliano, G. (2016). mTOR inhibitors effects on regulatory T cells and on dendritic cells. *J. Transl. Med.* *14*.
- Subudhi, S.K., Zhou, P., Yerian, L.M., Chin, R.K., Lo, J.C., Anders, R.A., Sun, Y., Chen, L., Wang, Y., Alegre, M.-L., et al. (2004). Local expression of B7-H1 promotes organ-specific autoimmunity and transplant rejection.
- Summerford, C., and Samulski, R.J. (2016). AAVR: A Multi-Serotype Receptor for AAV. *Mol. Ther.* *24*, 663–666.
- Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces *Foxp3* expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat. Immunol.* *6*, 152–162.
- Tang, Q., Boden, E.K., Henriksen, K.J., Bour-Jordan, H., Bi, M., and Bluestone, J.A. (2004). Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* *34*, 2996–3005.
- Tang, Y., Cummins, J., Huard, J., and Wang, B. (2010). AAV-directed muscular dystrophy gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* *10*, 395–408.
- Thomson, A.W., and Knolle, P.A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 753–766.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J. Exp. Med.* *188*, 287–296.
- Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., and Sharpe, A.H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* *3*, 541–547.
- Tivol, E.A., Boyd, S.D., McKeon, S., Borriello, F., Nickerson, P., Strom, T.B., and Sharpe, A.H. (1997). CTLA4Ig prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction in CTLA-4-deficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *158*, 5091–5094.
- Tseng, Y.-S., Gurda, B.L., Chipman, P., McKenna, R., Afione, S., Chiorini, J.A., Muzyczka, N., Olson, N.H., Baker, T.S., Kleinschmidt, J., et al. (2014). Adeno-Associated Virus Serotype 1 (AAV1)- and AAV5-Antibody Complex Structures Reveal Evolutionary Commonalities in Parvovirus Antigenic Reactivity. *J. Virol.* *89*, 1794–1808.

## Références

- Tsutsumi, Y., Jie, X., Ihara, K., Nomura, A., Kanemitsu, S., Takada, H., and Hara, T. (2006). Phenotypic and genetic analyses of T-cell-mediated immunoregulation in patients with Type 1 diabetes. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* *23*, 1145–1150.
- Turnis, M.E., Sawant, D.V., Szymczak-Workman, A.L., Andrews, L.P., Delgoffe, G.M., Yano, H., Beres, A.J., Vogel, P., Workman, C.J., and Vignali, D.A.A. (2016). Interleukin-35 limits anti-tumor immunity. *Immunity* *44*, 316–329.
- Velazquez, V.M., Bowen, D.G., and Walker, C.M. (2009). Silencing of T lymphocytes by antigen-driven programmed death in recombinant adeno-associated virus vector-mediated gene therapy. *Blood* *113*, 538–545.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 523–532.
- Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* *1*, 405–413.
- Wan, B., Nie, H., Liu, A., Feng, G., He, D., Xu, R., Zhang, Q., Dong, C., and Zhang, J.Z. (2006). Aberrant Regulation of Synovial T Cell Activation by Soluble Costimulatory Molecules in Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol.* *177*, 8844–8850.
- Wang, L., Dobrzynski, E., Schlachterman, A., Cao, O., and Herzog, R.W. (2005). Systemic protein delivery by muscle-gene transfer is limited by a local immune response. *Blood* *105*, 4226–4234.
- Wang, L.-L., Li, Z.-H., Hu, X.-H., Muyayalo, K.P., Zhang, Y.-H., and Liao, A.-H. (2017). The roles of the PD-1/PD-L1 pathway at immunologically privileged sites. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* *1989* 78.
- Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., and Mak, T.W. (1995). Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in *Ctla-4*. *Science* *270*, 985–988.
- Wawrzyniak, M., O'Mahony, L., and Akdis, M. (2017). Role of Regulatory Cells in Oral Tolerance. *Allergy Asthma Immunol. Res.* *9*, 107–115.
- Williams, J.A., Zhang, J., Jeon, H., Nitta, T., Ohigashi, I., Klug, D., Kruhlak, M.J., Choudhury, B., Sharrow, S.O., Granger, L., et al. (2014). Thymic medullary epithelium and thymocyte self tolerance require cooperation between CD28-CD80/86 and CD40-CD40L costimulatory pathways. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *192*, 630–640.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science* *322*, 271–275.
- Xiao, W., Warrington, K.H., Hearing, P., Hughes, J., and Muzyczka, N. (2002). Adenovirus-Facilitated Nuclear Translocation of Adeno-Associated Virus Type 2. *J. Virol.* *76*, 11505–11517.
- Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Yamazaki, S., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S., et al. (2004). Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* *16*, 1643–1656.

## Références

- Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., Okumura, K., et al. (2002). Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *J. Immunol.* *169*, 5538–5545.
- Yan, Z., Zak, R., Zhang, Y., and Engelhardt, J.F. (2005). Inverted Terminal Repeat Sequences Are Important for Intermolecular Recombination and Circularization of Adeno-Associated Virus Genomes. *J. Virol.* *79*, 364–379.
- Yu, X., Harden, K., Gonzalez, L.C., Francesco, M., Chiang, E., Irving, B., Tom, I., Ivelja, S., Refino, C.J., Clark, H., et al. (2009). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* *10*, 48–57.
- Zaiss, A.-K., Liu, Q., Bowen, G.P., Wong, N.C.W., Bartlett, J.S., and Muruve, D.A. (2002). Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* *76*, 4580–4590.
- Zarek, P.E., Huang, C.-T., Lutz, E.R., Kowalski, J., Horton, M.R., Linden, J., Drake, C.G., and Powell, J.D. (2008). A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* *111*, 251–259.
- Zhang, H., Watanabe, R., Berry, G.J., Vaglio, A., Liao, Y.J., Warrington, K.J., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2017). Immunoinhibitory checkpoint deficiency in medium and large vessel vasculitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201616848.
- Zhang, J., Ding, M., Xu, K., Mao, L., and Zheng, J. (2016). shRNA-armed conditionally replicative adenoviruses: a promising approach for cancer therapy. *Oncotarget* *7*, 29824–29834.
- Zhang, Y., Maksimovic, J., Naselli, G., Qian, J., Chopin, M., Blewitt, M.E., Oshlack, A., and Harrison, L.C. (2013). Genome-wide DNA methylation analysis identifies hypomethylated genes regulated by FOXP3 in human regulatory T cells. *Blood* *122*, 2823–2836.
- Zhao, Y., Harrison, D.L., Song, Y., Ji, J., Huang, J., and Hui, E. (2018). Antigen-Presenting Cell-Intrinsic PD-1 Neutralizes PD-L1 in cis to Attenuate PD-1 Signaling in T Cells. *Cell Rep.* *24*, 379-390.e6.
- Zheng, S.G., Wang, J.H., Stohl, W., Kim, K.S., Gray, J.D., and Horwitz, D.A. (2006). TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 3321–3329.
- Zhou, H., Xiong, L., Wang, Y., Ding, L., Hu, S., Zhao, M., and Zhou, L. (2016). Treatment of murine lupus with PD-L1g. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *162*, 1–8.
- Zhu, C., Anderson, A.C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S.J., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Kuchroo, V.K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* *6*, 1245–1252.
- Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y. (2009). The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 2388–2398.
- Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection. *Mol. Ther.* *16*, 1073–1080.

## Références

dans le document actif.