



Etude des réponses lymphocytaires T conventionnelles et d'une nouvelle stratégie immuno-modulatrice après transfert de gène intraoculaire

Gaelle Chauveau

► To cite this version:

Gaelle Chauveau. Etude des réponses lymphocytaires T conventionnelles et d'une nouvelle stratégie immuno-modulatrice après transfert de gène intraoculaire. Santé. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL086 . tel-03579599

HAL Id: tel-03579599

<https://theses.hal.science/tel-03579599>

Submitted on 18 Feb 2022

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.

Etude des réponses lymphocytaires T conventionnelles et d'une nouvelle stratégie immuno-modulatrice après transfert de gène intraoculaire

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n° 577

Structure et Dynamiques des Systèmes vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Univ Evry, Inserm, Généthon, Integrare
research unit UMR_S951, 91000, Evry-Courcouronnes, France.

Référent : Université d'Evry Val d'Essonne

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 24/11/21, par

Gaëlle CHAUMEAU

Composition du Jury

Bahram BODAGHI

PU-PH en ophtalmologie, Hôpital universitaire La Pitié Salpêtrière

Rapporteur

Guillaume DOROTHEE

Directeur de recherche INSERM, Paris

Rapporteur

Bruno COLOMBO

Professeur d'Immunologie, Université d'Evry Val d'Essonne

Président
Examineur

Catherine VIGNAL-CLERMONT

Docteur en Ophtalmologie, Fondation Ophtalmologique Adolphe de
Rothschild, Paris

Examineur

Encadrement

Sylvain FISSON

Professeur d'immunologie, Université d'Evry Val d'Essonne

Directeur de thèse

Deniz DALKARA

Directrice de recherche INSERM, Institut de la Vision, Paris

Co-encadrante

REMERCIEMENTS

Au cours de ces 4 années passées, j'ai eu le plaisir, la chance de rencontrer et de côtoyer beaucoup de personnes, qui m'ont apporté leur aide et leur soutien, aussi bien scientifiquement que personnellement parlant. Toutes ces personnes, à différents niveaux, auront contribué à faire de cette thèse ce qu'elle est et je tiens à tous les remercier.

Tout d'abord, je souhaite remercier Anne Galy. Merci de m'avoir accueilli en 2017 pour mon stage de M2, et pour ces 4 années de thèse. Vos commentaires et questions en réunion m'ont poussée à mieux appréhender mon sujet, en connaître tous les détails. Vos propositions et questions « challenge » ont permis de faire avancer mon projet et m'ont permis de m'affirmer en tant que jeune chercheuse.

Ensuite mes remerciements vont à Catherine Vignal-Clermont et Benoît Salomon, qui ont accepté de suivre mon projet lors de mes comités de thèse. Nos discussions, vos commentaires et vos propositions, toujours très constructives et pertinentes, ont très largement contribué à l'avancée de mon travail de thèse.

Je remercie mes rapporteurs, Bahram Bodaghi et Guillaume Dorothée, pour le temps que vous avez consacré à ce mémoire de thèse. J'espère sincèrement qu'il vous plaira et je suis impatiente de pouvoir échanger avec vous sur son contenu lors de la soutenance.

Je remercie aussi vivement mes examinateurs, Bruno Colombo et Catherine Vignal-Clermont, pour avoir accepté de faire partie de mon jury. J'espère répondre à vos questions et échanger de manière constructive lors de la soutenance.

Je remercie la Fondation de France, ses donateurs et les membres de l'allocation jeunes chercheurs en Ophtalmologie et Neuro-Ophtalmologie 2020. Cette bourse m'a permis de finaliser dans le meilleur des conditions ma thèse.

Sylvain, les mots ne suffiront pas pour te remercier comme il se doit. Tu m'as donné une chance lorsque j'étais en Master 2, avec un sujet passionnant, prometteur, plein de perspectives qui se sont transformées en 4 années de thèse, cela fait donc 5 ans que l'on se connaît ! Je te remercie pour ta disponibilité malgré ton emploi du temps plus que chargé, mais aussi pour la confiance que tu m'as accordée, tes encouragements et ta bonne humeur quasi-quotidienne. Ton encadrement, tes connaissances, tes remarques, ta remise en question perpétuelle et ton tempérament très pointilleux ont été un réel *challenge* pour moi. Cela m'a permis d'étayer mes réflexions sur mon sujet et de me transcender en tant que jeune chercheuse. Merci d'avoir cru en moi pour nous deux, en effet parfois cela n'a pas toujours été une évidence pour moi-même particulièrement lors de cette dernière année... Merci d'avoir vu en moi des qualités et compétences insoupçonnées ou qui ne demandaient qu'à éclore. Tu m'as beaucoup appris sur les relations professionnelles et les attitudes et actions à adopter face à telle ou telle situation, merci de m'avoir formée au mieux pour mon avenir professionnel. Je retiens et appliquerais toujours ton mantra « A chaque problème une solution. S'il n'y a pas de solution, c'est qu'il n'y a pas de problème ! ». Celui-ci m'a permis d'évoluer professionnellement mais aussi personnellement, j'ai tendance à beaucoup plus relativiser maintenant. Enfin ta soif d'apprendre

et ton don pour l'enseignement font de toi un excellent formateur, chaque expérience est une occasion nouvelle d'apprendre, de progresser et de s'améliorer. Tu as été un excellent formateur, accompagnateur et encadrant. Il faudrait des pages pour te remercier comme il se doit, mais j'espère que tu comprends ce que je veux dire dans ces quelques lignes.

Je te remercie Deniz pour avoir co-encadré ma thèse avec un regard bienveillant. Merci d'avoir relu mon mémoire, tes commentaires et remarques pertinentes lors des réunions m'ont fait progresser, mon projet et moi-même.

Julie, ancienne doctorante, tu as été mon maître Yoda lors de mon stage et de mon début de thèse. Tu m'as formée lors de mon stage de M2 et nous avons partagé plusieurs mois de thèse ainsi que quelques papiers ! Je te remercie pour m'avoir enseigné tout ce que tu savais en matière d'expérimentation *in vivo* et d'*immunomonitoring*. Nos discussions sur le monde équin (Torpille et ses aventures quotidiennes) et bien plus encore auront été très agréables. Tu as été une excellente pédagogue, je te souhaite une très belle continuation.

Audrey, tu es entrée dans notre micro-équipe en tant que stagiaire, tu as été une bouffée d'air pur (« rafraîchissante », j'espère que tu as la réf), un renouveau dans la *team* des « dodues » ! Ton arrivée m'a permis d'exploiter mon plein potentiel d'apprenti-encadrante et enseignante. Merci pour tout le travail que tu as fourni pendant ton stage et en tant qu'AI à mes côtés. Sache que tu es une excellente scientifique et une très belle personne. Personnellement, tu es celle qui m'a fait le plus rire dernièrement, donc encore un grand merci à toi. Tu es une jeune femme formidable et inspirante, parler avec toi est toujours apaisant, hilarant ou instructif. J'espère que tu réaliseras tous tes souhaits dans ta vie future, tu le mérites. Enfin je ne m'excuserai jamais pour t'avoir rendue accro à *Outlander*.

Merci à Hanna et DuoHao, des stagiaires de choc qui ont contribué, chacun à leur manière, à mon projet de thèse mais aussi à mon évolution en tant que chercheuse. Aider à votre encadrement et à l'apprentissage de la vie en laboratoire aura été un très bon enseignement. DuoHao, je te souhaite plein de courage pour les 3 prochaines années qui t'attendent. J'espère que la thèse te permettra de t'épanouir sur le plan professionnel et personnel.

Merci à Cardillia, Barcelone nous aura permis de nous découvrir et le confinement de devenir de vraies amies. J'espère qu'un jour tu pourras me faire découvrir l'Inde ☺ Merci de m'avoir enseigné l'art de la dissection des rétines et beaucoup de connaissances en Optogénétique et thérapie génique oculaire. Catherine on a commencé au Généthon ensemble en stage, je te souhaite une super fin de thèse et n'oublie pas de manger le midi (même si tu as beaucoup de manip'). Merci au reste à l'ensemble de l'équipe 15 de l'IDV dont Camille, Hanen, Mélissa et Mugue. Cette équipe très dynamique et accueillante a été un vrai bonheur à côtoyer au labo et en dehors lors des repas d'équipe, *Escape Game* et *Secret Santa*.

Je remercie aussi, Knight Scientific, en la personne de Jan Knight qui m'a fait confiance pour mener un projet de « A à Z ». Ce projet annexe qui a été captivant, m'a fait grandir et prendre conscience de mes capacités et compétences en tant que chercheuse. Merci aussi à Scott et Gage

pour vos précieuses analyses des milliers de fichiers ABEL. Pardon pour mon anglais approximatif, qui je l'espère se sera amélioré après presque 2 ans de collaboration.

Vient ensuite la *team* "Science is Sexy", Soso' et Fetta. Ces années de thèse n'auraient jamais pu être ce qu'elles ont été sans vous deux et votre soutien, alors 1000 mercis ! **Sophie** ou la maman rayon de soleil, depuis le début où je n'étais encore qu'une "bébé moisissure", tu as été très attentionnée et gentille envers moi. Nos pauses discussions, goûters et sorties (*shopping* ou au restaurant) auront été une parenthèse très très agréable (et parfois salutaire). Je suis triste que nos projets "Bar à *Mojito*" et "Une TV au labo" n'aient pas été réalisés. La règle d'or est et restera "Si on ne sait pas, on demande à Sophie !". **Fetta**, tu es mon deuxième rayon de soleil, le radeau auquel j'ai pu me rattacher pendant la tempête. Utiliser des mots pour décrire notre relation ne serait pas assez fort, mais merci d'avoir été là pour moi dès le premier jour. Merci pour ta folie (folie que je partage), nos fous rires, nos sorties *shopping*/gourmandes, nos visios de confinement, nos soirées Koko et nos heures de discussions enflammées. J'espère avoir pu te rendre autant de joie, d'amour maternel-sororal, de folie et de soutien que tu m'as apporté. Ce n'est pas parce que je vais quitter le navire que le "nous" s'arrête, bien au contraire ! On va pouvoir rayer quelques lignes de nos *bucket list* ensemble ! J'ai hâte de découvrir ta Kabylie natale et la Grèce (notre objectif pour 2022), d'apprendre encore pleins de mots/phrases Kabyles mais aussi de te faire découvrir mon p'tit bout de campagne et t'apprendre pleins d'expressions patoises pour que tu sois la plus intégrée des Tizi Ouziennes.

Ensuite merci au reste de l'équipe IMBI, Valentina je n'aurais pas beaucoup progressé en Italien mais l'envie reste ! Heureusement, j'ai progressé dans la réalisation de spécialités Italiennes. Merci pour ton soutien et tes encouragements. Maxime, mon critique culinaire préféré : toujours honnête et constructif ☺. On attend toujours ta compote de pommes ! Merci pour tes blagues sans relâche et ton aide en immuno'. Merci aussi à Marina, Céline, Maguy et Guillaume.

Je remercie les ex-IMBI et/ou associés, avec qui on a partagé de supers moments, Antoine (merci pour l'apport de rigolade et de glucide régulier), Khalil (mon premier voisin de bureau et la force tranquille de l'équipe), Romuald (on a commencé la thèse ensemble, progressé sans nos maîtres-thésards dans nos projets mais aussi aux mots fléchés !!!), Youna (ma collègue de thèse et fournisseur officiel de repas lors de mes journées *de la muerte*), Laetitia (une geek-scientifique à qui on peut toujours parler !), Emilie (j'attends ta recette du Pithiviers), Alice, Mirella et l'équipe IMF. Il y a aussi Esther, Pierre-Romain, Céline, Sandrine, Greg, Ariane et Camille merci pour les discussions et les pauses « café » et/ou « 20 minutes », tous, vous avez rendu la vie de labo si agréable.

Je remercie la plateforme de bioexpérimentation et plus particulièrement Adeline, Béatrice et Laetitia pour leur patience, le partage de leur *savoir faire* dans le monde de l'expérimentation *in vivo* et les heures d'injections sous-ret' sans quoi rien n'aurait été possible.

Je tiens à remercier la plateforme d'Histologie, notamment Fanny et Bernard pour m'avoir formée aux techniques d'histo (de la coupe à la coloration) et aux nombreuses congélations.

Je remercie aussi la plateforme de Cytométrie et d'Imagerie. Merci Peggy d'avoir partagé ton immense savoir sur la cytométrie, tu es un très pédagogue et rend compréhensible facilement ce monde qui me paraissait lointain. Merci aussi pour ton aide lors des expérimentations de cytotoxicité *in vivo*. Jérémie, membre fondateur des « gros bonnets », merci pour tes blagues. Tu es un puit de savoir, intéressé par tout, ce qui a rendu nos conversations (scientifiques et non scientifiques) passionnantes et très souvent hilarantes. Je te retiens pour les crises cardiaques à répétitions et les nombreux logos « Toxique » collés dans mon dos lorsque j'étais absorbée dans mes tableaux *excel* ! (Sur ton prochain album je veux que la chanson « Flowjob » apparaisse.)

Tiffany, je te remercie mille fois. Tu es mon modèle depuis le master à Brest, l'admiration que je te porte en tant que scientifique m'a inspirée et poussée à devenir une meilleure chercheuse. Bien sûr au-delà d'être mon modèle "scientifique", tu es mon amie de galère de thèse et bien plus encore. Tu as tellement à apporter dans le domaine des sciences, le monde scientifique n'a qu'à bien se tenir, Dr Bergot vient tout juste d'entrer dans le *game*. Sache que peu importe le nombre de kilomètres qui nous séparent, nous réaliserons nos rêves ensemble. Je compte bien te rendre visite un grand nombre de fois en terres anglaises.

ALICE & CHLOÉ Les coupines, évidemment que je dois vous remercier !!! On se connaît depuis la L1 de Biologie, et entre « une plantovore qui lèche des cailloux » (merci la géologie), une « peintre-juriste » et moi « la scientifique-covoitureuse de l'extrême-dresseuse de Goëlands », on forme une belle brochette depuis tant d'années (je vous laisse faire le compte des années passées ensemble, cela ne nous rajeunit pas ...). Merci de m'avoir soutenue depuis tout ce temps, de ne jamais avoir rompu notre lien que j'affectionne (de manière non quantifiable), d'avoir été mes mères de substitution pendant le confinement en solo à Evry, d'avoir organisé quelques petites escapades et de nombreuses virées shopping (les bijoux tmtc ma chloporte). Je n'oublie pas Pyrite et les magnifiques clichés de ce chat-chien d'amour ma lilice ! J'espère que vous apprécierez mon respect scrupuleux de votre cahier des charges pour ces remerciements, estimez-vous chanceuses, vous êtes des privilégiées.

Charlotte, ma soeur de coeur, te remercier est un mot bien trop faible pour exprimer tout ce que je ressens pour toi. On se connaît depuis tant d'années, j'aime à dire "TROP d'années" mais c'est faux, on aura jamais assez d'années ensemble. C'est pourquoi notre projet de vie commune dans une maison avec une piscine et une bibliothèque immense, puis en maison de retraite à deux, me comblerait de bonheur. Merci pour ton soutien sans relâche, ton émerveillement à mon égard et pour mon travail, cela me remplit de joie et de fierté. Tu es et resteras ma meilleure amie/soeur/*tous autres qualificatifs* représentant le lien qui nous unit.

Camille, CamCamdu72, *my partner in crime*, je te remercie de m'avoir soutenue pendant ces années de thèse (mais aussi pendant nos années d'études/McDo), de m'avoir imposé des escapades et/ou vacances à Paris, Amsterdam et Marrakech, de m'avoir fait rire à ne plus savoir respirer et bien plus encore. Je compte bien mettre des paillettes dans ta vie en 2022 et vivement nos prochaines aventures à l'autre bout du monde.

Je remercie aussi mes chère(s) ami(e)s : Anais, Charlène, Eddy, Fannie, Fanny, Marie, Maxime, Melvin, Nina (la spécialiste de l'orthographe) et Richard qui m'ont soutenue sans même le savoir tout en ayant une vague idée de ce qu'était mon travail. Merci pour votre folie (à tous, oui oui!), votre bienveillance et votre amitié inconditionnelle. (L'ordre dans lequel apparaît vos prénoms est un ordre alphabétique et ne fait pas état d'un quelconque ordre de préférence. Je préfère le préciser car j vous connais les loulous! Je vous aime de façon équitable, pas de jaloux!)

Que serait cette thèse sans mes *supporters* de la première heure ? Ma famille, les Chauveau & les Thébaudin, je vous remercie infiniment pour m'avoir accompagnée dans cette aventure. Je vous dédie cette thèse à vous ainsi qu'aux absents, Mamie Madeleine et Papi George, qui ne pourront pas voir l'aboutissement de 10 ans d'étude et de ma passion sans relâche pour la biologie. Je pense à Mamie Madeleine, tu as été et reste mon modèle pour la vie. J'espère que là où tu es, tu peux voir ce que je deviens et, je te remercie d'avoir veillé sur nous. A Papi Jeannot, Odette, Jean-Y, Anne, Guiguidu75, Clochedu35, Laurence et les nombreux Chauveau, merci d'avoir été présent et d'avoir su m'épauler depuis tant d'années. Et il y a évidemment mon grand frère Beubeu et sa magnifique famille qu'il a construit avec Pauline que je remercie. Merci de m'avoir soutenue à votre échelle, les "Ateliers Calins et Bisous" avec Marius et Juliette m'auront permis de recharger mes batteries. J'espère instiller chez eux l'amour des Sciences (je compte faire d'eux de véritables petits génies). Je remercie mes parents chéris, pour avoir été mes *supporters* mais aussi mes premiers *sponsors* (financiers, émotionnels, etc.). Merci pour votre amour et votre foi en moi, ce sont des ingrédients essentiels pour l'aboutissement de cette thèse et mon évolution personnelle. J'aurais appris à vulgariser, condenser, rendre ludique et comique les Sciences grâce à vous. J'espère vous rendre fier tous les deux, c'est mon objectif de vie, ça et vous faire découvrir le Cambodge.

Enfin cette thèse a été une véritable aventure professionnelle et humaine ainsi qu'une prise de conscience personnelle, remplie de belles rencontres et d'échanges scientifiques et non scientifiques. Un grand merci à toutes les personnes, impliquées de près ou de loin, ainsi qu'à tous les Généthoniens et les « IDViens » pour l'ambiance au laboratoire mais aussi en dehors.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	1
SOMMAIRE	7
LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX	10
LISTE DES ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION	15
1. Maladies rétinienne héréditaires et traitements existants	16
1.1. Généralités et structure anatomique de l'œil	16
1.2. Les dégénérescences rétinienne héréditaires.....	22
1.2.1. Origine et différents types des pathologies	22
1.2.2. Les différents stades de dégénérescence rétinienne	24
1.3. Etat des lieux des différentes approches thérapeutiques existantes.....	27
1.3.1. Les thérapies existantes	27
1.3.2. La thérapie génique	33
1.3.2.1. Définition de la thérapie génique par rAAV	33
1.3.2.2. Résultats des traitements par thérapie génique par rAAV	38
2. L'œil, une « dualité » immunologique.....	41
2.1. Présentation des éléments clés du système immunitaire	41
2.2. L'œil : un sanctuaire immunitaire	48
2.2.1. Les barrières physiques	49
2.2.2. Les molécules immunosuppressives de l'œil	51
2.2.3. Le drainage antigénique oculaire	52
2.2.4. Les cellules immunitaires résidentes de l'œil	54
2.2.5. Le mécanisme <i>Anterior Chamber Associated Immune Deviation</i> (ACAID)	58
2.2.6. Mécanisme apparenté à l'ACAID : le <i>Sub-Retinal Associated Immune Inhibition</i> (SRAII)	60
2.3. L'œil : lieu de réponse inflammatoire	61

3. Réponses immunitaires associées à la thérapie génique oculaire	62
3.1. Réponses immunitaires associées à la thérapie génique médiée par AAV	62
3.1.1. Réponses immunitaires innées et inflammation	62
3.1.2. Réponses immunitaires adaptatives dirigées contre la capsid	67
3.1.2.1. Immunité préexistante	68
3.1.2.2. Induction de réponses immunitaires adaptatives anti-capsid	69
3.1.3. Réponses immunitaires adaptatives dirigées contre le produit du transgène	72
3.2. Réponses immunitaires associées à la thérapie génique oculaire	73
3.2.1. Réponses immunitaires associées à la thérapie génique oculaire dans les études précliniques	73
3.2.2. Réponses immunitaires associées à la thérapie génique oculaire dans les essais cliniques	73
3.3. Stratégie d'immuno-modulation associée à la thérapie génique oculaire	77
3.3.1. Utilisation d'immunosuppresseurs non spécifiques	77
3.3.2. Nouvelles approches d'immunosuppression spécifique d'antigène	80
OBJECTIFS	81
RESULTATS	85
DISCUSSION	135
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	145
BIBLIOGRAPHIE	147
ANNEXE	162

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de l'œil humain et de l'œil de la souris.....	21
Figure 2 : Classification des protéines associées aux maladies rétinienne en fonction de leur localisation ou leur fonction dans les photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE).	25
Figure 3 : Options thérapeutiques pour traiter les dégénérescences rétinienne.	27
Figure 4 : Les deux stratégies de thérapie génique, <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>	29
Figure 5 : Représentation schématique de la production de rAAV à partir d'un AAV2.	36
Figure 6 : Voies d'administrations intra-vitréennes et sous-rétiniennes.	38
Figure 7 : Voies de présentation antigénique sur les molécules de CMH.	44
Figure 8 : Polarisation des lymphocytes T CD4 ⁺	45
Figure 9 : Polarisation des lymphocytes TCD8 ⁺	46
Figure 10 : Schéma simplifié d'une réponse immunitaire adaptative envers un antigène thymo-dépendant.	47
Figure 11 : La barrière hémato-rétinienne. La barrière hémato-rétinienne.	50
Figure 12 : L'oeil : un sanctuaire immunitaire.	51
Figure 13 : Distribution des vaisseaux lymphatiques dans l'œil.	53
Figure 14 : Les cellules immunitaires résidentes de l'oeil.	54
Figure 15 : Localisation et activation des cellules microgliales au sein de la rétine.	56
Figure 16 : Schéma représentant les interactions cellulaires entre la microglie et les différentes cellules rétinienne.	57
Figure 17 : Schéma représentatif du mécanisme de l'ACAID.	60
Figure 18 : Voies de signalisation des récepteurs de reconnaissance de forme (PRR).	63
Figure 19 : Détection des éléments du vecteur AAV par les PRR.	65
Figure 20 : Mécanismes d'activation de l'inflammasome via NLRP3.	66
Figure 21 : Ensemble des réponses immunitaires de l'hôte contre les vecteurs AAV.	68
Figure 22 : Le rôle des réponses immunitaires médiées par les APC envers les vecteurs AAV.	71
Figure 23 : Objectifs et modèles utilisés.	83
Figure 24 : Etude de la cytotoxicité <i>in vivo</i> après l'administration d'un traitement immunosuppresseur par le mécanisme SRAII.	130
Figure 25 : Exploration de l'effet <i>by stander</i> dans la modulation des réponses immunitaires associées à un transfert de gène intra-oculaire.	132
Figure 26 : Etude des réponses cellulaires anti-capside après un transfert de gène intraoculaire.	134
Figure 27 : Mise en place des réponses immunitaires cellulaires après un transfert de gène intraoculaire.	138
Figure 28 : Modulation des réponses immunitaires cellulaires après un transfert de gène intraoculaire.	141

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les types cellulaires ciblés par différents variants de virus adénoassociés (AAV).	34
Tableau 2 : Thérapie génique oculaire par rAAV enregistrés sur clinicaltrials.gov.	40
Tableau 3 : Molécules intraoculaires à fonction immunosuppressives.	52
Tableau 4 : Marqueurs exprimés par les cellules microgliales en condition physiologique et pathologique.	57
Tableau 5 : Données d'immuno-monitoring dans les essais de thérapie génique oculaire médiés par AAV.	76
Tableau 6 : Traitement immunosuppresseur des patients dans les essais cliniques de thérapie génique oculaire.	79

LISTE DES ABREVIATIONS

AAV : *Adeno-associated virus* ou Virus Adéno-Associé
ABEL : *Analysis By Emitted Light* ou Analyse par lumière émise
Ac : Anticorps
ACAID : *Anterior Chamber-Associated Immune Deviation*
ACL : Ensemble de maladie cécitante à apparition précoce
ADN : Acide Désoxytoribo-Nucléique
ARN : Acide Ribo-Nucléique
ARNi : Acide Ribo-Nucléique interférence
ARNm : Acide Ribo-Nucléique messenger
ARNr : Acide Ribo-Nucléique ribosomal
BHR : Barrière hémato-rétinienne
CBA : *Cytometric Bead Array*
CD : Cluster of Differentiation
CDNF : *Cerebral Dopamine Neurotropic Factor*
CEP₂₉₀ : *Centrosomal protein of 290 kDa*
CFA : Complete Freund's Adjuvant ou Adjuvant Complet de Freund
ChRs : *ChannelRhodopsin*
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNTF : *Ciliary Neurotrophic Factor*
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CRISPR/Cas9 : *CRISPR associated protein 9*
CRX : *Cone-Rod Homeobox*
DAMP : *Damage-associated molecular patterns*
DBY : *DEAD-box RNA helicase Y linked*
DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge
ELISpot : *Enzyme-linked immunospot*
EOG : ElectroOculoGramme
ERG : ElectroRétinoGramme
ESC : *Embryonic Stem Cells*

GCL : *Ganglion Cell Layer* ou Couche des Cellules Ganglionnaires

GDNF : *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*

GFP : Green Fluorescent Protein

GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique

HDR : *Homology Directed Repair*

HE : Hématoxyline Eosine

IFN γ : Interféron gamma

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

iPSC : *Induced pluripotent stem cells*

INL : *Inner Nuclear Layer* ou Couche Nuclée Interne

IPL : *Inner Plexiform Layer* ou Couche Plexiforme Interne

IRD : *Inherited Retinal Disease*

IS : *Inner Segment* ou Segment interne

ITR : *Inverted Terminal Repeats*

IVT : Intra-Vitréen

LB : Lymphocyte B

LCA : *Leber's Congenital Amaurosis* ou Amaurose Congénitale de Leber

LT : Lymphocyte T

Luc2 : Luciférase 2

MLI : Membrane limitante interne

NAb : Anticorps neutralisants

NAC : N-acétylcystéine

NHEJ : *Non-Homologous End-Joining*

NLRP : *Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing*

NOHL : Neuropathie Optique Héréditaire de Leber

MSC : *Mesenchymal stem cells*

OCT : Tomographie en cohérence optique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONL : *Outer Nuclear Layer* ou Couche Nucléaire Externe

OPL : *Outer Plexiform Layer* ou Couche Plexiforme Externe

OS : *Outer Segment* ou Segment Externe

PDE6 : Phosphodiesterase 6

PEDF : *Pigment epithelium-derived factor*

PAMP : *Pathogen-associated molecular patterns*

ddPCR : *Digital droplet polymerase chain reaction*

PR : Photorécepteurs

PRR : *Pattern recognition receptor*

RDD : *Retinal degeneration disease*

PGK : PhosphoGlycérate Kinase (promoteur)

RP : Rétinite pigmentaire

RPE : *Retinal Pigmented Epithelium* ou Epithélium Rétinien Pigmentaire

RPGR : *Retinitis pigmentosa GTPase regulator*

SR : Sous-rétinien

SRAII : *Subretinal-Associated Immune Inhibition*

TALEN : *Transcription activator-like effector nuclease*

TLR : *Toll Like Receptor*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

Tc : Lymphocytes T cytotoxiques

Treg : Lymphocytes T régulateurs

UTY : *Ubiquitously Transcribed Tetra-trico-peptide Repeat Containing, Y-Linked*

ZFN : *Zinc Finger Nuclease*

INTRODUCTION

1. Maladies rétinienne héréditaires et traitements existants

1.1. Généralités et structure anatomique de l'œil

L'œil, également appelé globe oculaire, est l'organe principal de la vision. La vue chez l'être humain représente l'une des principales sources d'information du cerveau sur le monde extérieur. L'œil va recevoir et transformer les vibrations électromagnétiques de la lumière en un influx nerveux (signal électrique) qui sera transmis au cerveau via le nerf optique. Le signal va pouvoir être « traduit » par le cortex visuel et renvoyer l'image traitée et ainsi permettre d'interpréter et de mieux appréhender l'environnement. Les informations de cette partie sont en partie issues du chapitre « Anatomie de l'œil » de l'École d'Orthoptie de Tours et l'École d'Orthoptie de Nantes, écrit par Martine Santallier, Jocelyne Pêchereau et Alain Pêchereau et publié en mai 2008 (Santallier, Martine, Pêchereau Jocelyne, et Pêchereau, Alain 2008).

Le globe oculaire se situe dans une cavité osseuse, appelée orbite, elle contient aussi, les muscles oculomoteurs : responsables des mouvements oculaires, les nerfs, les vaisseaux sanguins et le système lacrymal. L'œil est formé de 3 couches cellulaires majeures (aussi appelées tuniques) que sont la sclère, l'uvée et la rétine (Figure 1).

- **La sclère** (tunique périphérique) a une fonction protectrice, elle a pour rôle de maintenir le volume, les formes, le tonus oculaire et l'insertion aux muscles oculomoteurs. Il s'agit du revêtement extérieur de l'œil, c'est une couche fibreuse, acellulaire, blanche relativement dure qui se prolonge à l'avant de l'œil en une paroi transparente appelée **la cornée**. La cornée joue un rôle dans la focalisation (ou convergence) des rayons lumineux sur la rétine, c'est le premier dioptré du système optique oculaire.
- **L'uvée** (tunique intermédiaire) a une fonction vasculaire et nourricière. Elle est formée en arrière de **la choroïde** qui se prolonge en avant par **l'iris** et **le corps ciliaire**. La choroïde est une membrane nourricière, véritable éponge vasculaire qui assure la vascularisation de la rétine externe, en particulier des photorécepteurs, elle est riche en cellules pigmentées : les mélanocytes, et en éléments nerveux. L'iris contrôle la pupille, située en son centre, elle va se dilater ou se contracte en fonction de la quantité de lumière dans l'environnement (définissant l'accommodation). Le corps ciliaire est richement vascularisé, participe à la sécrétion de l'humeur aqueuse (grâce au procès ciliaire) et à l'accommodation (grâce au muscle ciliaire).

- **La rétine** (tunique profonde ou neuro-sensorielle), a un rôle dans la réception, la transformation des signaux lumineux en un signal nerveux et sa transmission au système nerveux central. Elle est composée de plusieurs couches cellulaires qui tapissent toute la surface de la choroïde, de l'*ora serrata* en avant et la papille optique. Les axones des cellules ganglionnaires se rassemblent pour former **le nerf optique**. D'un point de vue histologique, la rétine est composée de 10 couches de types cellulaires différents qui peuvent être différenciées en deux compartiments : **l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE)** et **le neuro-épithélium** (ou rétine sensorielle).
- **Le RPE** est composé d'une monocouche de cellules pavimenteuses hexagonales contenant de la mélanine, il fournit une alimentation et un support aux segments externes des photorécepteurs. Il a 4 grandes fonctions : il a un rôle capital dans les échanges d'hydroélectrolytes et d'oxygène, par des transports passifs ou actifs (la rétine externe et plus précisément les photorécepteurs sont dépendants de la choriocapillaire), un rôle dans le métabolisme de la vitamine A (la vitamine A permet de régénérer les pigments photosensibles des photorécepteurs), un rôle dans la phagocytose des segments externes des photorécepteurs (= régénération) et un rôle d'écran (plus ou moins opaque, en fonction du degré de pigmentation).
 - **Le neuro-épithélium** est composé des six types de cellules neuronales : les photorécepteurs (en cônes et bâtonnets), les cellules horizontales, les bipolaires, les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires, et de trois types de cellules gliales (les cellules de Muller, les astrocytes et les cellules microgliales). Le neuro-épithélium permet l'absorption du signal lumineux, le processus de phototransduction va avoir lieu et permettre l'émission d'un signal électrique via **le nerf optique**.
 - **La couche de cellules photoréceptrices**, a une épaisseur moyenne de 40 µm, et est composée de deux types de photorécepteurs, les bâtonnets et les cônes. Les photorécepteurs sont composés d'un segment externe en constante régénération (en forme de bâtonnets ou cônes) qui contient les pigments photosensibles, un segment interne (qui contient les

mitochondries), le corps cellulaire (qui contient le noyau cellulaire) et une région présynaptique. **Les bâtonnets** sont responsables de la vision nocturne et périphérique. **Les cônes** sont responsables de la netteté de la vision et de la perception des couleurs. Le nombre de cellules photoréceptrices et leur répartition sont différentes, la rétine compte en moyenne de 110 à 130 millions de bâtonnets et de 6 à 7 millions de cônes. La zone située dans l'axe de la pupille, est appelée la macula, histologiquement cette zone est la plus concentrée en cellules ganglionnaires (par rapport au reste de l'épaisseur de la couche ganglionnaire). Au centre de la macula se trouve la fovéa où seuls les cônes sont présents et nombreux (150000 par mm²), il s'agit de la zone d'acuité maximale de l'œil (Veleri et al. 2015).

- **Les cellules bipolaires**, il s'agit des premiers neurones de transmission, ils sont l'équivalent des interneurons entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires.
- **Les cellules ganglionnaires**, il s'agit des deuxièmes neurones de transmission, leurs dendrites s'étendent latéralement et l'axone qui est très long va former la couche des fibres optiques.
- **La couche de fibres optiques**, cette couche contient les axones non myélinisés des cellules ganglionnaires disposées en faisceaux qui convergent au niveau de la papille oculaire pour former **le nerf optique**. Il est constitué d'1,2 million de fibres et c'est dans cette couche que se situent les vaisseaux artériels et veineux. Les fibres du nerf optique vont transporter les influx nés des millions de cellules photoréceptrices.

Il existe d'autres cellules qui participent au maintien et la fonction rétinienne comme les cellules horizontales, amacrines, Müller et les microglies.

- **Les cellules horizontales** sont des cellules d'association c'est-à-dire qu'elles sont connectées latéralement à plusieurs photorécepteurs et cellules bipolaires. Elles jouent un rôle dans la diffusion et la modulation des influx nerveux. Elles vont supprimer les signaux des photorécepteurs ayant reçu le moins de signaux lumineux et favoriser ainsi

les signaux des photorécepteurs bien illuminés pour qu'ils soient transmis au cerveau, ceci permet une augmentation de l'acuité visuelle (Chapot, Euler, et Schubert 2017).

- **Les cellules amacrines** sont des cellules d'association, en effet elles relient les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. Il existe entre 20 et 40 types de cellules amacrines, elles utilisent un large éventail de neurotransmetteurs afin de moduler la transmission des signaux lumineux. (Farsai et Connaughton 1995).
- **Les cellules gliales de Müller** : elles occupent toute l'épaisseur de la rétine grâce à leurs nombreuses expansions cellulaires (dendrites et axones) et représentent entre 4 et 5% de toutes les cellules rétinienne. Elles entourent les neurones (et leurs expansions), et les cellules ganglionnaires (et leurs axones), elles ont un rôle essentiel dans l'homéostasie rétinienne, les apports en nutriments pour les cellules ganglionnaires et le renouvellement des pigments visuels des photorécepteurs (Hamon et al. 2016).

L'œil est composé de deux compartiments contenant des milieux liquides transparents séparés par **le cristallin** (Figure 1). Le cristallin a un rôle dans la focalisation des objets et il sépare l'œil en 2 segments :

- Le segment antérieur, est divisé en 2 parties : la chambre antérieure en avant de l'iris et la chambre postérieure entre l'iris (en avant) et le corps ciliaire et la zonule cristallinienne (en arrière). La chambre antérieure contient **l'humeur aqueuse**, un liquide transparent, composée essentiellement d'eau, mais aussi de vitamine C, de glucose, d'acide lactique et de protéines. Elle est continuellement filtrée et renouvelée, et permet de maintenir la pression et la forme du globe oculaire.
- La segment postérieur (ou cavité vitrée), qui contient **le vitré**, un gel qui a un rôle dans le tamponnement de la rétine et est un site d'échanges avec les structures environnantes (rétine, choroïde, corps ciliaire, cristallin).

Etant donné le très grand nombre d'études menées sur le modèle murin, il est important de prendre en compte que malgré de fortes similarités entre l'œil murin et l'œil humain, il existe des différences. En effet, proportionnellement à la taille de l'œil, le cristallin murin est plus gros que le cristallin humain, il remplit plus de 75% de la cavité vitrée et est rond, contrairement au cristallin humain qui est allongé. Ensuite, bien que l'œil murin ne présente pas de macula, il

existe une zone avec une forte densité de cellules ganglionnaires au niveau du nerf optique.
(Treuting et al. 2012)

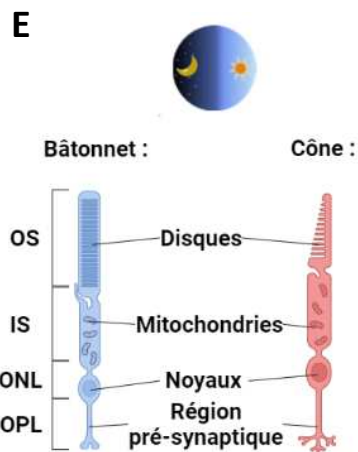
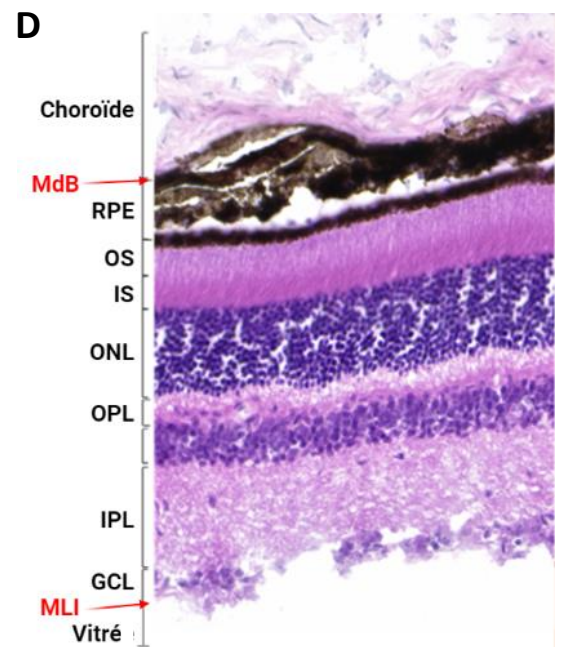
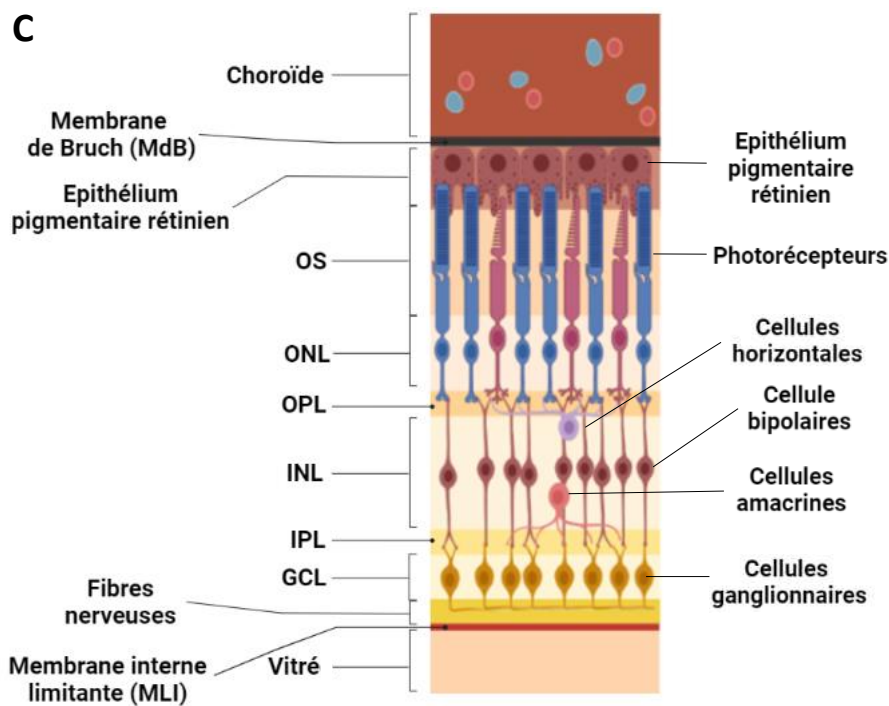
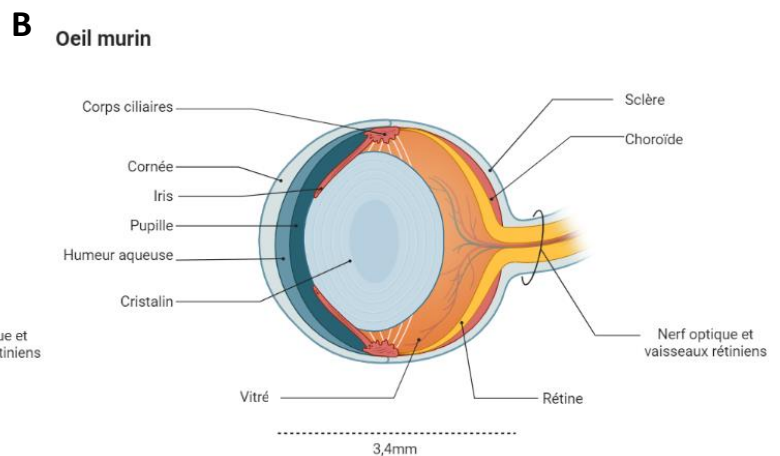
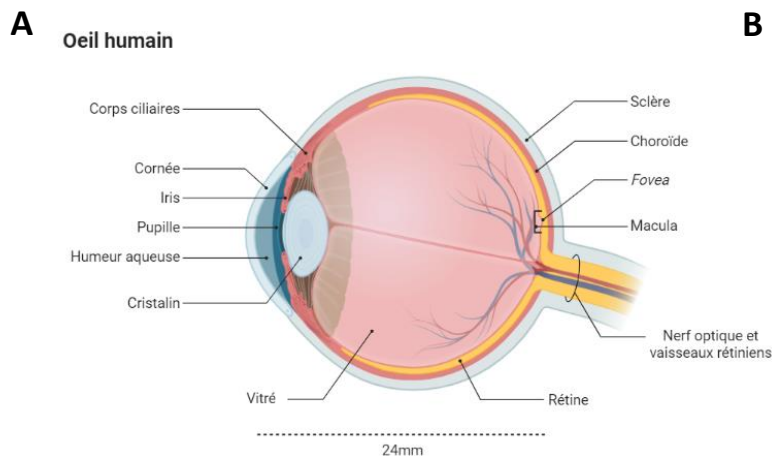


Figure 1 : Structure de l'œil humain et de l'œil de la souris. (A et B) Coupes transversales schématisées de l'œil humain et de l'œil de la souris. (C) Représentation schématisée des différentes couches cellulaires composant la rétine. (D) Coupe histologique de rétine de souris colorée à l'hématoxyline et à l'éosine, indiquant les différentes couches cellulaires. GCL : Couche de cellules ganglionnaires. INL : Couches contenant les cellules bipolaires, horizontales et amacrines. IPL : Jonction synaptique entre les cellules ganglionnaires et les cellules bipolaires. IS : Segment interne des photorécepteurs. MdB : Membrane de Bruch. MLI : Membrane limitante interne. ONL : Couche contenant les noyaux des photorécepteurs. OPL : Jonction synaptique entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires. OS : Segment externe des photorécepteurs. RPE : Epithélium pigmentaire rétinien. (E) Représentation schématisée des photorécepteurs à bâtonnets et à cônes.

En 2020, selon l'OMS 2,2 milliards de personnes à travers le monde présentaient une déficience visuelle ou étaient aveugles. Il faut noter que dans plus de la moitié des cas, la déficience visuelle aurait pu être évitée ou n'a pas encore été traitée. Les troubles de la vue, et la cécité, peuvent être causées soit par un défaut visuel (qui est lié à une anomalie géométrique de l'œil), soit par une pathologie oculaire ou neurologique qui peut être d'origine infectieuse, inflammatoire, métabolique, génétique ou encore causée par un traumatisme, une tumeur ou une lésion cérébrale vasculaire. En fonction des pays et au sein même des pays, il existe une forte variabilité dans les causes de la cécité notamment à cause de la disponibilité et l'accessibilité aux services de soins. Par exemple, dans les pays à revenu élevé, les maladies telles que le glaucome et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) sont majoritaires tandis que dans les pays à revenu faible ou intermédiaire la cataracte l'est. L'âge est aussi un facteur discriminant, en effet chez les enfants, les causes de déficience visuelle vont varier d'un pays à l'autre. Par exemple, dans les pays à revenu élevé, les rétinopathies sont majoritaires tandis que dans les pays à faible revenu, la cataracte congénitale l'est. Toutefois, les principales causes de la cécité à travers le monde sont : une erreur de réfraction non corrigée (88,4 millions, principale cause de déficience visuelle chez les enfants et les adultes dans le monde), la cataracte (94 millions), le glaucome (7,7 millions), les pathologies cornéennes (4,2 millions), la rétinopathie diabétique (3,9 millions) et le trachome (2 millions) (Weltgesundheitsorganisation 1997; « World Sight Day» s. d.; « Update from the Seventy-Fourth World Health Assembly »).

Les autres pathologies causant la cécité sont principalement des atteintes rétiniennes, aussi appelées rétinopathies et désignent l'ensemble des affections qui touchent la rétine. Leurs mécanismes sont variés, et elles entraînent une cécité de transduction, qui se caractérise par une absence de conversion de l'information lumineuse en un influx nerveux. Parmi les rétinopathies on peut distinguer les dégénérescences rétiniennes héréditaires qui sont un ensemble de maladies génétiques de l'œil.

1.2. Les dégénérescences rétiniennes héréditaires

1.2.1. Origine et différents types des pathologies

Les dégénérescences rétiniennes héréditaires (IRD) caractérisent un groupe d'atteintes cliniquement hétérogènes d'origine génétique qui provoquent toutes une perte de la vue liée à un mauvais développement, un dysfonctionnement ou la mort des photorécepteurs. Plusieurs

facteurs permettent de classer les IRD, notamment le type et la localisation des cellules affectées et le moment de l'apparition de la maladie. Actuellement, sur le plan génétique, les IRD sont très hétérogènes, et pour cause, plus de 260 gènes sont associés à ces syndromes. Le mode de transmission à la descendance peut aussi varier car les IRD peuvent être transmises sur un mode autosomique récessif, autosomique dominant, récessif lié à l'X ou isolé. L'âge d'apparition et la gravité de la maladie vont varier en fonction du mode de transmission de la maladie ainsi que la nature de la ou les mutations (Veleri et al. 2015; Verbakel et al. 2018).

Parmi les maladies génétiques oculaires, on distingue deux catégories, les maladies monogéniques oculaires et les maladies polygéniques et/ou les maladies complexes. Les maladies monogéniques sont causées par la mutation d'un seul gène comme les rétinites pigmentaires qui représentent 83% de cas d'IRD syndromiques. Cependant le reste, soit 17%, comprend les maladies polygéniques qui sont associées à des gènes multiples (par exemple les ciliopathies à transmission récessive) et les maladies complexes dont l'éthiologie est multifactorielle comme la DMLA. Elles sont causées par la présence d'un profil génétique particulier, comme de nombreuses altérations au niveau de plusieurs gènes, et un environnement spécifique (Tatour et Ben-Yosef 2020). La DMLA touche 1% des personnes de moins de 60 ans et 10% des personnes de plus de 80 ans (Leveziel et al. 2009).

Il existe différentes dégénérescences rétiniennes d'origine génétique selon leur aspect, leur âge de survenue, leur caractère isolé ou non et les cellules touchées ; comme les rétinites pigmentaires (RP) sont les plus répandues, la dystrophie des cônes ou des bâtonnets (CRD), le syndrome d'Usher, l'Amaurose Congénitale de Leber, la dystrophie maculaire et l'achromatopsie (monochromatisme des bâtonnets) (Veleri et al. 2015).

Les dystrophies rétiniennes peuvent ainsi être classées en deux catégories qui diffèrent en fonction de la façon dont sont affectés les photorécepteurs : les rétinites pigmentaires et les rétinites avec une dystrophie des cônes. Dans le cas des rétinites pigmentaires, il y a une perte primaire des bâtonnets, suivie par un dysfonctionnement des cônes. Tandis que dans les rétinites avec une dystrophie des cônes, le dysfonctionnement primaire ou la perte des cônes n'impacte pas nécessairement les bâtonnets (Veleri et al. 2015). La prévalence des rétinites pigmentaires dans le monde est de 1 sur 4 000. Dans la plupart des cas d'IRD, la maladie se limite à l'œil mais dans certains cas, comme pour le syndrome d'Usher, la maladie rétinienne (symptôme principal) est associée à d'autres maladies systémiques comme la surdité.

1.2.2. Les différents stades de dégénérescence rétinienne

Grâce à leur localisation, leur anatomie, leur transparence et leur physiologie, la caractérisation détaillée de la structure, de la fonction de l'œil et de la rétine sont facilement réalisables à l'aide de techniques non invasives comme : l'imagerie, l'électrophysiologie et l'électro-oculographie. L'examen du fond de l'œil (partie arrière de l'œil visible à travers la pupille) par des photographies en couleur, l'angiographie à la fluorescéine, l'auto-fluorescence du fond de l'œil ou la tomographie par cohérence optique (OCT) vont être utilisés pour définir la structure de la rétine chez l'homme ainsi que chez les modèles animaux. Les examens électro-physiologiques, notamment l'électro-rétinographie (ERG) et l'électro-oculographie (EOG), servent à quantifier respectivement la fonction de la rétine et du RPE. L'ensemble de ces examens permet un suivi longitudinal de l'anatomie et la fonction de l'œil et de la rétine et donc de suivre l'évolution d'une maladie telle que la dégénérescence rétinienne. De façon générale, le premier symptôme des RRD à apparaître est la perte de la vision nocturne. Puis suite à la dégénérescence des photorécepteurs, on observe une constriction progressive du champ visuel, une diminution du champ visuel, la perception des couleurs se trouble et parfois de la photophobie, (= hypersensibilité à la lumière). La perte de la vision centrale est tardive. La ou les mutations à l'origine de la pathologie peuvent affecter le développement des photorécepteurs, le trafic intracellulaire et la fonction des cils, induirent un défaut de phototransduction ou induirent des défauts dans l'intégrité ou la fonction du RPE ce qui conduira à la cécité (Duncan et al. 2018; Veleri et al. 2015).

➤ Les dégénérescences rétiniennes affectent le développement des PR

L'expression des gènes des photorécepteurs est soumise au contrôle de facteurs de transcription spécifiques, tels que CRX (*cone-rod homeobox*), NRL (*neural retina leucine zipper*) et NR2E3 (*nuclear receptor subfamily*) (Figure 2). La mutation des gènes codant pour ces facteurs va affecter le développement et l'homéostasie des photorécepteurs, et *in fine* entraîner un dysfonctionnement et/ou à la mort des photorécepteurs. En fonction des gènes et du type de mutation, les malades vont être affectés de façons différentes, certains vont naître aveugles et d'autres développer une cécité avec l'âge. Par exemple, les mutations du CRX sont à l'origine de l'amaurose congénitale de Leber (LCA) à début précoce et la RP qui est une maladie

évolutive. Ensuite les mutations dans NRL et NR2E3 provoquent des RP variables (Veleri et al. 2015).

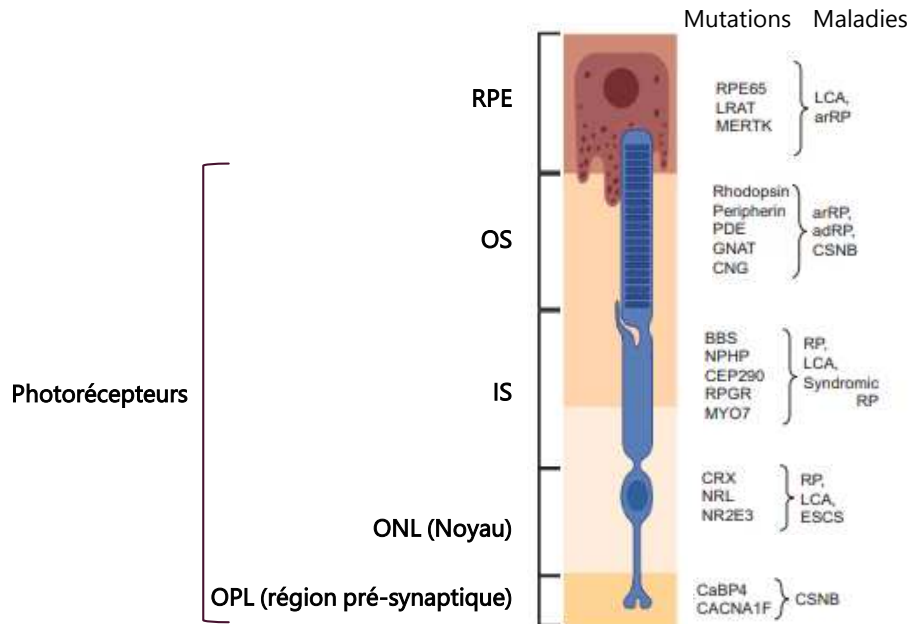


Figure 2 : Classification des protéines associées aux maladies rétiniennes en fonction de leur localisation ou leur fonction dans les photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE). Les protéines du RPE, RPE65, LRAT et MERTK sont associées à L'Amaurose congénitale de Leber (LCA) et à la Rétinite Pigmentaire. Les facteurs de transcription CRX, NRL et NR2E3 sont associés à des pathologies touchant les photorécepteurs. Les autres protéines associées à des maladies se localisent dans le segment externe (OS), le cilium de connexion (CC) et/ou le corps basal (BB) du photorécepteur. adRP : rétinite pigmentaire autosomique dominante ; arRP : rétinite pigmentaire autosomique récessive ; CSNB : cécité nocturne stationnaire congénitale ; ESCS : syndrome du cône S amélioré ; RP : retinitis pigmentaire.

➤ Les dégénérescences rétiniennes affectent le trafic intracellulaire et la fonction des cils

Les protéines qui sont impliquées dans le développement, la fonction et le trafic intracellulaire des cils sont essentielles au bon fonctionnement des photorécepteurs. Des mutations dans les gènes nécessaires au développement (i.e. CEP290) et à l'entretien des cils ou au trafic des vésicules dans les cils ont de graves conséquences sur la morphogénèse des segments externes des photorécepteurs et la phototransduction. Par exemple les mutations dans CEP290 sont principalement associées à l'ACL qui est un ensemble de maladies cécitantes à apparition précoce (caractérisées par une dystrophie rétinienne précoce et sévère et une faible acuité visuelle dès la naissance) mais aussi au syndrome de Joubert, au syndrome de SeniorLoken et au syndrome de Meckel. Aux Etats-Unis, près de 70% des cas de rétinite pigmentaire liée à l'X (XLRP ; RP3) peuvent être expliqués par des mutations du gène RPGR (Breuer et al. 2002). Des mutations du

gène RPGR sont également détectées chez des patients atteints de RP et chez des patients atteints de CRD.

➤ Les dégénérescences rétiniennes induisent des défauts dans la phototransduction

La phototransduction est initiée par une cascade de réactions biochimiques, il a été démontré que des mutations dans les gènes codant pour les protéines de phototransduction sont à l'origine de la cécité. En effet les mutations de la rhodopsine ou de l'opsine, qui initient la phototransduction dans les photorécepteurs à bâtonnets et à cônes respectivement, entraînent une perte de fonction des photorécepteurs, avec ou sans dégénérescence. Par exemple, dans les bâtonnets, les mutations de G90D, T94I, A292E et A295V dans la rhodopsine entraînent une forme de cécité nocturne congénitale (nyctalopie) bien que les photorécepteurs des bâtonnets restent intacts tout au long de la vie (Figure 2). Au contraire les mutations de la rhodopsine K296E et K296M provoquent une RP avec une dégénérescence précoce des photorécepteurs et la cécité. Le complexe hétéro-tétramérique PDE6 est un élément clé dans la cascade de phototransduction car il régule les niveaux intracellulaires de GMPc (en hydrolysant le GMPc en réponse à l'activation lumineuse). Les niveaux de GMPc contrôlent l'hyperpolarisation et la transmission du ou des signaux électrochimiques aux neurones de deuxième ordre de la rétine interne. Ainsi l'ensemble des mutations nulles ou faux sens dans les différentes sous-unités de PDE6A vont avoir un impact sur la phototransduction. Par exemple la mutation de la sous-unité α est caractérisée par une dégénérescence rapide des photorécepteurs et affecte les niveaux de PDE6B rétiniens. Des mutations manquantes ou tronquantes de l'extrémité C-terminale de la PDE6B (codant la sous-unité β) entraînent une arRP (Veleri et al. 2015). La souris naturelle *Pde6brd1/rd1* (*rd1*) développe une dégénérescence rapide des photorécepteurs, tandis qu'une autre mutation *Pde6brd10* cause un phénotype plus léger chez les souris. C'est pourquoi le modèle de souris *rd10* est souvent utilisé pour tester des traitements thérapeutiques de la RP. Au vu de l'importance et de la complexité de la cascade de réaction dans la phototransduction, il n'est pas surprenant que des mutations dans presque l'ensemble des protéines « actrices » puissent entraîner une déficience visuelle.

➤ Les dégénérescences rétiniennes affectent l'intégrité et la fonction du RPE

Le RPE joue un rôle crucial dans la survie des photorécepteurs ainsi une mutation des gènes spécifiques au RPE comme RPE65, LRAT (*lecithin retinol acyltransferase*) ou MERKT (*tyrosine-protein kinase Mer*) a des conséquences délétères au niveau de l'intégrité et la

fonction du RPE et induit *in fine* des dégénérescences rétinienne précoces ou la LCA entre autre (Figure 2) (Veleri et al. 2015).

Au vu de l'hétérogénéité des pathologies, des phénotypes et du caractère évolutif des dégénérescences rétinienne, les approches thérapeutiques doivent être adaptées pour chaque stade de la maladie et à chaque type cellulaire en fonction de la pathologie.

1.3. Etat des lieux des différentes approches thérapeutiques existantes

1.3.1. Les thérapies existantes

En fonction du stade d'évolution de la maladie la stratégie de traitement va être différente (Figure 3). Par exemple au stade précoce de la dégénérescence, des traitements comme l'édition ou la thérapie génique, la supplémentation en agent neuroprotecteurs ou des facteurs trophiques peuvent être utilisés. Lorsque la maladie progresse, la structure rétinienne, la présence et la capacité des cellules cibles vont décroître, c'est pourquoi il faut envisager cibler les cellules résiduelles ou non fonctionnelles comme avec l'optogénétique ou la thérapie cellulaire. Enfin à des stades avancés de la maladie, l'utilisation de prothèse rétinienne est recommandée (Matonti et al. 2015).

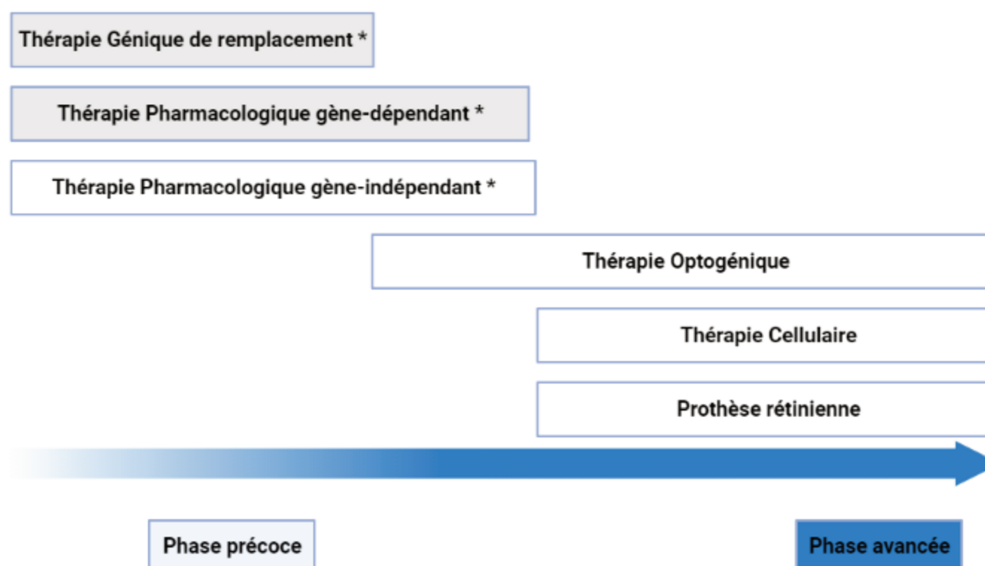


Figure 3 : Options thérapeutiques pour traiter les dégénérescences rétinienne. Les thérapies géniques présentant un astérisque signifie qu'elle nécessite un diagnostic moléculaire. Lorsque les photorécepteurs sont intacts ou en train de dégénérer (phase précoce de la maladie) la thérapie génique de remplacement et pharmacologique sont adaptés. Cependant lorsque la rétine est trop endommagée (phase avancée), la thérapie cellulaire, l'optogénie et l'utilisation de prothèse rétinienne est une solution envisagée.

Le principe de l'**édition génique** consiste à insérer, remplacer ou retirer de l'ADN génomique à l'aide de nucléases d'origine bactérienne, appelées "ciseaux moléculaires". L'édition génique

permet de remplacer ou d'éliminer le matériel génétique existant d'un gène « mutant » en créant des cassures spécifiques à double brin dans l'ADN et d'exploiter les mécanismes de réparation des cassures pour introduire du matériel génétique. Aujourd'hui, nous disposons de trois nucléases qui sont : CRISPR/Cas9, ZFN et TALEN. Ensuite afin d'effectuer les modifications génomiques deux voies de réparation des cassures des brins d'ADN sont exploitées : (1) la réparation dirigée par l'homologie (HDR) qui est utilisée pour remplacer une variante pathogène et/ou insérer des éléments d'ADN afin de restaurer l'expression du gène « sauvage » ou tronqué ; et (2) la réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) utilisée pour éliminer les éléments d'ADN conduisant à une expression aberrante des gènes (Maeder et Gersbach 2016). L'édition génique est actuellement en cours de développement pour les ACL10 (Maeder et al. 2019; J. A. Sahel et Dalkara 2019) et autres rétinopathies (Botto et al. 2021). Par exemple dans le cadre de la ACL10, l'utilisation d'injections sous-rétiniennes de vecteurs AAV5 contenant la machinerie d'édition de gènes CRISPR-Cas9 a permis à restaurer l'expression de la protéine de type sauvage en délétant le site d'épissage cryptique généré par le variant intronique IVS26 (Wilson et al. 2018). Ce concept est utilisé dans d'autres essais cliniques cependant, l'expression à long terme de CRISPR-Cas9 dans l'œil présente des risques pour la sécurité (Ernst et al. 2020; Charlesworth et al. 2018).

La **thérapie génique par remplacement de gènes** permet d'introduire une copie d'un gène (appelé transgène) à des cellules cibles sans supprimer l'ADN génomique pathologique, afin de remplacer ou compléter la fonction initialement altérée ou perdue qui est à l'origine de la maladie (Figure 4). La thérapie génique *in vivo* est un transfert de gène qui se fait directement dans les cellules cibles, à l'intérieur de l'organisme, par une injection. Tandis que la thérapie génique *ex vivo* nécessite un prélèvement des cellules cibles, leur traitement *in vitro* et leur réinjection dans l'organisme. Le transgène est le plus souvent une molécule d'Acide Désoxyribonucléique (ADN) qui va pouvoir coder par exemple pour une protéine fonctionnelle, des facteurs de survie, un ARNi (interférentiel), un ARNr (ribosomal) ou un ARNm (messenger). Le transfert de gènes, jusqu'aux cellules cibles, peut se faire selon trois systèmes, il peut être transmis par (i) des vecteurs viraux (i.e. les dérivés des adénovirus, les rétrovirus, ou les virus adéno-associés recombinants), (ii) des vecteurs non viraux (i.e. ADN complexés avec des lipides cationiques ou des nanoparticules, les exosomes) et (iii) des méthodes physiques (Jousset et al. 2011; Maeder et Gersbach 2016).

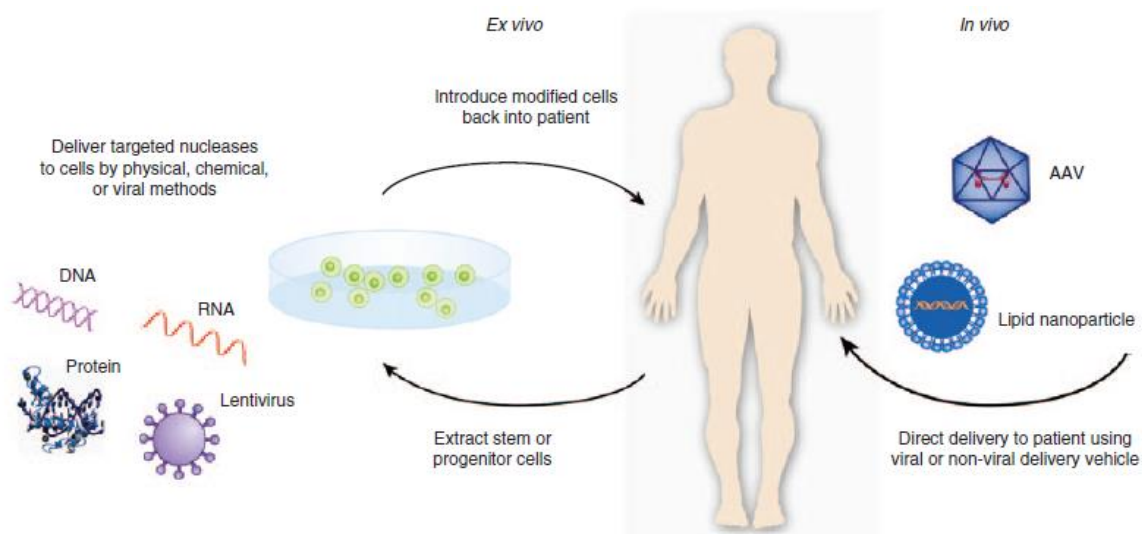


Figure 4 : Les deux stratégies de thérapie génique, *in vivo* et *ex vivo*. Dans le cadre de la thérapie génique *in vivo*, les cellules sont directement modifiées dans l'organisme du patient. Dans le cas de la thérapie *ex vivo*, des cellules souches vont être prélevées chez le patient, modifiées en laboratoire, puis réinjectées (Maeder et Gersbach 2016).

De nombreuses pathologies de l'œil sont dues à des mutations génétiques qui entraînent une anomalie de la vision et mènent à la cécité. La thérapie génique qui consiste à amener la version fonctionnelle du gène en question afin de corriger cette anomalie semble être une solution pour les maladies telle que les dégénérescences rétiniennes d'origine génétique. En effet, l'œil apparait comme une cible idéale pour le transfert de gènes pour différentes raisons. Tout d'abord il s'agit d'un organe facilement accessible, ce qui rend les actes chirurgicaux réalisables. De plus, l'œil est un organe de petite taille et compartimenté (relativement clos) ce qui permet d'utiliser des quantités de vecteurs moins importantes que pour des traitements musculaires et éviter une diffusion du vecteur à travers le reste de l'organisme (Ambroziak et al. 2016). Les réponses inflammatoires au sein de l'œil sont modulées par rapport au reste du corps (Nieder Korn 2009) Enfin, étant donné que de nombreuses maladies peuvent induire une cécité bilatérale, il est possible d'effectuer des expériences sur un seul œil (le plus endommagé) et l'autre sert d'œil controlatéral (Lebherz et al. 2008a). La stratégie la plus privilégiée pour le traitement des dégénérescences rétiniennes d'origine génétique est la thérapie génique oculaire par rAAV, ceci sera traité dans la partie 1.3.2..

Afin de préserver l'état et la fonction du tissu rétinien et de ralentir la dégénérescence rétinienne, l'effet thérapeutique des **facteurs neurotrophiques** a été étudié. Les facteurs neurotrophiques vont réduire la sensibilité des photorécepteurs au stress oxydatif et favoriser la régénération du segment externe des photorécepteurs. Il existe différents facteurs neurotrophiques : le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF), dérivé du

cerveau (BDNF), dérivé de l'épithélium pigmentaire (PEDF), le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF) et le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF). Après plusieurs études précliniques, il s'avère que la supplémentation en facteurs trophiques peut empêcher la dégénérescence rétinienne et offre un potentiel pour les thérapies mutation-indépendantes (transversale quelle que soit la maladie). Actuellement au Japon, une thérapie par transfert de gène de transfert de gènes avec le PEDF est actuellement en essai clinique de phase I/II (Duncan et al. 2018). En France, il a été démontré qu'un facteur de viabilité des cônes dérivé des bâtonnets (RdCVF) peut moduler le métabolisme énergétique pour maintenir la santé des photorécepteurs des cônes (Léveillard et Sahel 2010). Un essai clinique utilisant la thérapie par transfert de gène avec AAV-RdCVF est actuellement prévu et a pour but de retarder la mort des cellules coniques. Enfin d'autres molécules comme la vitamine A, la vitamine E et les acides gras sont aussi étudiées. La vitamine A et l'acide docosahexaénoïque ont démontré qu'ils permettaient de réduire de la progression de la maladie chez les patients atteints de rétinite pigmentaire (RP) (E. L. Berson et al. 1993; Eliot L. Berson et al. 2004). L'administration par voie orale d'acide valproïque montre un ralentissement de la progression du champ visuel dans des patients atteints de RP. La N-acétylcystéine (NAC) et la N-acétylcystéine amide (NACA) permettent de réduire les dommages oxydatifs, sont actuellement en phase clinique (NCT0306302) (Duncan et al. 2018; Lee et al. 2011; Schimel et al. 2011). Les inconvénients de ces traitements sont la nécessité de traiter des cellules cibles en état de mort cellulaire, cela nécessite une fenêtre d'action réduite par l'état d'avancement de la maladie. En effet le traitement n'a pas de fonction réparatrice ou de remplacement mais de conservation et de protection des cellules déjà existantes ce qui implique de compléter par une autre thérapie.

L'**optogénétique** a pour but de rendre photosensibles des cellules qui ne le sont plus comme les cônes dormants (Khabou, Garita-Hernandez, et al. 2018) où les cellules ganglionnaires, bipolaires ou de restaurer la capacité phototransductionnelle des photorécepteurs résiduels dont les articles externes sont altérés. Ainsi, le principe de l'optogénétique est de créer de nouveaux photorécepteurs en transférant des gènes de matériaux photosensibles dans le circuit rétinien résiduel (les synapses neurales rétiniennes existantes) et ainsi de contrôler ou de surveiller l'activité neuronale à l'aide de la lumière. Pour cela des protéines photosensibles appelées opsines vont être introduites génétiquement dans la rétine. Les opsines fonctionnent comme des pompes ou canaux ioniques photosensibles transmembranaires et sont présentes de façon ubiquitaire dans tous les organismes, y compris les eucaryotes et les bactéries. On distingue

deux familles distinctes d'opsines : les opsines « microbiennes » (type I ; présentes chez les procaryotes, les algues et les champignons) ; et les opsines « animales » (type II ; présentes uniquement chez les eucaryotes supérieur). Les opsines « microbiennes » captent l'énergie lumineuse et vont soit pomper activement des ions, soit ouvrir des canaux permettant un flux passif d'ions à travers la membrane cellulaire. L'introduction d'opsines dans des cellules non photosensibles permet une activation et une extinction neuronales à grande vitesse. Les opsines microbiennes comprennent les ChRs, l'halorhodopsine (NpHR) et les Archs. Les « opsines animales » appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés à la protéine G (RCPG) naturels. Contrairement aux opsines « microbiennes », les opsines « animales » sont beaucoup plus sensibles car le signal lumineux est amplifié par des cascades de signalisation couplées à une protéine G ce qui permet de contrôler l'excitabilité neuronale à de faibles niveaux de lumière (Simon et al. 2020). En 2021, le premier cas de récupération fonctionnelle partielle dans le cadre d'une maladie neurodégénérative après une thérapie optogénétique a été rapporté par Sahel *et al.* (J.-A. Sahel et al. 2021). Ainsi l'optogénétique représente aujourd'hui une technologie révolutionnaire dans la modulation optique cependant différentes questions restent en suspens comme le déclenchement de potentielle réponse immunitaire contre les opsines « microbiennes ». L'administration virale des opsines, soulève aussi deux remarques tout d'abord le déclenchement potentiel de réponses immunitaires contre l'AAV et le problème du manque de promoteurs spécifiques des sous-types neuronaux différents dans la rétine. Enfin l'intensité lumineuse utilisée pour la stimulation optogénétique qui peut s'avérer très élevée notamment pour ChR2 peut être délétère et induire des dommages photochimiques. Par conséquent, la génération de nouveaux variants d'opsines plus sensibles à la lumière ou de lunette de stimulation adaptée est nécessaire. Enfin, la longueur d'onde nécessaire à la stimulation des opsines est un paramètre important pour des questions de sécurité, c'est pourquoi la génération de nouveaux outils optogénétiques dépolarisants et hyperpolarisants avec des spectres d'action décalés est à l'étude (Duebel, Marazova, et Sahel 2015).

Aux vues du caractère dégénératif des IRD, et donc une disparition des cellules cibles, une voie de recherche est la **thérapie cellulaire**. Le principe de la thérapie cellulaire se base sur le remplacement des cellules endommagées ou détruites par une transplantation de cellules dites « saines ». Ceci permet de stabiliser, conserver et améliorer l'état structurel de la rétine. L'œil propose de nombreux avantages pour l'application d'une stratégie de thérapie cellulaire, en effet il est facile d'accès et les actes chirurgicaux requis sont connus et maîtrisés, à un statut

immunoprivilège et les implants de cellules peuvent faire l'objet d'un suivi par une analyse microscopique. De plus, il a été démontré qu'un nombre relativement faible de cellules sauvées ou transplantées avait un effet détectable sur la vision grâce au phénomène d'amplification du système visuel. Le traitement se veut à prise unique et durable dans le temps (Pearson et al. 2012; Barber et al. 2013; MacLaren 2009).

La thérapie cellulaire repose sur la génération de cellules *in vitro* appelé greffon, il s'agit de dérivé de cellules souches pluripotentes ou multipotentes prélevées chez le patient ou chez un donneur ou bien de cellules différenciées reprogrammées. Il existe de nombreuses thérapies cellulaires en cours de développement, la pluralité des traitements repose principalement sur la nature des cellules utilisées. Les différents types cellulaires pouvant être utilisés sont les suivants, les précurseurs de cellules rétinienne, les cellules souches embryonnaires (ESC), les cellules souches pluripotentes induites (iPS), les cellules souches mésenchymales (MSC), les cellules olfactives enveloppantes (OECs) et les précurseurs neuronaux humains. Actuellement les thérapies utilisant les hESC (Ben M'Barek et al. 2018; Ben M'Barek, Regent, et Monville 2015) et les iPSC-derived (Maeda, Mandai, et Takahashi 2019) pour le traitement des RP ont fait leurs preuves. La thérapie cellulaire permet de remplacer les cellules mortes et donc d'intervenir plus tard dans la maladie contrairement à la thérapie génique. Cependant la thérapie cellulaire présente des inconvénients comme des ressources en cellules souches pluripotentes restreintes, les taux de survie et de migration des cellules transplantées sont assez faibles. Le processus de génération des iPS est long, coûteux et difficilement transposable à une large échelle. Et enfin, les problèmes de rejet par le système immunitaire de l'hôte dans le cas de greffe allogénique ou xénogénique et le déclenchement de réponses immunitaires dans l'espace rétinien sont à prendre en compte malgré l'utilisation de traitement immunosuppresseur. Enfin le risque de développer des tumeurs liées à une amplification massive non contrôlée du greffon est à prendre en compte.

Dans les maladies dégénératives de la rétine, les photorécepteurs sont principalement touchés (dont les molécules photosensibles nécessaires pour la cascade de phototransduction) cependant les neurones restants dans la rétine (cellules bipolaires et cellules ganglionnaires) peuvent être activés électriquement. C'est sur ce principe que se base le système des **prothèses rétiniennes**. Au cours du dernier quart de siècle, les systèmes de prothèses rétiniennes ont connu des avancées significatives, ce qui a permis le développement de plusieurs approches chirurgicales et techniques novatrices menant à l'autorisation de mise sur le marché en Europe ou aux États-

Unis de ces systèmes par exemple Alpha AMS (Edwards et al. 2018; Y. Liu et al. 2017), Intelligent Retinal Implant System (IRIS V2 (NCT02670980), *Suprachoroidal Retinal Prosthesis* (NCT01603576), PRIMA *high-resolution photovoltaic retinal prosthetic system* (NCT03333954). La prothèse rétinienne comporte plusieurs composants tels qu'un imageur (*imager*) qui va convertir la lumière en signal électrique, d'un élément électronique qui va traiter et conditionner l'image et générer des impulsions de stimulation électrique, et d'un réseau de microélectrodes pour stimuler la rétine (Weiland et Humayun 2014).

1.3.2. La thérapie génique

1.3.2.1. Définition de la thérapie génique par rAAV

Pour corriger les cellules défectueuses, il faut acheminer le transgène grâce à un vecteur. Parmi l'ensemble des essais cliniques en thérapie génique oculaire, les vecteurs les plus utilisés sont les vecteurs viraux dérivés de virus Adéno-Associés ou AAV recombinants (rAAV). Les AAV sont de petits virus non enveloppés à ADN simple brin, ils appartiennent à la famille des *Parvoviridae*, et plus particulièrement aux virus-dépendants (*Dependovirus*). En effet, lorsque l'AAV va infecter une cellule, son programme d'expression génique est auto-réprimé et la latence est levée par l'infection de la cellule hôte par un virus *helper* (comme par exemple l'adénovirus, le virus de l'herpès, ou le cytomégalovirus.) (Daya et Berns 2008; Deyle et Russell 2009).

Actuellement, il existe plus d'une centaine de variants génétiques des AAV naturels. Ces variations génétiques vont principalement impacter la capsid des vecteurs viraux et induire la création de plusieurs variants. La capsid des AAV forme un icosaèdre de 25 nm de diamètre et est constituée des protéines structurales VP1 (protéine virale 1), VP2 et VP3 qui vont déterminer le tropisme des variants. Une douzaine de sérotypes de rAAV sont classiquement utilisés et sont capables de transférer efficacement le transgène aux cellules cibles oculaires (i.e. cellules du RPE) comme les rAAV2, rAAV4, AAV6, AAV8 et rAAV9 (MacLaren 2009; Khabou et Dalkara 2015; Planul et Dalkara 2017). Le mécanisme d'entrée des AAV et rAAV dans les cellules cibles va différer en fonction du sérotype mais de manière générale les AAV vont infecter la cellule grâce à l'adhésion cellulaire, subir une endocytose, être décapsidés, transloquer à l'intérieur du noyau et être maintenu sous forme épisomale pour être ensuite libéré et exprimé (Lebherz et al. 2008a; A. K. Zaiss et Muruve 2008).

Les rAAVs sont capables de transduire une grande variété de types cellulaires (le foie, les muscles et les yeux) de façon stable, sur le long terme et sans risque génotoxique (Srivastava 2016). Les vecteurs à base d'AAV sont efficaces pour le transfert de gènes dans la rétine. Le sérotype 2 du virus adéno-associé (AAV2) est le sérotype le plus étudié et le mieux caractérisé. Par exemple, le vecteur AAV2/8 est un vecteur AAV recombinant car les protéines qui composent sa capsid sont issues de l'AAV8 et les séquences ITRs de la séquence d'ADN sont issues de l'AAV2 (Tableau 1). Les ITRs vont encadrer le promoteur, le transgène et un gène codant pour la polyAdénylation, l'ensemble de ces éléments composent la cassette d'expression du transgène. L'AAV2 est un excellent vecteur pour la transduction du RPE ou les cellules ganglionnaires mais il n'est pas efficace pour la transduction d'autres types cellulaires, tels que les photorécepteurs. C'est pourquoi il a fallu modifier les vecteurs afin de mieux cibler un tissu ou cellules cibles d'intérêt mais aussi réduire la capacité d'intégration des AAV et enfin augmenter leur efficacité de transduction. L'ingénierie de la capsid d'AAV et des promoteurs a donc été une étape nécessaire pour mieux cibler les cellules d'intérêt (Daya et Berns 2008; DiCarlo, Mahajan, et Tsang 2018).

Tableau 1 : Les types cellulaires ciblés par différents variants de virus adénoassociés (AAV). Les AAV obtenus après ingénierie de la capsid sont représenté en italique et les AAV avec des capsides naturelles sont représentés en police normale. AC : Cellules amacrines ; BPC : Cellules bipolaires ; HC : Cellules horizontales ; MGC : Cellules gliales de Müller ; PR : Photorécepteurs ; RGC : Cellules ganglionnaires rétiniennes ; RPE : Epithélium rétinien pigmentaire. (Planul et Dalkara 2017)

Capsid	Transduced cell types		
	Intravitreal	Subretinal	Systemic
AAV1	–	RPE, PR	–
AAV2	RGC, MGC	RPE, PR	–
AAV2.3YF	RGC, MGC, AC, HC	PR	–
AAV2.4YF	RGC, MGC, AC, HC, PR, RPE	RPE, PR, HC, RGC	–
AAV2–7m8	RGC, BPC, MGC, AC, HC, PR, RPE	RPE, PR, BPC, RGC	–
AAV4	–	RPE	–
AAV5	–	RPE, PR	–
AAV6	RGC	RPE, PR	–
AAV7	–	RPE, PR	–
AAV8	RGC	RPE, PR	–
AAV8BP2	RGC, BPC, AC, HC, PR	RPE, PR	–
AAV9	RGC	RPE, PR, MGC	RPE, RGC
AAV9.2YF	–	–	RPE, PR, MGC, RGC

La génération de nouvelle capsid peut se faire selon deux méthodes : (1) le design rationnel qui consiste à introduire des modifications ciblées pour améliorer les propriétés et le tropisme

viral (2) le criblage à haut débit par mutation dirigée (Dalkara et al. 2013; Khabou et Dalkara 2015).

Pour le **design rational**, la présence de mutations ponctuelles de tyrosines, prolines et/ou sérines va induire des modifications conformationnelles (modification des résidus d'acide aminés impliqués dans la phosphorylation et ou l'ubiquitination) et augmenter l'efficacité de transfert de gènes. Ensuite l'insertion peptidique permet de modifier le tropisme de l'AAV en insérant de courtes séquences peptidiques dans la capside.

Enfin le **criblage à haut débit par évolution dirigée** est une stratégie qui consiste à mimer le processus naturel de l'évolution, mais de façon accélérée en laboratoire (Figure 5). Cela permet de modifier les propriétés d'un vecteur pour obtenir un phénotype précis, la capside virale va être modifiée par différents procédés de mutagenèse dit aléatoire et aboutir à la création des millions de variants, constituant des librairies de variants hautement diverses. Ensuite un criblage spécifique va être effectué pour déterminer et sélectionner le ou les meilleurs variants. Dans le contexte rétinien, cette stratégie a permis l'identification de ShH10, un variant viral transduisant spécifiquement les cellules gliales de Müller. L'administration d'un vecteur de thérapie génique ShH10 exprimant le facteur neurotrophique GDNF, a permis de ralentir la dégénérescence de la rétine dans un modèle murin de rétinopathie pigmentaire (Klimczak et al. 2009; Yin et al. 2011). Un autre exemple est la création du variant AAV2.7m8 (caractérisé par l'insertion d'un peptide de 10 acides aminés exposé 60 fois par la capside du virus), il peut transduire efficacement l'ensemble des couches de la rétine chez le rongeur par voie intra-vitréenne dommage à la rétine (Dalkara et al. 2013; Khabou et Dalkara 2015).

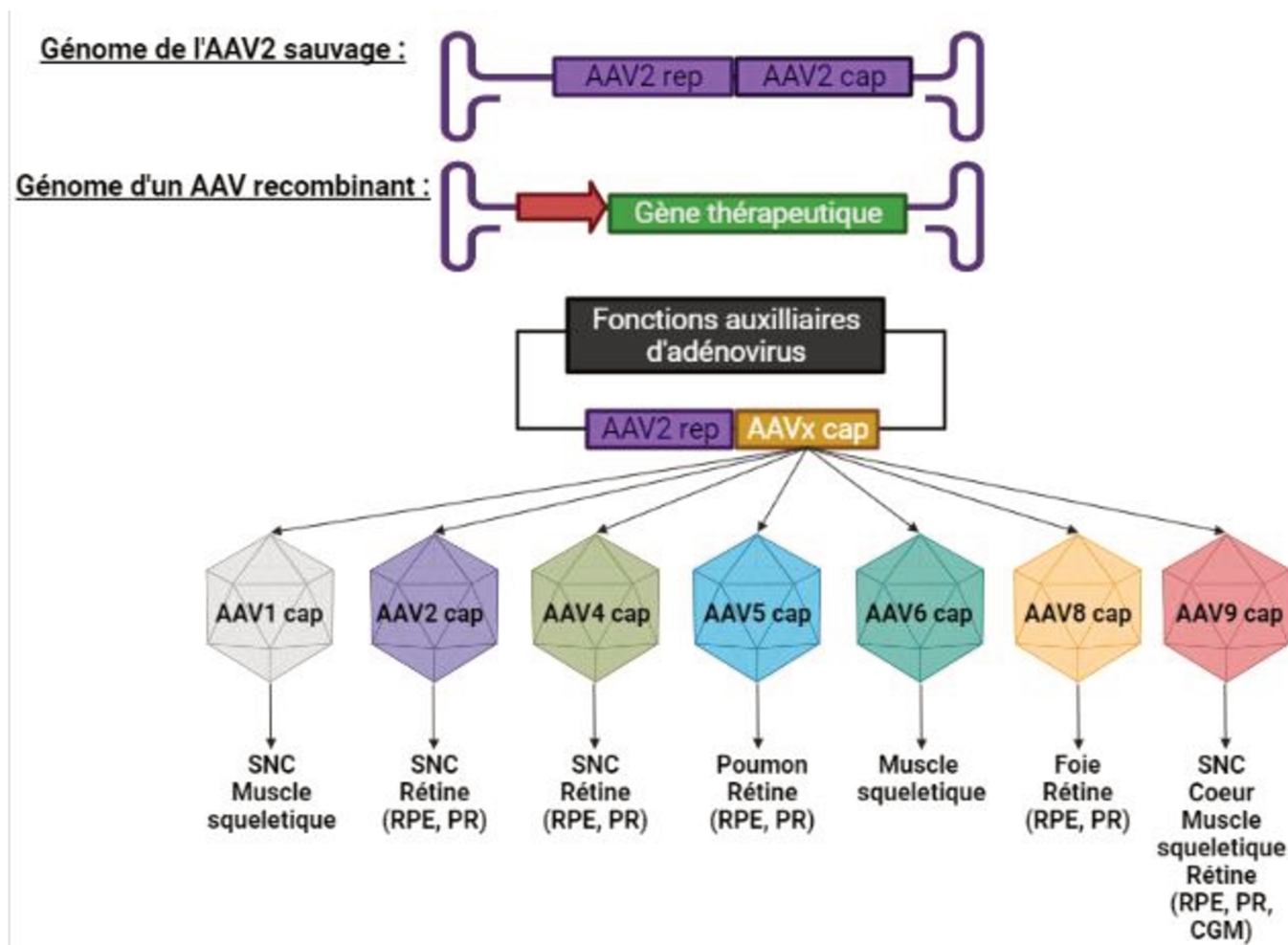


Figure 5 : Représentation schématique de la production de rAAV à partir d'un AAV2. L'AAV2 sauvage est un vecteur à ADN simple brin composé de trois ORF. L'ORF *rep* code les protéines nécessaires à la réplication du virus, *cap* code les protéines de la capside virale (impliqué dans l'encapsidation de l'AAV). Les ITR (*inverted terminal repeat*) sont des séquences répétées inversées utiles dans la réplication et l'encapsidation du virus. Les ORF *rep* et *cap* sont remplacées par le gène thérapeutique et un promoteur spécifique dans le rAAV. La production en laboratoire de l'AAV recombinant nécessite l'utilisation d'un plasmide auxiliaire contenant : (1) des gènes adénoviraux, à fonctions auxiliaires (maximiser la production du virus), (2) l'ORF *rep* d'AAV2, et (3) l'ORF *cap* du sérotype choisi en fonction du tissu ou de l'organe à cibler. L'AAV recombinant est alors appelé AAV2/x, x correspondant au sérotype choisi. *Cap* : capside ; CGM : cellule gliale de Müller ; EPR : épithélium pigmentaire rétinien ; ITR : *inverted terminal repeat* ; *rep* : réplication ; SNC : système nerveux central ; PR : photorécepteur (Adapté de Khabou et Dalkara 2015).

Enfin la nature du promoteur est très importante, l'ingénierie a permis la création et le remplacement progressif des promoteurs ubiquitaires par des promoteurs cellules-spécifiques (i.e. RPE, photorécepteurs). Il existe de nombreux promoteurs naturels ubiquitaires (i.e. CMV, CAG) et des promoteurs spécifiques du RPE (i.e. hBEST1) ou des photorécepteurs (i.e. Rho ; RedO, CAR, GRK1). Il a été montré que les promoteurs ubiquitaires et RPE spécifique avaient une toxicité dose-dépendante plus élevée que pour les promoteurs photorécepteurs spécifiques (Buck et Wijnholds 2020).

Malgré tout l'utilisation des vecteurs se doit d'être adaptée à chaque situation, de nombreux facteurs tels que le type de vecteur, le sérotype, le promoteur mais aussi la voie d'injection, sont à prendre en compte. En effet il existe deux voies classiques d'injections intraoculaires : intravitréenne et sous-rétinienne (Figure 6).

La voie d'injection intravitréenne est très largement utilisée pour le traitement du décollement de la rétine (en introduisant de l'air dans la cavité vitréenne) et plus récemment pour le traitement de la DMLA en administrant des facteurs de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) ainsi que le traitement des dégénérescences rétiniennes par thérapie génique (Doshi, Bakri, et Fung 2011) . Le transgène est directement délivré dans la cavité vitréenne et s'étend à l'ensemble de la rétine. En général, cette approche permet une transduction efficace des cellules de la rétine interne (ou rétine de surface). Malgré la simplicité de cette méthode, plusieurs effets indésirables ont été observés, notamment au niveau inflammatoire (Peyman, Lad, et Moshfeghi 2009). Cela peut être lié à la quantité de vecteur injecté nécessaire pour obtenir un effet thérapeutique au vu de l'épaisseur de la rétine. Il faut aussi prendre en compte la viscosité du vitré, qui limite le trafic des vecteurs au sein de la rétine et la membrane limitante interne (MLI), barrière naturelle, qui filtre les particules allant du vitré à la rétine. Ces facteurs peuvent donc réduire l'efficacité de la transduction.

Ensuite, il existe une autre voie d'administration thérapeutique pour cibler directement la rétine externe (ou rétine profonde), la voie sous-rétinienne. Elle permet de cibler les photorécepteurs et le RPE. La délivrance du transgène est localisée, efficace dans la rétine externe et induit un décollement temporaire de la rétine au site de l'injection. Contrairement à l'injection intravitréenne, cette méthode permet un contact direct avec la membrane plasmique des cellules cibles et l'expression du transgène se manifeste 1 semaine post-injection chez la souris. L'un des avantages est qu'elle nécessite une faible dose de vecteur viral pour obtenir une efficacité thérapeutique, ce qui réduit la réponse inflammatoire. Depuis lors, elle est utilisée avec succès dans de nombreux essais cliniques pour le traitement des dystrophies de cône et bâtonnet, elle est relativement efficace, sûre et non toxique (Miller et Vandenberghe 2018).

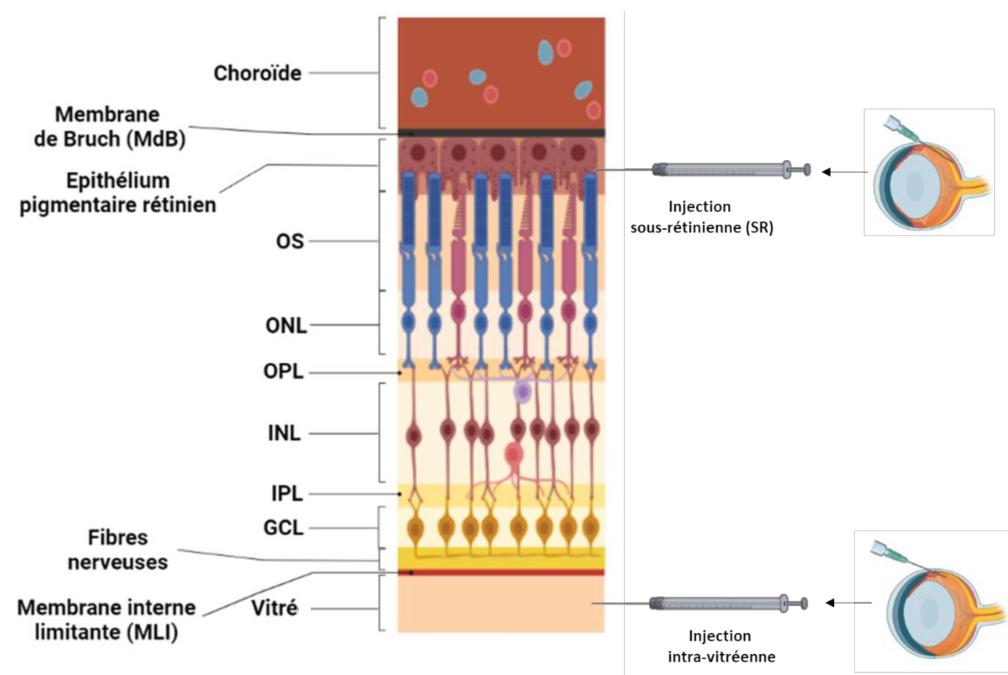


Figure 6 : Voies d'administrations intra-vitréennes et sous-rétiniennes.

1.3.2.2. Résultats des traitements par thérapie génique par rAAV

Deux éléments clés ont permis la mise en place de la thérapie génique oculaire par AAV. Tout d'abord, en 1996, l'équipe de Robin Ali a effectué la preuve de principe qu'une injection sous-rétinienne de vecteur rAAV chez la souris *Nude*, pouvait transduire la rétine et plus particulièrement le RPE et les photorécepteurs (Ali et al. 1996). Ensuite l'identification et la caractérisation de modèles animaux murins, canins présentant des dégénérescences rétiniennes a été décisif pour le développement des thérapies. En effet, en 1999, Veske et al. ont identifié chez le chien Briard (Veske et al. 1999), que la mutation du gène RPE65 était responsable de LCA2 caractérisée par une dystrophie rétinienne à apparition précoce, une mauvaise vision, des réponses d'électro-rétinographie (ERG) éteintes, un nystagmus et des réflexes pupillaires anormaux et la cécité. L'injection d'ADNc de la RPE65 délivré par l'AAV2 a permis une amélioration rapide de la fonction visuelle chez les chiens et elle s'est maintenue dans le temps. Des études sur le modèle murin rd12 (avec une mutation non-sens de Rpe65) ont également montré que l'administration de RPE65 par AAV avait un effet bénéfique.

Les différentes études chez les chiens Briard (G. Le Meur et al. 2007; Narfström et al. 2003), les modèles murins atteints de dégénérescence rétinienne et chez des primates (Amado et al. 2010; Stieger et al. 2009) ont montré que le rAAV2/2 transduit les photorécepteurs et l'épithélium rétinien pigmentaire de façon stable et sur le long terme. Ceci a permis de

surmonter le blocage biochimique du cycle visuel provoqué par la mutation de RPE65. Les résultats encourageants sur les différents modèles animaux ont permis l'application de la thérapie génique oculaire chez l'homme.

À partir de 2007, trois essais de phase I/IIa sur l'administration sous-rétinienne d'ADNc de RPE65 à l'aide d'AAV2 ont constaté l'absence d'effet indésirable grave et ont montré une amélioration de la navigation dans l'espace de façon autonome chez certains patients et des réflexes pupillaires.

L'équipe du *Children's Hospital* de Philadelphie, a effectué une percée remarquable en prouvant que la réadministration d'un vecteur AAV2.RPE65 dans l'œil controlatéral de patients précédemment traités était sûre et entraînait une amélioration de la sensibilité à la lumière et de la navigation autonome. Ceci a permis de démontrer que les réponses immunitaires des vecteurs précédemment administrés n'affecteraient pas le traitement ultérieur dans l'œil non traité. Puis, un essai de phase III étudiant l'administration sous-rétinienne bilatérale d'AAV2.hRPE65v2 a été lancé en 2013. Après deux ans, une amélioration de la mobilité et de la sensibilité à la lumière chez les patients traités a été observé. Après ces nombreux succès, en janvier 2018, le LUXTURNTM (AAV2.hRPE65v2 ; *voretigene neparvovec-rzyl* ; Spark Therapeutics Inc., USA) a été le premier traitement par thérapie génique d'une maladie monogénétique (LCA2 avec RPE65 muté) approuvée par la Food and Drug Administration (FDA). Les essais pour lesquels les résultats ont été publiés rapportent une amélioration de la vision chez la majorité des patients, avec un effet plus marqué pour les patients ayant reçus les plus fortes doses de vecteur. En effet, la vision des patients s'est améliorée en moins d'un mois (Cideciyan et al. 2009; Jacobson, Boye, et al. 2006; Simonelli et al. 2010). Les paramètres mesurés pour évaluer les changements de la vision avant et après l'injection sont la sensibilité à la lumière, les réflexes pupillaires, les modifications du champ visuel et la capacité à naviguer seul parmi des obstacles. La quasi-totalité des patients a montré dans le mois suivant l'injection intraoculaire, une amélioration de leur sensibilité à la lumière, une augmentation de leur capacité à naviguer seul à travers des obstacles, ainsi qu'une diminution du nystagmus. De plus, cette amélioration post-injection de la vision des patients traités n'a pas fait l'objet d'effets secondaires majeurs (Bainbridge et al. 2015a; 2008).

Actuellement, plus de trente essais cliniques sont actuellement en cours, basés sur l'injection de vecteurs dérivés de virus adéno-associés (principalement AAV2, AAV5 et AAV8) en zone

sous-rétinienne pour cibler les photorécepteurs ou les cellules de l'épithélium rétinien pigmentaire. La plupart sont en phase I/II d'essais, et utilisent différents vecteurs pour le traitement des dégénérescences rétiniennes. Dans la majorité des cas, des vecteurs rAAV sont utilisés pour le traitement de la choroïdémie (AAV2-REP1), la RP liée à l'X (AAV-RPGR ; rAAV2tYF-GRK1-RPGR), la RP due à des mutations de la PDE6B (HORA-PDE6B), la neuropathie optique héréditaire de Leber associée à la ND4 (rAAV2/2-ND4), le rétinosis lié au chromosome X (AAV-RS1 ; rAAV2tYF-CB-hRS1), et l'achromatopsie (AAV-CNGB3 ; rAAV2tYF-PR1.7-hCNGB3) (Tableau 2). Toutefois, des vecteurs lentiviraux sont utilisés pour le traitement des patients atteints de DMLA et le syndrome d'Usher.

Tableau 2 : Thérapie génique oculaire par rAAV enregistrés sur clinicaltrials.gov. (Buck et al., 2020)

Disease	Year	Product	Capsid	Promoter	Intron	Other	Gene	PolyA	Production
LCA	2007	hRPE65v2	AAV2	CAG	β-globin		RPE65	bGH	HEK293
LCA	2007	AAV-RPE65	AAV2	CB-SB			RPE65	SV40	HEK293
LCA	2008	tgAAG76	AAV2	hRPE65			RPE65	bGH	B50, helper adenovirus
LCA	2011	HORA-RPE65	AAV4	hRPE65			RPE65	bGH	HEK293
LCA	2016	OPTIRPE	AAV5	NA65	SV40		RPE65	SV40	HEK293
AMD	2009	sFLT01	AAV2	CAG	β-globin		sFLT01	bGH	HEK293
AMD	2011	OXB-201	ELAV	CMV		IRES + WPRE	Endo+ Angio	SIN-LTR	?
AMD	2011	AAV.sFlt-1	AAV2	CMV	Chimeric intron		sFlt-1	SV40	HEK293
AMD	2017	RGX-314	AAV8	CAG/CB7	β-globin		aVEGFAfabH.F2A	rabbit	?
AMD	2018	HMR59	AAV2	CAG	β-globin ^{SD/SA}		aVEGFfabL	β-globin	?
AMD	2018	ADVM-022	AAV2-7m8	CMV	β-globin ^{SD} Ig ^{SA}	TLP-eMLP	sCD59	bGH	?
AMD	2019	GT005	AAV2	CBA	β-globin	WPRE	sFLT01co	bGH	?
LHON	2010	AAV2-ND4	AAV2	CMV	5'UTR COX10	3'UTR COX10(MTS)	ND4	bGH	HEK293, HSV1-rc/ΔUL2
LHON	2011	scAAV2-P1ND4v2	AAV2-tYF	smCBA		ATP1(MTS); WPRE	ND4	bGH	HEK293
LHON	2014	GSO10	AAV2	CMV	β-globin	COX10(MTS)	ND4	3'COX10	HEK293
Stargardt	2011	SAR422459	ELAV	CMV			ABCA4	SIN-LTR	HEK293
CHM	2011	AAV2.REP1	AAV2	CAG	β-globin ^{SD/SA}	WPRE	CHM	bGH	HEK293
CHM	2015	AAV2.REP1	AAV2	CAG	β-globin		CHM	bGH	HEK293
RP	2011	AAV2.MERTK	AAV2	hVMD2	SV40 ^{SD/SA}		MERTK	SV40, bGH	HEK293
Usher	2012	UshStat	ELAV	CMV		WPRE	MYO7A	SIN-LTR	HEK293
Usher	2018	QR-421a				ACON-USH2A			Synthetic
LCA	2019	EDIT-101	AAV5	U6; hGRK1	SV40 ^{SD/SA}	gRNA-CEP290	SaCas9	Synthetic	HEK293
LCA	2019	AAV5.GUCY2D	AAV5	hGRK1	SV40 ^{SD/SA}		GUCY2D	bGH	HeLaS3
XLR	2015	AAV2-tYF.RS1	AAV2-tYF	smCB	β-globin ^{SD/SA}	WPRE	RS1	SV40	rHSV/sBHK
XLR	2017	scAAV8-RS1	AAV8	hRS1	RS1	IRBP enhancer	RS1	Human β-globin	HEK293
ACHM	2015	AAV2-tYF.CNGB3	AAV2-tYF	PR1.7	SV40 ^{SD/SA}		CNGB3	SV40	rHSV/sBHK
ACHM	2015	AAV.CNGA3	AAV8	hCAR		WPREm	CNGA3	bGH	HEK293
ACHM	2016	AAV8.CNGA3	AAV8	hG1.7			CNGA3	SV40	HEK293
ACHM	2016	AAV8.CNGB3	AAV8	hCAR			CNGB3	SV40	HEK293
ACHM	2019	AGTC-402	AAV2-tYF	PR1.7	SV40 ^{SD/SA}		CNGA3	SV40	rHSV/sBHK
RP	2017	AAV8.RPGR	AAV8	hGRK1			RPGRco-ORF15	bGH	HEK293
RP	2017	AAV-RPGR	AAV5	hGRK1	SV40 ^{SD/SA}		RPGRco-ORF15-Long	SV40	HEK293
RP	2017	AGTC-501	AAV2-tYF	hGRK1	SV40 ^{SD/SA}		RPGRco-ORF15	SV40	rHSV/sBHK
RP	2017	RST-001	AAV2	CAG	β-globin ^{SD/SA}	WPRE	Chop2/Chr2	bGH	HEK293
RP	2017	GSO30	AAV2-7m8	CAG			ChrimsonR-tdT	bGH	?
RP	2020	BSO1	AAV?	?			Chr90-FP	?	?
RP	2017	AAV5.PDE6B	AAV5	hGRK1			PED6B	bGH	HEK293
RP	2017	CPK850	scAAV8	sRLBP1	mSV40 ^{SD/SA}		RLBP1	SV40	HEK293

Ordered on registration date (year) and disease. Full description, size (bp) of elements, and citations can be found in Table S1.

2. L'œil, une « dualité » immunologique

2.1. Présentation des éléments clés du système immunitaire

Les informations de cette partie sont en partie issues du chapitre « Bases fondamentales : Immunologie générale » du livre Uvéite, écrit par Sylvain Fisson et Julie Vendomèle et publié en mai 2017 (Fisson et Vendomèle 2017).

Le système immunitaire a pour fonction de maintenir l'intégrité de l'organisme en protégeant d'agressions externes tel que l'introduction de micro-organismes pathogènes ou le dérèglement de cellules internes (i.e. tumeurs, cellules cancéreuses ou en apoptose). Pour cela le système de défense qu'est le système immunitaire, doit pouvoir différencier ce qui appartient à l'organisme (*le soi*) du *non-soi* (ou faux-soi pour les cellules pro-tumorales) de façon continue et dynamique, puis mettre en place une réponse adaptée. La détection du *soi* et du *non-soi* ainsi que la mise en place d'une réponse immunitaire (ou non), peuvent être deux actions déconnectées. L'hypothèse des signaux de danger de Polly Matzinger, va être un des éléments majeurs qui va conditionner l'état de la réponse face au *soi* ou *non-soi*. Cette théorie affirme que ce n'est pas la différence entre le *soi* et le *non-soi* qui va conditionner la réponse immunitaire mais le niveau et la nature des signaux de danger associés au *non-soi* potentiellement pathogène. Ainsi, les éléments du *non-soi* pathogènes ou les cellule délétères pour l'organisme, qui présentent des signaux de danger endogènes, vont induire une réponse immunitaire.

Ces signaux de danger sont majoritairement fournis par des constituants de pathogènes représentés par les PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) ou DAMPs (*Damage-Associated Molecular Pattern*), et détectés par des récepteurs avec un large spectre de reconnaissance les PRRs (*Pattern-Recognition Receptor*). Le PRRs sont exprimés de façon membranaires ou intracellulaires par les cellules immunitaires principalement.

Le système immunitaire a plusieurs niveau d'organisation, un niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire. Au niveau tissulaire on va distinguer les organes lymphoïdes primaires (i.e. moelle osseuse et thymus) des organes lymphoïdes secondaires (i.e. rate, ganglion lymphatique et tissus lymphoïdes annexés aux muqueuses). Les organes lymphoïdes primaires sont le siège de la génération des cellules immunitaires (hématopoïèse) et leur différenciation. Les organes lymphoïdes secondaires jouent un rôle majeur dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative puisqu'ils sont le lieu de rencontre entre les antigènes (éléments pathogènes) et les cellules immunitaires. Au niveau cellulaire on distingue les lignées lymphoïdes et myéloïdes,

qui seront les cellules effectrices de la réponse immunitaire. Au niveau moléculaires, on compte un grand nombre d'acteurs (molécules solubles ou membranaires) tels que les immunoglobulines, cytokines, chimiokines, récepteurs membranaires et facteurs du complément, qui jouent un rôle dans la détection du non soi et la modulation de la réponse immunitaire. Généralement on distingue la réponse immunitaire en deux axes, la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative, qui sont fortement interconnectées et interdépendantes.

La **réponse immunitaire innée** est dite non spécifique et est immédiate, elle constitue la première ligne de défense contre l'entrée de pathogène extérieur dans l'organisme. L'action n'est pas dirigée spécifiquement contre un antigène donné mais contre un agent exogène (*Pathogen-Associated Molecular Pattern* PAMP) ou des lésions tissulaires (*Damage-Associated Molecular Pattern*, DAMP). Le but de la réaction est de créer un milieu hostile au développement du pathogène, l'éliminer, réparer les lésions tissulaires et d'initier la réponse immunitaire adaptative. Le système immunitaire dit « innée » comprend de nombreux types cellulaires (majoritairement issu de la lignée myéloïde) et des barrières naturelles physiques (peau, muqueuses, conjonctive de l'œil), biologiques (acidité locales, enzymes etc.). Après avoir capté efficacement les particules ou macromolécules étrangères, les cellules locales et immunitaires vont sécréter des facteurs (cytokines, chimiokines) qui aide au recrutement d'autres cellules immunitaires tels que les neutrophiles et/ou les monocytes qui se différencieront en macrophages. Les macrophages vont phagocyter les pathogènes, les apprêter (*processing*) et migrer vers les organes lymphoïdes secondaires afin de présenter le pathogène et initier la réponse adaptative. L'inflammation clinique va se caractériser par les signes cardinaux suivants : la tuméfaction (*Tumor*), la douleur (*Dolor*), la chaleur (*Calor*), la rougeur (*Rubor*) et éventuellement la perturbation de la fonction du tissu ou de l'organe touché (*Functio laesa*).

La **réponse immunitaire adaptative** est dite spécifique et non immédiate puisque plusieurs jours sont nécessaires à sa mise en œuvre. Elle est dite spécifique car elle est dirigée contre un antigène donné et à la particularité de développer une réponse immunitaire mémoire contre ce dernier lors d'une réexposition ultérieure. Deux mécanismes importants sont mis en jeu, la réponse immunitaire à médiation cellulaire et la réponse immunitaire humorale qui respectivement permettent d'assurer une défense contre les pathogènes intracellulaires et extracellulaires. Ils font intervenir des types cellulaires différents mais interconnectés, les

cellules clés de l'immunité à médiation cellulaire sont les lymphocytes T et pour la réponse humorale il s'agit des lymphocytes B. Les deux mécanismes immunitaires ont en commun les phases suivantes : la reconnaissance de l'antigène, l'activation des lymphocytes au sein des organes lymphoïdes secondaires, la phase d'expansion clonale des lymphocytes spécifiques de l'antigène, l'élimination de l'antigène, la phase de déclin des cellules effectrices et la mise en place d'une mémoire immunitaire spécifique de l'antigène donné.

L'antigène peut être *processé (apprêter/présenter)* de trois manières différentes, tout d'abord la présentation classique sur les molécules de CMH I pour les protéines cytoplasmiques endogènes. Les protéines cytoplasmiques vont être prise en charge et dégradées en peptides de petites tailles par le protéasome puis amenés dans le réticulum endoplasmique où ils vont s'associer avec les CMH I et être transportés à la membrane. La protéine endogène présentée ne déclenchera pas de réaction (tolérance centrale). D'autre part les éléments exogènes (i.e. Bactérie), vont être endocytés par les cellules présentatrice d'antigène (CPA) au sein d'un phagosome. Après la maturation en phagolysosome, les protéines exogènes vont être dégradées en peptides et chargés sur des MCH II. Ce complexe CMH II/Antigène transporté jusqu'à la membrane permettra la stimulation des lymphocytes T CD4+. Enfin une dernière voie de présentation non classique existe, il s'agit de la cross-présentation. Lorsque des cellules dendritiques phagocytent des cellules infectées ou des débris cellulaires, la dégradation entraînent la formation de peptides qui pourront être chargés et présentés sur des CMH I et donc induire une réponse CD8⁺ (Bevan 1976; Heath et Carbone 2001; Vyas, Van der Veen, et Ploegh 2008) (Figure 7).

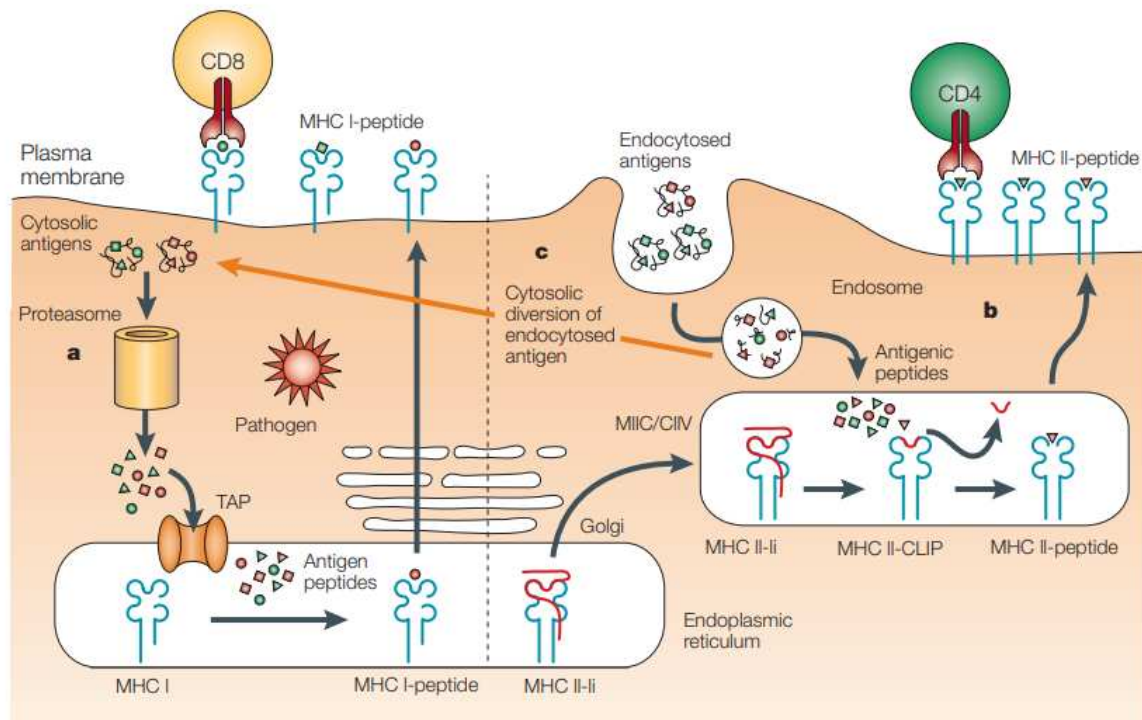


Figure 7 : Voies de présentation antigénique sur les molécules de CMH. (Heath and Carbone, 2001)

On distingue deux grandes populations de **lymphocytes T (ou LT)**, les lymphocytes T $CD4^+$ (ou Lymphocyte T *helper*) et $CD8^+$ (Lymphocyte T cytotoxique), ils se distinguent par la présence à leur surface de glycoprotéines membranaires différentes (CD4 et CD8 respectivement). En fonction de leur stade d'activation, on peut distinguer plusieurs types de LT dont les LT naïfs, les LT effecteurs et les LT mémoires. Pour l'ensemble des les LT naïfs c'est la reconnaissance du complexe CMH/Antigène par le lymphocyte, associée aux molécules de co-stimulation CD80/CD86 et aux cytokines, qui permet l'activation du lymphocyte et sa prolifération (ou expansion clonale). L'influence des cytokines sur les lymphocytes est très importante puisqu'elle permet de les polariser et d'acquérir une fonction spécifique.

Par exemple, pour les LT $CD4^+$, la présence d'IL-4 dans l'environnement va induire une polarisation des LT $CD4^+$ en LT $CD4^+$ de type Th2 et ainsi induire la production d'IL-4, IL-5, IL-10 et IL13 et favoriser une réponse humorale. Plus précisément l'interaction entre les T $CD4^+$ de type Th2 et les LB activés (spécifiques d'un antigène) va permettre la différenciation des LB activés en plasmocytes, et ces derniers vont sécréter des anticorps spécifiques de l'antigène (ou Immunoglobulines, Ig). Au contraire, pour les LT $CD4^+$, la présence d'IL-2 dans l'environnement va induire une polarisation de type Th1 et conduire à la sécrétion d'IL-2, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ Th1 et accentuer l'action des lymphocytes T $CD8^+$.

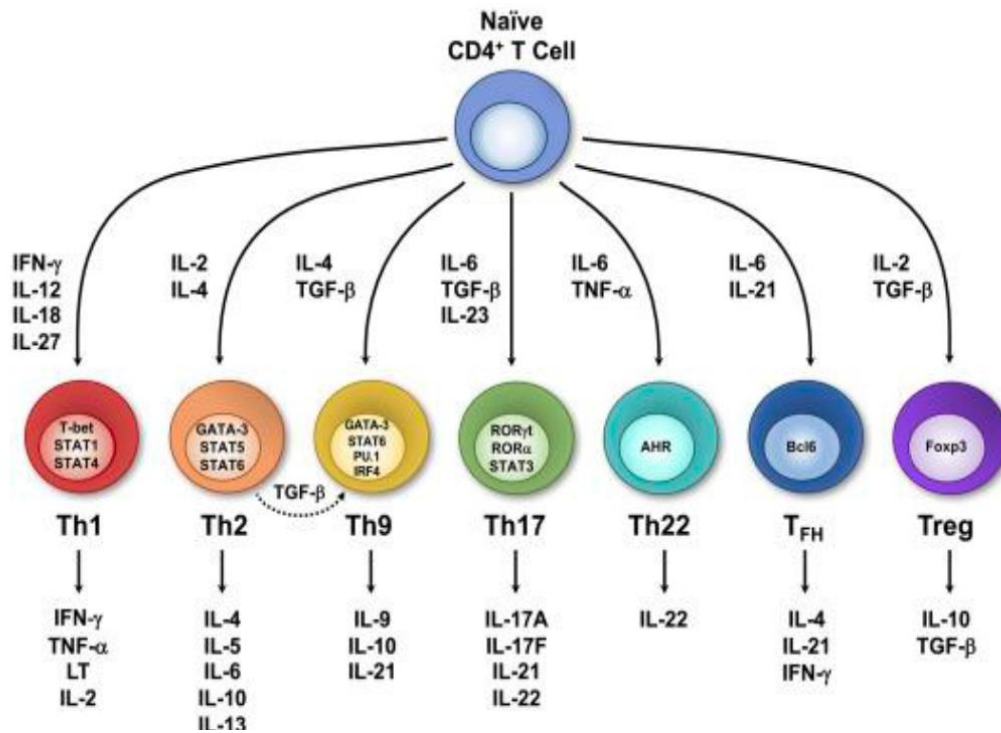


Figure 8 : Polarisation des lymphocytes T CD4+. (Liudahl et Coussens 2018)

Ensuite, les LT cytotoxiques (Tc) peuvent eux aussi se polariser en fonction des cytokines environnantes (Mittrücker, Visekruna, et Huber 2014). Par exemple, l'IFN γ et TNF α vont induire la polarisation des Tc naïfs en Tc1, ce qui correspond à l'acquisition de la fonction cytotoxique et permet la lyse de toutes les cellules présentant le complexe CMH I/Antigène dont elles sont spécifiques. Enfin il existe d'autre Tc polarisés comme les Tc2 (profil cytokinique similaire au Th2) et les Tc17 qui semble jouer un rôle dans certaines réactions auto-immunes, des infections virales, ou encore dans la réponse anti-tumorale (Figure 8).

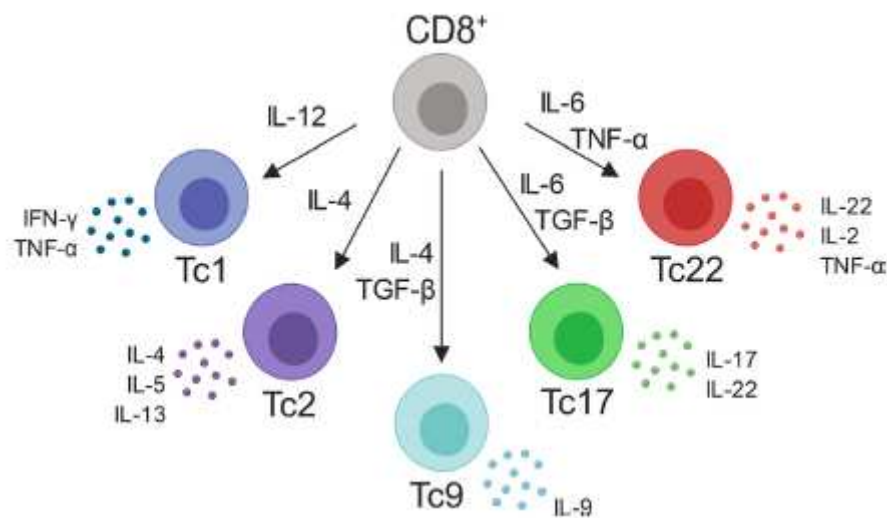


Figure 9 : Polarisation des lymphocytes TCD8⁺. (St. Paul et Ohashi 2020)

Au cours de leur maturation au sein de la moelle osseuse, **les lymphocytes B (LB)** vont exprimer à leur surface membranaire des immunoglobulines (hétérodimère protéique) susceptibles de reconnaître spécifiquement un antigène donné. Les LB représente entre 5 et 15% des lymphocytes circulants de surface. La combinaison des Ig de surface produites par le LB et des hétérodimères CD79 a et CD79b va former un complexe multimoléculaire appelé le BCR. Celui-ci correspond au récepteur pour l'Ag des LB. Après l'activation du BCR, les LB se transforment en plasmocytes et vont sécréter en grande quantité des Ig (ou Ac) de la même spécificité que le BCR. Parfois le LB peut jouer le rôle de CPA pour les LT préalablement activé par une DC dans la zone T. En effet, lorsqu'un Ag protéique est capturé par le BCR, celui va être internalisé et apprêté afin d'être exposé avec un CMHII à la membrane du LB. L'expression de molécule de co-stimulation CD80/86 va permettre la liaison au CD28 des LT, l'activation du LT va permettre la prolifération et la maturation des B et amplifier la réponse dirigée contre l'Ag (Figure 9).

En parallèle des réponses à médiation cellulaire et humorale, parmi les LT et les LB, certains vont acquérir un phénotype mémoire et vont perdurer dans l'organisme. Ainsi lors d'un second contact avec le pathogène, les LT et LB mémoires seront directement mobilisables et la réponse spécifique sera donc plus rapide et plus forte (Figure 10).

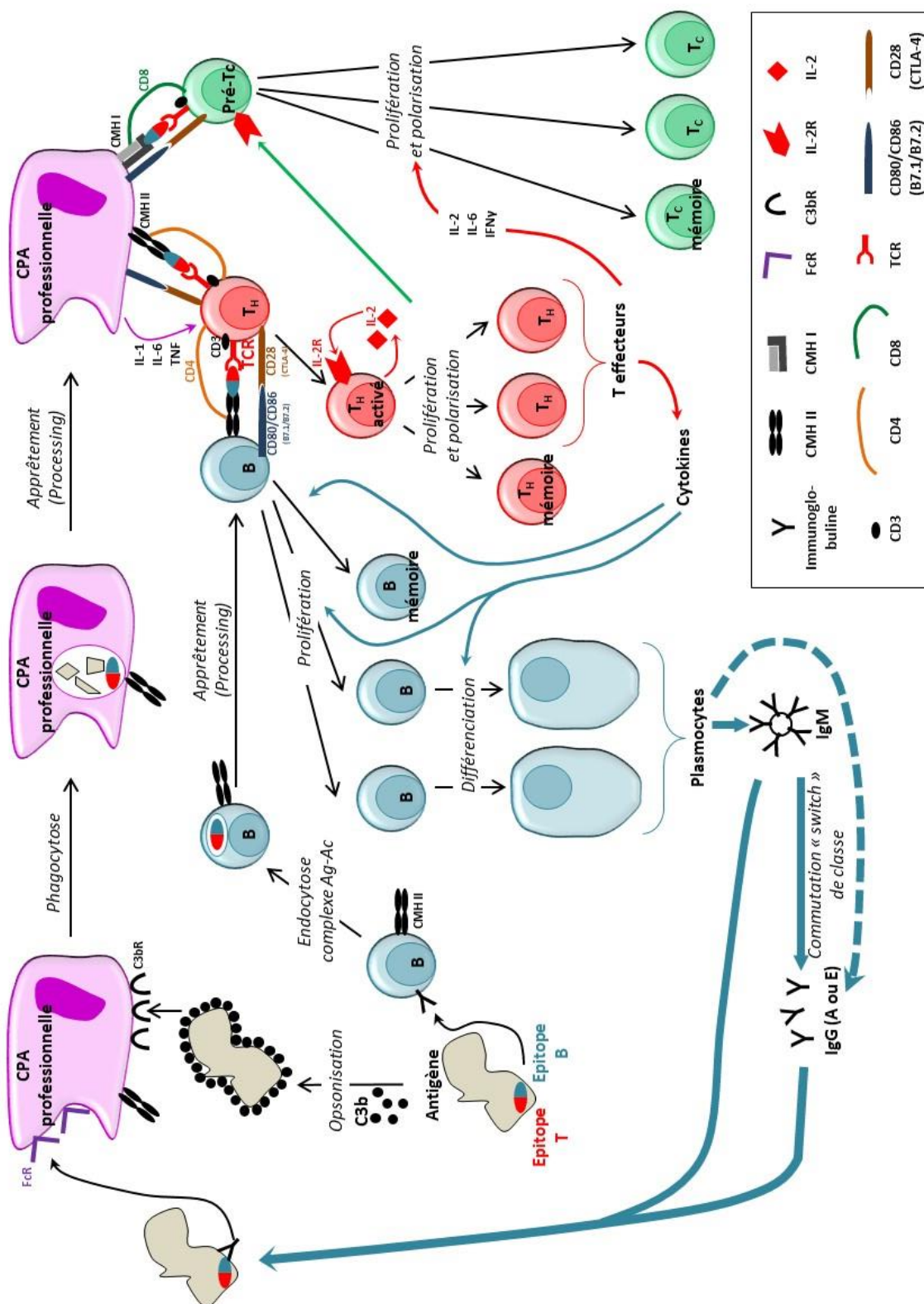


Figure 10 : Schéma simplifié d'une réponse immunitaire adaptative envers un antigène thymo-dépendant (Fisson et Vendomèle 2017)

Enfin en immunologie, les organismes oscillent inlassablement entre inflammation et tolérance, c'est pourquoi on doit prendre en compte qu'il existe une notion d'équilibre qui permet le maintien des conditions physiologiques. Il existe 2 types de tolérance : (1) la tolérance centrale qui permet d'éliminer les lymphocytes reconnaissant des molécules du soi et (2) la tolérance périphérique qui permet un contrôle actif des réponses auto-réactives ou de limiter les réponses inflammatoires dans les organes lymphoïdes secondaires. Cette dernière repose sur plusieurs mécanismes comme l'ignorance (tissus ne présentant pas de molécules du CMH comme le tissu adipeux, globules rouges), l'anergie (rendre non-réactifs des LT face à un antigène donné) et les LT régulateurs et les sites dits « immuno-privilégiés », tels que l'œil.

2.2. L'œil : un sanctuaire immunitaire

L'œil est une extension embryologique du système nerveux central, c'est pourquoi il est considéré comme un site spécifique d'un point de vue immunitaire. En effet, J Wayne Streilein définit les réponses immunitaires l'œil comme étant un « compromis dangereux » (Streilein 1987). Lors d'une réponse inflammatoire classique, le tissu se régénère pour remplacer le tissu lésé. Or dans l'œil, les cellules n'ont pas la capacité de proliférer car la régénération cellulaire est extrêmement limitée. Pour pallier au manque de régénération cellulaire, il semble que l'œil ait évolué de manière à limiter les réponses inflammatoires. Ce phénomène permet d'éviter des dommages délétères, due à l'infiltration de cellules inflammatoires, comme la perte de fonction secondaire ou la destruction des cellules oculaires et *in fine* la cécité. Dans la limite du raisonnable, l'œil possède une tolérance vis-à-vis des pathogènes afin de ne pas perdre la vue. Cependant l'œil n'est pas imperméable aux réactions inflammatoires, en effet la présence d'uvéites laisse à penser que l'œil possède une dualité immunologique. L'œil est considéré comme un **site-immunoprivilégié**, ceci implique qu'il est le lieu de réaction immunitaire non conventionnelle. L'œil peut être à la fois de nature immunosuppressive et de nature anti-inflammatoire. Ce privilège immunitaire est médié par : la présence de barrières physiques, un drainage lymphatique non conventionnel, un environnement moléculaire immunosuppresseur spécifique et l'induction d'une déviation immunitaire, appelée ACAID (*Anterior Chamber-Associated Immune Deviation*).

2.2.1. Les barrières physiques

Bien qu'il soit en interaction permanente avec le reste de l'organisme pour assurer un rôle majeur dans la vision, l'œil est considéré comme un organe relativement isolé et cloisonné. En effet, la présence de plusieurs barrières physiques va l'isoler du reste de l'organisme et limiter les échanges avec celui-ci. Les principales barrières physiques sont la barrière hémato-aqueuse, la membrane de Bruch et la barrière hémato-rétinienne.

La barrière hémato-aqueuse, est constituée des jonctions serrées au niveau de l'épithélium des corps ciliaires, des cellules endothéliales des vaisseaux iridiens et de la paroi interne de l'endothélium du canal de Schlemm. Ces jonctions limitent et contrôlent le transport de grosses molécules, de l'eau, des ions et des molécules liposolubles au sein de la chambre antérieure de l'œil (Coca-Prados 2014).

La membrane de Bruch (couche interne de la choroïde), c'est une matrice extracellulaire qui est située entre l'épithélium pigmentaire rétinien et la choriocapillaire (capillaires de la choroïde). Son épaisseur est variable et cinq couches constituées principalement de collagène et d'élastine compose la membrane de Bruch. Il s'agit d'une zone d'importance capitale car elle joue un rôle important dans les échanges métaboliques entre la RPE et la choroïde. En effet, elle agit comme une barrière filtrante semi-perméable à travers laquelle les nutriments, l'oxygène, les minéraux, des biomolécules et des déchets issus de la dégradation cellulaire vont être transportés passivement entre les deux compartiments. Le transport passif et le sens de circulation des éléments sont dépendants de la composition moléculaire, la pression hydrostatique et de la concentration des différentes molécules de part et d'autre de la membrane. Enfin elle sert aussi de support aux cellules du RPE (Santallier, Martine, Péchereau Jocelyne, et Péchereau, Alain 2008).

La barrière hémato-rétinienne (BHR) contrôle de façon très restrictive les échanges de métabolites, d'eau et des déchets entre la neuro-rétine et la circulation sanguine afin de maintenir un environnement rétinien approprié au fonctionnement neuronal. On distingue la BHR interne et la BHR externe (Figure 11). **La BHR interne** est composée d'un complexe de jonctions serrées et adhérentes entre les cellules gliales rétiniennes (pied des cellules gliales de Müller et des astrocytes), les péricytes et les cellules endothéliales. Les péricytes renforcent les cellules endothéliales grâce à la sécrétion d'angiopoïétine 1, ce qui favorise l'expression des protéines constituant les jonctions serrées. Ce complexe de jonctions serrées et adhérentes leur

confère un haut degré de contrôle sur la perméabilité des fluides et des solutés. Les flux de nombreuses substances, comme les lipides, les protéines et les ions, vont être contrôlés. De plus, la BHR interne contrôle la perméabilité des capillaires rétinien et à un rôle de barrière protectrice du parenchyme neuronal. **La BHR externe** est constituée d'une couche monocellulaire à jonctions intercellulaires serrées des cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (RPE). Elle contrôle les échanges hydro-ioniques et métaboliques entre la choriocapillaire et la rétine externe, limite le passage de substances toxique tout en garantissant le privilège immunitaire de l'œil (Rizzolo et al. 2011).

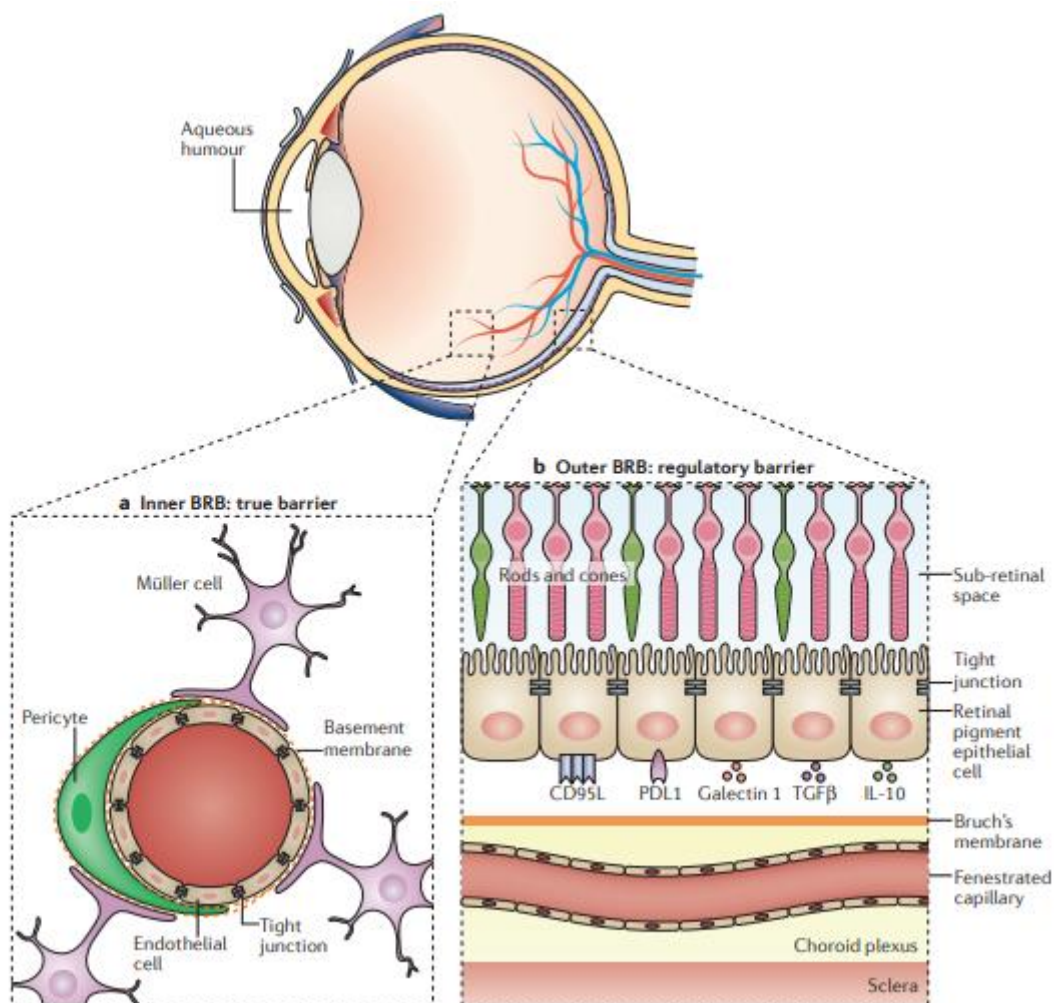


Figure 11 : La barrière hémato-rétinienne. La rétine est équipée de systèmes de barrières physiques qui régulent les flux d'ions, d'eau et de molécules hors de la rétine. La barrière hémato-rétinienne (BRB ou BHR) peut être séparée en deux composantes : la BHR interne formée par des jonctions serrées qui scellent les cellules endothéliales capillaires voisines (partie a) et la BHR externe, qui possède des jonctions serrées qui limitent les flux paracellulaires entre les cellules du RPE (partie b). Ces deux couches sont fondamentales pour maintenir le statut immunitaire de l'œil et la régulation de l'homéostasie rétinienne et la fonction visuelle. PDL1 : *programmed cell death 1 ligand 1* ; TGFβ : *transforming growth factor-β*. (Spadoni, Fornasa, et Rescigno 2017)

La **membrane limitante interne (MLI)** est une membrane basale qui sépare la rétine du vitré. Elle a une épaisseur de 2,5µm au niveau maculaire, sa face vitrénne est lisse tandis que sa face rétinienne est irrégulière car elle est en contact avec les pieds des cellules de Muller. Il s'agit d'un tissu de soutien pour la prolifération cellulaire et limite les échanges entre le vitré et la rétine (Figure 12).

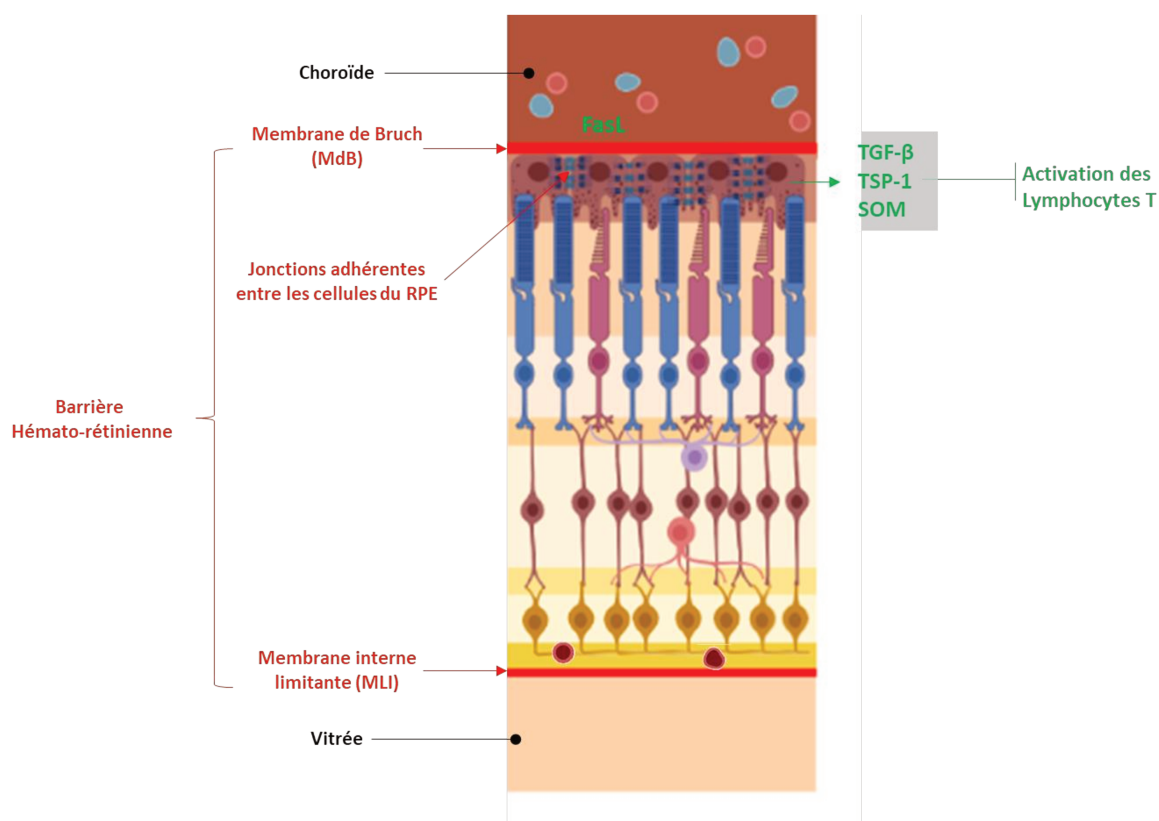


Figure 12 : L'œil : un sanctuaire immunitaire. Les barrières physiques de l'œil sont représentés en rouge et l'environnement immunosuppresseur en vert.

2.2.2. Les molécules immunosuppresseives de l'œil

L'œil est considéré comme un site immunologique privilégié du fait de la présence de molécules immunosuppresseives dans les fluides intraoculaires (humeur aqueuse, humeur vitrée) et peuvent être exprimées par les cellules oculaires (Figure 12). Elles vont avoir pour fonction d'inhiber les réponses inflammatoires ou d'induire une réponse pro-toléroène. Les principales molécules immunosuppresseives et leurs fonctions associées sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Molécules intraoculaires à fonction immunosuppressives. (Adapté de Vendomèle *et al.* 2018)

Facteur	Effet	Références
Acide rétinoïque (vitamine A)	Interagit avec TGF- β , rôle dans l'induction de lymphocytes T régulateurs	(Stein-Streilein, 2013, p.)
CD200/CD200R	Inhibe l'activation des cellules myéloïdes et des lymphocytes	(Hoek et al., 2000; Stein-Streilein, 2013)
CD95L (FasL)	Inhibe le recrutement et l'activation des neutrophiles Induit l'apoptose des neutrophiles et des lymphocytes T activés	(Green and Ferguson, 2001; Griffith et al., 1995; Jørgensen et al., 1998)
CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide)	Inhibe la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et d'oxyde nitrique par les macrophages	(Taylor et al., 1998)
CMH de classe la (faible expression) (cornée et rétine)*	Pas d'interaction avec les lymphocytes T CD8 ⁺	(Nieder Korn, 2007)
MIF (Macrophage migration Inhibitory Factor)	Inhibe l'action des NK	(Apte et al., 1998)
Protéines régulatrices du complément (e.g. Crry, CD46)	Inhibent la cascade du complément Induisent la sécrétion de TGF- β par les macrophages	(Bora et al., 1993; Goslings et al., 1998; Lass et al., 1990)
SOM (Somatostatin)	Inhibe la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T activés Induit la sécrétion d' α -MSH	(Taylor and Yee, 2003)
TGF-β2 (Transforming Growth Factor)	Inhibe l'activation des lymphocytes T et macrophages Induit des CPAs tolérantes Induit la génération de lymphocytes T régulateurs	(Cousins et al., 1991; Stein-Streilein, 2013; Streilein et al., 2000; Taylor et al., 1997; Taylor, 2007)
TSP (Thrombospondin)	Induit la sécrétion de TGF- β par les CPAs	(Masli et al., 2002, 2006; Stein-Streilein, 2013)
VIP (Vasoactive Intestinal Peptide)	Inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que l'activation et la prolifération des lymphocytes T Induit la sécrétion de cytokines immuno-modulatrices	(Delgado et al., 1999; Denniston et al., 2011; Stein-Streilein, 2013; Streilein et al., 2000)
α-MSH (Melanocyte-Stimulating Hormone)	Inhibe la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, et l'activation des neutrophiles Induit la production de TGF- β et convertit les lymphocytes T effecteurs en T régulateurs	(Stein-Streilein, 2013, p.; Taylor et al., 1992; Taylor, 2007)

2.2.3. Le drainage antigénique oculaire

Le système vasculaire lymphatique est considéré comme une seconde circulation, parallèle à la circulation sanguine. Il assure la circulation, le nettoyage de la lymphe (ou fluide interstitiel) et la clairance de particules insolubles comme des protéines constitutives et autres solutés non absorbés par le système vasculaire sanguin. Le réseau lymphatique draine la plupart des organes et achemine la lymphe vers les ganglions lymphatiques ou tissus lymphoïdes associés au muqueuses. Dans la plupart des tissus vascularisés, il est essentiel au maintien hydrostatique et homéostatique et la régulation de l'immunité (transport des cellules dans les organes lymphoïdes) (Nakao, Hafezi-Moghadam, et Ishibashi 2012).

Pendant longtemps l'existence de vaisseaux lymphatiques dans les tissus oculaires a été considérée comme absente or l'apparition de marqueurs endothéliaux lymphatiques spécifiques a permis de mettre en évidence l'existence et la distribution des vaisseaux lymphatiques et un drainage lymphatique non conventionnel (Figure 13). Au niveau intraoculaire, seuls les corps ciliaires présentent des vaisseaux lymphatiques (système uvéo-lymphatique) (Guignier et al.

2013). Au niveau extra-oculaire, la conjonctive, le limbe de la cornée, la glande lacrymale, les méninges orbitaires et les muscles extra-oculaires contiennent des vaisseaux lymphatiques. Cependant la cornée, la rétine et le nerf optique ne présentent pas de vaisseaux lymphatiques. Néanmoins, plusieurs articles suggèrent l'existence d'un système lymphatique paravasculaire non conventionnel. Ce système serait similaire au système glymphatique décrit dans le cerveau comme un réseau de canaux paravasculaires (Denniston et Keane 2015). Les travaux d'Errera ont fait émerger cette hypothèse, une « bande paravasculaire » parallèle à la paroi externe des vaisseaux choroïdiens, épaissie chez les patients atteints de vasculites rétinienne, et présentant des « points blancs » supposés être des cellules immunitaires a été observée (Errera et al. 2014). Puis en 2016, Hu et al ont montré l'existence d'un réseau glymphatique autour des vaisseaux rétinien chez le rat, la souris, le primate non-humain et l'Homme grâce à l'utilisation du marqueur AQP4 (Sun et al. 2016; Wostyn et al. 2016).

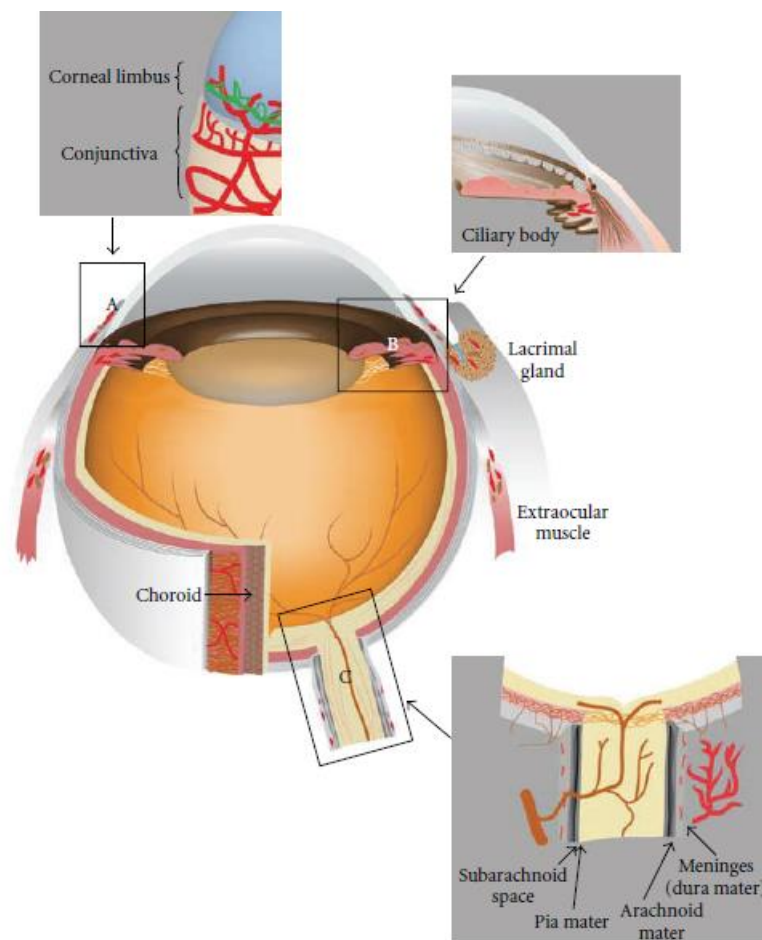


Figure 13 : Distribution des vaisseaux lymphatiques dans l'œil. Les vaisseaux lymphatiques sont représentés en rouge. (Nakao et al., 2012)

2.2.4. Les cellules immunitaires résidentes de l'œil

Il existe plusieurs types cellulaires rétiens qui ont une fonction dans la régulation de l'inflammation (et la tolérance) ainsi que dans la capture et la présentation des antigènes. Pour cela on distingue les cellules immunitaires résidentes dans l'œil tel que les CPA et les cellules non immunitaires mais à fonction régulatrices comme les Cellules de Müller, les RPE. Parmi les différents types de CPA présents dans l'œil on retrouve les CD, les macrophages et les microglies.

Les **macrophages** sont présents dans tous les tissus oculaires, de la cornée (à la surface de la chambre antérieure) jusqu'à l'uvée (chambre postérieure) (Figure 14). En situation non inflammatoire, la majorité des macrophages résident dans des endroits stratégiques, c'est à dire des zones susceptibles de subir une invasion microbienne ou une accumulation de débris cellulaires comme par exemple dans les muqueuses. Dans le contexte ophtalmologique, en fonction du microenvironnement et du tissu, les macrophages vont avoir des fonctions différentes comme la phagocytose, des propriétés cytotoxiques ou la régulation des réponses immunitaires en produisant de grande quantité de cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. La principale fonction des macrophages est la phagocytose, elle permet d'éliminer les corps nécrotiques, les corps apoptotiques et les débris cellulaires, et ainsi favoriser la résolution des RI et un retour à l'homéostasie (Chinnery, McMenamin, et Dando 2017).

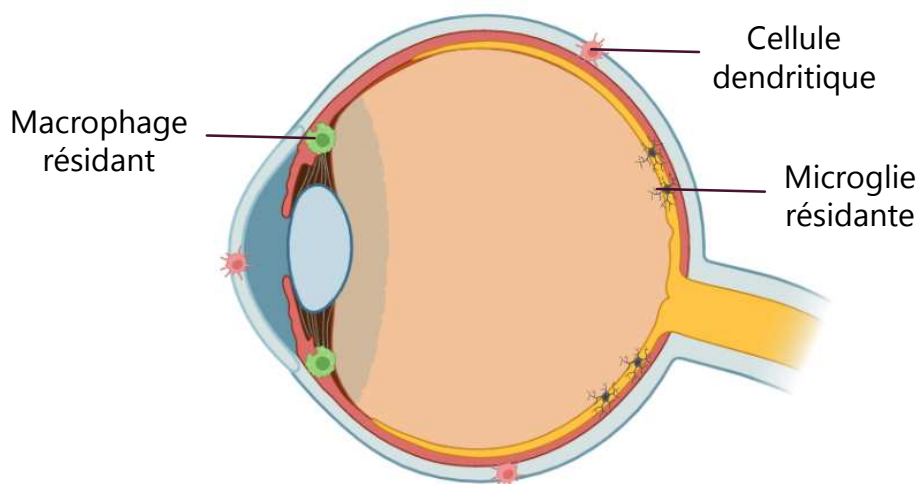


Figure 14 : Les cellules immunitaires résidentes de l'œil.

Dans la rétine on trouve seulement des **cellules microgliales**, elles ont un rôle important dans le développement et l'homéostasie de la rétine et la médiation des réactions neuro-inflammatoires locales. Les cellules gliales de la rétine peuvent être divisées en deux populations cellulaires que sont les macroglies (*i.e.* les cellules de Müller et les astrocytes) et les microglies. Les cellules microgliales résidentes sont considérées comme les chiens de garde immunologique du cerveau et de la rétine (Figure 14). Ce sont des capteurs actifs qui vont scanner leur environnement et répondre rapidement à diverses agressions. Les cellules microgliales activées vont subir une transformation morphologique et fonctionnelle en phagocytes réactifs. La microglie est une entité cellulaire distincte des neurones et des autres cellules gliales du SNC (Gomes 2019; Karlstetter, Ebert, et Langmann 2010; Kettenmann et al. 2011; Moore et Thanos 1996), c'est une population de macrophages tissulaires du système nerveux central. Elles vont pouvoir aider à maintenir l'intégrité rétinienne, l'homéostasie en condition non inflammatoire ou d'autre part, être à l'origine des réponses phagocytaires dirigées contre les cellules photoréceptrices nécrosées ou un élément étranger (Thanos 1992) et parfois avoir un rôle dans les pathologies rétinienne (Association microglie/macrophages choroïdiens envahissants contribue de manière significative à la para-inflammation chronique présente dans plusieurs pathologies rétinienne liées à l'âge (Xu, Chen, et Forrester 2009; Xu et al. 2007)).

Au début du développement, les cellules microgliales sont d'abord localisées dans la fibre nerveuse et la couche de cellules ganglionnaires (GCL), elles ont un rôle dans le développement de la rétine, (contrôle de l'apoptose développementale, phagocytose des débris cellulaires, génère des synapses, mise en forme des connexions neuronales et au guidage de la croissance des vaisseaux rétiens primaires (Bessis et al. 2007; Provis 2001; Schafer et al. 2012). A l'âge adulte, les microglies colonisent uniquement les couches plexiformes de la rétine, à savoir OPL et IPL, (Santos et al. 2008) et elles acquièrent une morphologie hautement ramifiée avec de petits corps cellulaires et de longues saillies cellulaires pouvant couvrir les couches nucléaires complètes (Figure 15). L'ensemble des microglies ramifiées forme un réseau territorial organisé, qui se déplace en permanence afin de scanner l'ensemble de la rétine en peu de temps (Damani et al. 2011). Les microglies détectent leur environnement grâce à un éventail de protéines de surface, mais aussi des récepteurs pour les cytokines, les chimiokines, les composants du complément, les anticorps et les modèles moléculaires associés aux dommages. Dans une rétine saine, les microglies, situées dans les couches pléxiformes, vont se trouver dans un état immature (inactive) grâce à des mécanismes inhibiteurs. Elles vont scanner leur

environnement en continu et phagocyter les débris cellulaires. Des événements tel que des fonctions cellulaires anormales, la dégénérescence du RPE ou PR ou GCL, ou la détection d'éléments étrangers vont alerter les microglies et les conduire en une phase d'activation. Ceci va avoir pour conséquence d'entraîner la migration des microglies sur le site d'inflammation et les transformer en cellules effectrices (c'est-à-dire les phagocytes amiboïdes).

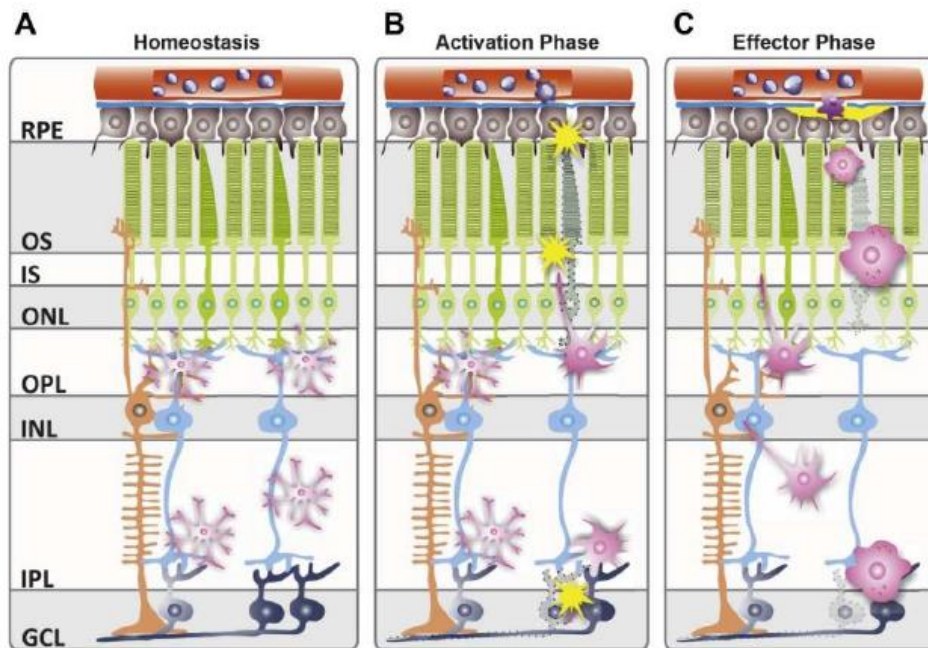


Figure 15 : Localisation et activation des cellules microgliales au sein de la rétine. En fonction de l'environnement immunologique de la rétine, les microglies (représentées en rose) vont s'activer, subir des modifications phénotypiques (apparitions de nombreuses ramifications), migrer sur les lieux de l'inflammation afin de devenir effectrices et induire des lésions (représentées en jaune). (Karlstetter *et al.*, 2015).

L'activation microgliale va être régulée par des interactions avec d'autres types cellulaires non immunitaires (mais à fonction régulatrices) tel que le RPE, les neurones rétiens et les cellules de Müller. Les cellules du RPE peuvent sécréter du TGF- β ce qui induit la sécrétion d'IL-10 par les cellules microgliales, et va inhiber l'expression des molécules CMH II, CD80 et CD86, impliquées dans la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes T (D'Orazio et Niederkorn 1998). De plus, il a été démontré que le TGF- β dans certain cas peut reprogrammer les microglies vers un phénotype anti-inflammatoire dans le SNC (Paglinawan *et al.* 2003). On peut supposer que ce mécanisme peut avoir lieu dans la rétine bien que cela n'ait pas été démontré. Les neurones rétiens (dont les photorécepteurs et cellules ganglionnaires) expriment et sécrètent de nombreuses molécules qui peuvent influencer l'état d'activation et le dynamisme des microglies, comme CD200 (Broderick *et al.* 2002; Hoek *et al.* 2000; S. Taylor

et al. 2011) ou CX3CL1(Liang et al. 2009). Enfin les cellules de Müller expriment de manière constitutive le DBI (Diazepam binding inhibitor), qui est un ligand de TSPO (*Translocator protein*) et est exprimé par les cellules microgliales activées, leur interaction va limiter l'activation des cellules microgliales (Figure 16 et Tableau 4).

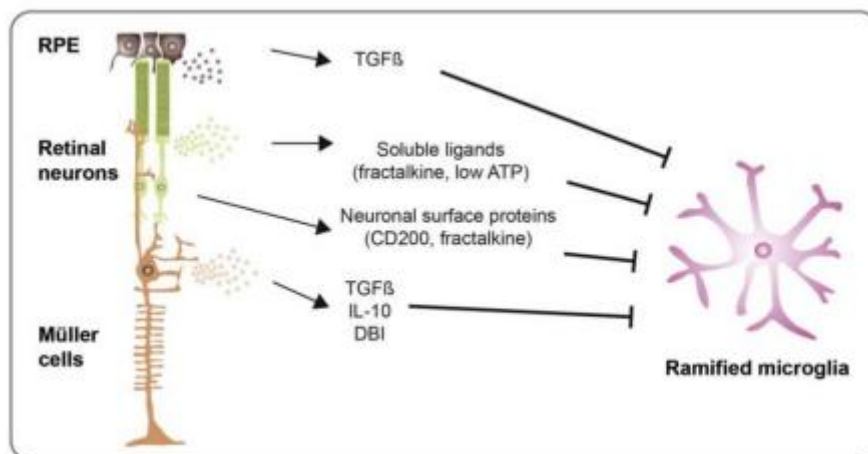


Figure 16 : Schéma représentant les interactions cellulaires entre la microglie et les différentes cellules rétiennes. (Karlstetter et al., 2015).

Tableau 4 : Marqueurs exprimés par les cellules microgliales en condition physiologique et pathologique. Les astérisques spécifient les molécules exprimées uniquement par les cellules microgliales activées (Li et al., 2015).

	Resting (ramified) microglia	Activated (amoeboid) microglia
Markers	<i>Griffonia Simplicifolia</i> isolectin (Isolectin B4)	<i>Griffonia Simplicifolia</i> isolectin (Isolectin B4)
	OX42	OX41*
		OX42
		ED1, ED2, ED3*
	F4/80	F4/80
	Mac-1	Mac-1
	Iba1	Iba1
		MHC II*
	MHC I	MHC I
	CD45	CD45
	CD68	CD68
	CD11a, CD11b, CD11c	CD11a, CD11b, CD11c
	CD18	CD18
		B7-1*
	B7-2	B7-2
	RMG-1	RMG-1
	RMG-2	
		LAMP-1*
Receptors	LN-1	LN-1
	OX6, OX3, OX18	OX6, OX3, OX18
	TLR1—TLR9	
	CCR1—CCR8	
	CXCR1/2/3	
	CX3CR1	
	Asialoglycoprotein-like lectin receptor	
	Vitronectin receptor	
	Phosphatidylserine receptor	
	Complement receptor	
	Purinergic receptors (P2X, P2Y)	

2.2.5. Le mécanisme *Anterior Chamber Associated Immune Deviation* (ACAID)

Dans les années 1940, le principe de privilège immunitaire oculaire a été défini par Medawar. Il a mis en évidence qu'un greffon de peau allogénique placé dans la chambre antérieure de l'œil pouvait survivre pendant des périodes prolongées, tandis que le même greffon placé sur un site corporel conventionnel faisait l'objet d'un rejet (Medawar, 1948). Grâce à cette découverte, il a déterminé que la chambre antérieure de l'œil était un site immunitaire privilégié. Billingham, a démontré que la cornée fonctionne aussi comme un tissu immunitaire privilégié (Barker et Billingham, 1977). Grâce au privilège immunitaire oculaire, l'œil possède (acquière) une protection immunitaire contre les réponses inflammatoires qui peuvent entraîner des distorsions de l'axe visuel voir la cécité dans les cas le plus graves (Streilein, 1987; Niederkorn, 1990; Forrester, 2009; Pleyer et Schlickeiser, 2009). Les mécanismes du privilège immunitaire oculaire reposent sur deux stratégies : l'induction d'une tolérance systémique pour les antigènes dérivés de l'œil, appelé (ACAID et un microenvironnement immunosuppresseur intraoculaire (Tso 1982)(Tso, 1982) (Taylor, 2016).

Lorsqu'un antigène est inoculé dans la chambre antérieure, la cavité vitréenne, il peut induire une immunosuppression systémique spécifique de l'antigène. La déviation immunitaire induite dans la chambre antérieure est appelée ACAID (Streilein 1995b; 1995a) et celle dans la cavité vitréenne, le VCAID. Ce mécanisme permet de « contrôler » la réponse immunitaire à l'antigène envahissant et minimiser les effets de la réponse immunitaire sur les différents tissus oculaires. La modulation de réponses immunitaires va se caractériser par la suppression spécifique de l'antigène grâce à la modulation croisée des réponses immunitaires classiques de type Th1 et Th2. Suite à de nombreuses études pour comprendre ce mécanisme, les différents acteurs ayant un rôle primordial ont pu être identifiés, tel que les macrophages oculaires F4/80+, différentes populations « lymphoïdes », la rate, le thymus (Y. Wang et al. 1997), et le système parasympathique.

Tout d'abord, en 2010, l'équipe de Cone et al a démontré que l'injection intraoculaire d'un antigène induit l'infiltration de cellules F4/80+ dans la chambre antérieure, au contact de l'environnement immunosuppresseur, les cellules acquièrent un phénotype pro-toléro-gène (Cone et al. 2010). Les CPA oculaires F4/80+ ont la particularité d'exprimer la molécule CD1d qui est semblable au CMHI et la molécule F4/80 qui est cruciale pour les interactions cellulaires dans la rate et le thymus. De plus, chez les souris F4/80 KO et les souris CD1d KO, l'induction

de l'ACAID est impossible. Après avoir quitté l'œil et une fois dans le système sanguin, les CPA F4/80+ peuvent se diriger soit dans le thymus soit dans la rate.

Au niveau thymique, les CPA F4/80+ induisent la génération de thymocytes CD4, CD8 NK1.1 qui une fois dans la circulation sanguine vont agir comme des émigrants thymiques récents et se rendre dans la rate, où ils contribuent à la génération de cellules suppressives spléniques et thymique. La thymectomie empêche l'induction de l'ACAID (Figure 17).

Au niveau splénique, dans la zone marginale, les CPA F4/80+ interagissent avec différentes populations cellulaires. La rate est essentielle pour l'induction de l'ACAID, car en cas de splénectomie elle n'a pas lieu (Streilein et Niederkorn 1981). Dans la rate, les CPA oculaires F4/80 expriment des molécules de CMH de classe I non classique, le CD1d, ce qui leur permet d'interagir avec les CD4 NKT mais aussi de produire de l'IL-10, de l'IL-13 et des protéines inflammatoires macrophagiques. Les CD4 NKT sécrètent la chimiokine RANTES, elle permet de recruter d'autres cellules nécessaires à la génération de cellules régulatrices de l'ACAID (peut entraîner la formation de grappes d'APC oculaires F4/80, de cellules NKT CD4 et de cellules T régulateurs CD4 et CD8). Toutefois, d'autres populations cellulaires sont nécessaires à l'induction de l'ACAID comme les cellules B, les cellules T et les cellules T CD8 (Figure 17).

Il a été démontré que les LB participaient à l'ACAID en agissant comme des APC auxiliaires. De plus le fait que l'induction de l'ACAID ne soit pas possible chez des souris KO au cellules B, démontre l'importance du rôle des LB. Les LB exprime une molécule non classique de classe Ib, le Qa-1, qui a un rôle dans la présentation des peptides antigéniques aux cellules T régulatrices. Les LB sont donc nécessaires à la génération de cellules T régulatrices CD8, qui suppriment les réponses immunitaires Th1. Finalement, les deux voies d'interaction des APC F4/80 au sein de la rate aboutissent à la génération de cellules régulatrices ou cellules suppressives afférentes CD4 et efférentes CD8 qui vont médier la réponse immunitaire en inhibant les réponses Th1 et Th2 (Kashiwakura et al. 2005) (Figure 17).

Les trois systèmes organes impliqués dans l'ACAID que sont l'œil, le thymus et la rate ont des connexions grâce à des innervations sympathiques denses. Il a été démontré que le système nerveux sympathique influence l'ACAID, puisque la sympathectomie chimique altère la génération de cellules CD4 NKT ce qui empêche la mise en place de l'ACAID.

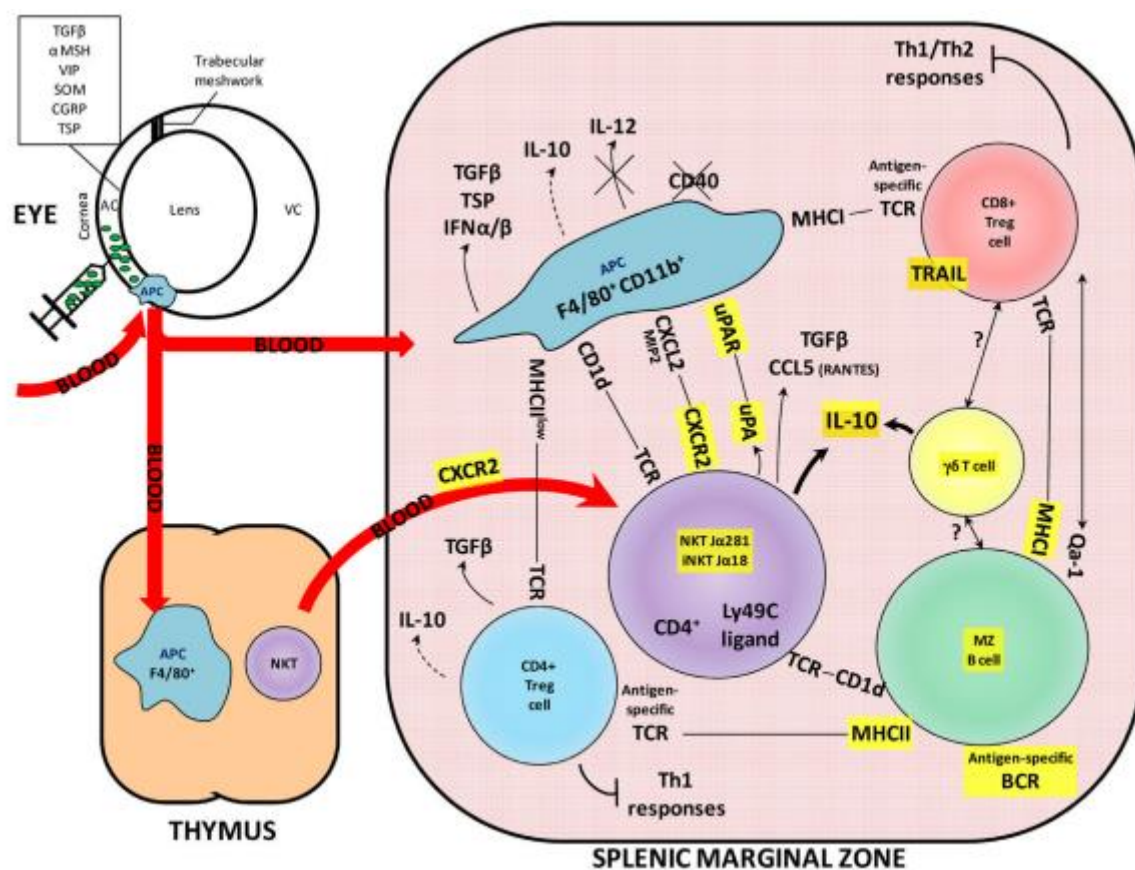


Figure 17 : Schéma représentatif du mécanisme de l'ACAID. (Vendôme, Khebbizi, et Fisson 2017a)

2.2.6. Mécanisme apparenté à l'ACAID : le *Sub-Retinal Associated Immune Inhibition* (SRAII)

Il est connu que la modulation périphérique d'une réponse immunitaire spécifique de l'antigène injecter dans la chambre antérieure est possible (ACAID), bien qu'il a été longtemps considéré que cette caractéristique était propre à cette organe des études ont montré qu'un mécanisme similaire avait lieux dans l'espace sous-rétinien.

La preuve de principe étant acceptée par tous, au sein du laboratoire, nous avons cherché à caractériser le profil cytokinique et les capacités prolifératives des cellules T propre au mécanisme du SRAII. L'injection sous-rétinienne de peptides induit une inhibition de la prolifération des cellules T spécifique de l'antigène et une inhibition globale des cytokines pro-inflammatoires, plus spécifiquement des profils Th1/Tc1, Th2/Tc2, et Th17/Tc17. Ces résultats vont dans le sens de Nakamura et al. en 2005 puisqu'ils ont montré que le mécanisme d'ACAID ne provoque pas de déviation du profil Th1 vers un profil Th2, mais au contraire il inhibe le profil Th1/Tc2 (Nakamura, Terajewicz, et Stein-Streilein 2005). Il s'agit donc d'un schéma

classique d'inhibition des cellules T spécifiques de l'antigène. De plus, nos résultats ont montré que l'inhibition des cellules T induites par l'injection de peptides est plus forte au jour 14 qu'au jour 28, ce qui tend à se questionner sur le caractère transitoire du mécanisme. C'est pourquoi des études de caractérisations cinétiques sont nécessaires.

Le SRAII est un mécanisme intéressant car son pouvoir d'inhibition pourrait être utilisé comprendre ou moduler les réponses immunitaires dans différentes approches thérapeutiques. Le statut immunoprivilégié de l'œil (dont les propriétés immunomodulatrice de l'ACAID et du SRAII) et la présence de CPA tolérogènes semble être utiles pour le développement d'une large gamme de traitement dans le contexte de pathologies inflammatoires dans l'œil (et la modulation des réponses immunitaires associées).

2.3. L'œil : lieu de réponse inflammatoire

L'œil est un organe où une dualité immunologique prend place, en effet bien que ce soit un site immunoprivilégié, il peut aussi être le siège de réactions inflammatoires comme par exemple les uvéites, les œdèmes maculaires et les tumeurs.

L'uvéite est une inflammation intraoculaire pouvant toucher la rétine et/ou l'uvée (qui correspond à la couche vasculaire pigmentée du globe oculaire : choroïde, corps ciliaires et iris) et affecter de façon dramatique la vision. Si elle n'est pas traitée, l'uvéite peut être à l'origine d'un déficit visuel pouvant aller jusqu'à la cécité. Les uvéites infectieuses peuvent être d'origine virale, telle que l'uvéite associée à la famille « *Herpesviridae* », bactérienne ou parasitaire. Les uvéites non-infectieuses sont généralement considérées comme étant d'origine auto-immune (Caspi 2011; *Uvéite - Bahram Bodaghi, Phuc Lehoang* 2017). Les uvéites d'origine virale ont un profil de réponse immunitaire de type Th1. Les cellules de phénotype Th1 sécrètent de TNF α et du IFN γ , qui sont des molécules connues pour être responsables d'une réaction inflammatoire à médiation cellulaire. L'initiation de l'inflammation de la rétine implique des lymphocytes T spécifiques de l'agent infectieux et les mécanismes sont amplifiés par le recrutement de cellules inflammatoires non spécifiques. Elles sont aussi responsables des lésions tissulaires rétinienne (Nieder Korn 2007; *Uvéite - Bahram Bodaghi, Phuc Lehoang* 2017).

L'œdème maculaire est défini par la présence de kystes et un épaissement maculaire dont la cause est une rupture de la barrière hémato-rétinienne (BHR) et la conséquence une baisse d'acuité visuelle. Fine et Brucker, puis Yanoff et al. Suggèrent que l'OM serait d'origine intracellulaire. Le gonflement cytoplasmique progressif des cellules de Müller, conduirait à la

nécrose et à une dégénérescence neuronale. A la mort des cellules neuronales, le liquide cytoplasmique va se déverser dans l'espace extracellulaire et s'accumuler dans le tissu intrarétinien, et former des kystes dans la rétine (composé de cellules bipolaires et de cellules de Müller compactées). En fonction de l'étiologie de l'OM, les kystes sont localisés dans des couches différentes de la rétine. Par exemple pour l'œdème maculaire du pseudophaque, les kystes sont plutôt localisés dans les couches internes de la rétine alors que dans l'œdème maculaire diabétique, ils sont localisés dans les couches externes de la rétine (Tso 1982).

Enfin l'œil peut être le siège de réponses inflammatoires notamment par le développement de lymphomes primaires du système nerveux central (LPSNC), dont les lymphomes oculaires et cérébraux, il s'agit de tumeur maligne rare et précisément de lymphomes non hodgkiniens à grandes cellules B. Le manque de connaissances moléculaires et biologiques à propos des LPSNC et l'état général des patients, empêchent la compréhension de la maladie, le pronostic et la prise en charge dans les essais prospectifs des patients mais aussi limite l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Cependant le développement de modèle murin ayant un LPSNC, a permis de mieux comprendre le microenvironnement tumoral ainsi que la mise en place des réponses innées et adaptatives anti-tumorales et d'appréhender ce qui se passe chez les patients atteints de LPSNC.

3. Réponses immunitaires associées à la thérapie génique oculaire

3.1. Réponses immunitaires associées à la thérapie génique médiée par AAV

3.1.1. Réponses immunitaires innées et inflammation

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre les infections virales. Les agents pathogènes viraux vont être détectés par des récepteurs invariants, les PRR, grâce à la présence de motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) présents sur les virions ou les acides nucléiques viraux ou des motifs moléculaires associés à des dommages endogènes (DAMP) (Rogers et al. 2015).

En fonction de leur localisation, les PRR sont classés en deux grandes classes : (i) les récepteurs liés à la membrane (i.e. les TLR) et les récepteurs intracellulaires (i.e. ALR, NLR). En fonction de l'homologie des domaines protéiques, on distingue plusieurs familles de PRR : les TLRs (capteurs d'ADN), les NLRs (récepteurs de type NOD pour *nucleotide-binding and ligomerization domain-like*), les CLR (récepteurs de *lectine de type C*), les ALRs (récepteurs de type AIM2 pour *absent in melanoma 2-like*) et les RLRs (récepteurs de type RIG-I pour

retinoic acid-inducible gene I-like) (Figure 18). La détection et la reconnaissance des vecteurs AAV sont médiées par les TLR. Ceci va permettre de déclencher une cascade de signalisation intracellulaire qui entraîne l'activation de la réponse immunitaire innée et stimuler les réponses immunitaires adaptatives. Le vecteur rAAV induit une réponse immunitaire innée relativement faible, mais celle-ci reste détectable (A.-K. Zaiss et al. 2002) ce qui représente un obstacle important à la fois pour l'expression à long terme du transgène et la ré-administration d'un traitement utilisant un vecteur viral tel que les AAV.

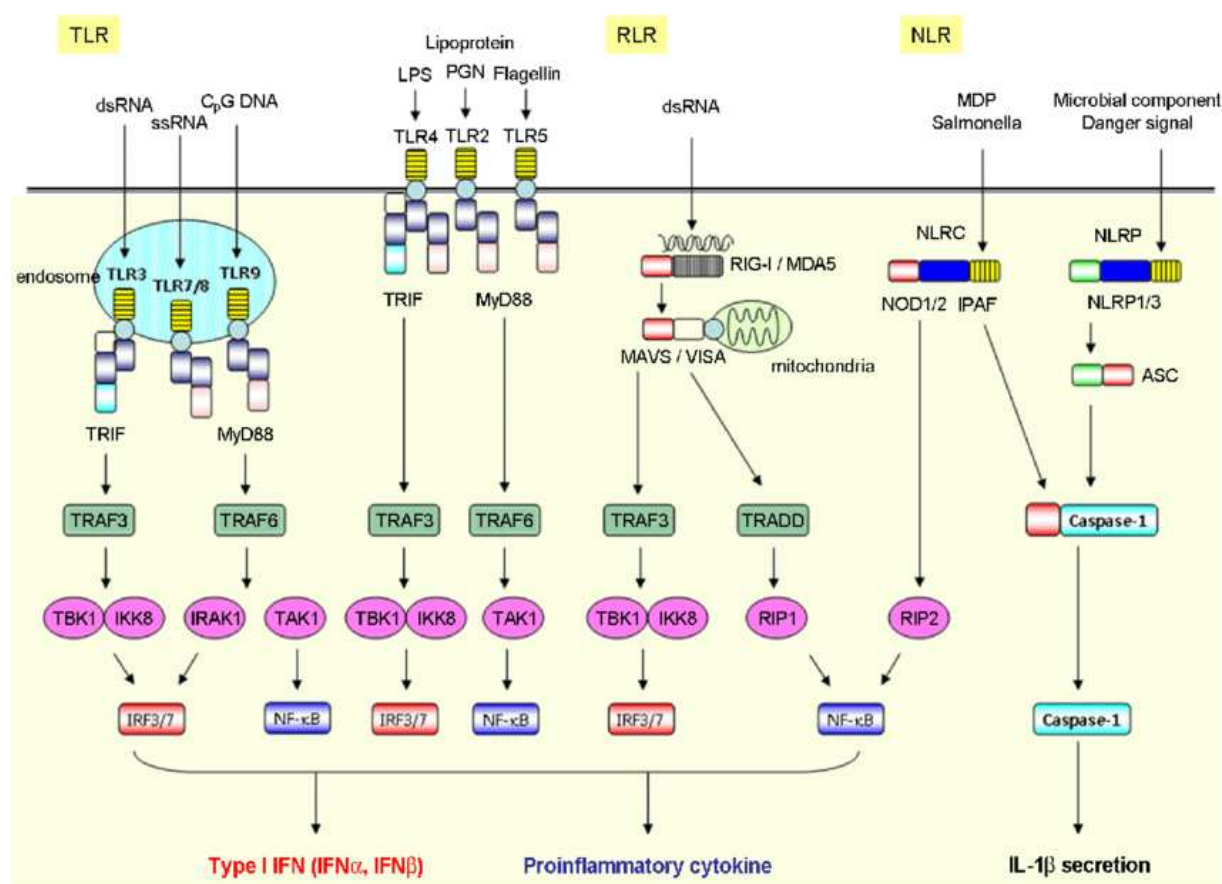


Figure 18 : Voies de signalisation des récepteurs de reconnaissance de forme (PRR). Il existe trois classes de familles de PRR, telles que les TLR, les RLR et les NLR, ils détectent les produits microbiens ou les signaux de danger endogènes pour déclencher des voies de signalisation, entraînent la production d'IFN de type I, de cytokines pro-inflammatoires et l'activation de la caspase-1 (Hong, Park, et Yu 2011).

Les récepteurs *Toll* (TLR) sont une famille de récepteurs invariants, ils sont dit « à reconnaissance de forme » et présents chez les vertébrés et les invertébrés. A ce jour, 13 TLR ont été identifiés chez l'homme et la souris. Le TLR est un récepteur protéique transmembranaire à passage unique, caractérisé par un domaine transmembranaire, un domaine intracellulaire *Toll*/IL-1R (TIR), et un domaine extracellulaire en lien avec le PAMP. Les TLR1,

2, 4, 5, 6 et 10 se trouvent sur la membrane plasmique et reconnaissent les glycoprotéines tandis que les TLR3, 7, 8 et 9 se trouvent sur la membrane endosomale et reconnaissent les acides nucléiques (Yuk et Jo 2011). Les TLR sont principalement présents dans les cellules immunitaires, telles que les cellules dendritiques (CD), les macrophages et certains lymphocytes T et B, mais également dans des cellules non immunitaires, telles que les fibroblastes et les cellules épithéliales. L'ensemble des TLR (excepté le TLR3) signalent par l'intermédiaire de MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), une cascade de réaction qui conduit à la phosphorylation et à la dégradation de l'inhibiteur de NF- κ B et/ou les facteurs de régulation de l'interféron (IRF) (Kawai et Akira 2007). Une fois l'inhibition sur NF- κ B levée, il va se transloquer dans le noyau pour activer la transcription gènes pro-inflammatoires tels que NLRP3, AIM2 et entraîner la production d'IL-1 et d'IL-18 pro-inflammatoires et la mort de la cellule.

Dans le cadre de la thérapie génique par AAV, l'introduction d'AAV dans l'organisme va principalement entraîner l'activation des TLR9 et TLR2 (Figure 19). Le **TLR9**, qui est présent sur les membranes endosomales va reconnaître un motif CpG (cytosine-phosphate-guanine), dans une séquence d'ADN viral spécifique non méthylée, Au cours du trafic endosomal des AAV, le déballage des virions et/ou l'exposition partielle du génome vont entraîner la détection des motifs CpG par TLR9. L'équipe de Zhu et al. ont démontré que la reconnaissance de l'AAV2 par les CD plasmacytoïdes de la souris et de l'homme était médiée par TLR9, dépendait de la signalisation MyD88 et était indépendante de la forme du transgène ou du sérotype de la capside (Zhu, Huang, et Yang 2009). Initialement il est accepté que les **TLR2** reconnaissent les lipoprotéines et les peptidoglycanes présentés à la membrane plasmique, mais récemment, des études ont mis en évidence leur rôle dans la détection des pathogènes viraux (détection des composants structurels de la capside virale) et l'activation de NF- κ B. L'étude d'Hösel et al., a démontré que les cellules primaires hépatiques humaines peuvent développer une réponse immunitaire innée contre la capside de l'AAV2 et de l'AAV8 in vitro via TLR2.

Le recrutement de cellules immunitaires qui vont être sensibles aux signaux de danger et la libération de DAMPs qui vont être détectés comme des signaux de danger constitue deux mécanismes complémentaires de détection propice au déclenchement de l'inflammation. L'inflammation par les AAV ne va pas forcément conduire à la mise en place de tous les signaux classiques d'une inflammation clinique (i.e. signes cardinaux décrits dans le 2.1.) mais seulement certains comme par exemple la sécrétion d'IL-1, de facteur pro-inflammatoire et la mise en place d'un inflammasome.

Les inflammasomes, sont des régulateurs moléculaires essentiels dans l'inflammation, et sont constitués du NLRP3, d'une protéine adaptatrice ASC (apoptosis speck-like protein) et d'une protéine pro-caspase-1 (apoptosis speck-like protein). Une grande variété de facteurs va activer l'inflammasome via le NLRP3 et induire une signalisation complexe de réaction dont l'activation de la pro-caspase-1 qui elle-même induit la sécrétion de cytokines telles que l'IL-1 β et l'IL-18 et entraîne l'inflammation décrite dans la figure suivante (Guo, Callaway, et Ting 2015) (Figure 20). De plus, il est établi que l'inflammasome joue aussi un rôle dans la pathogenèse de maladies oculaires (i.e. le glaucome, la DMLA, la rétinopathie diabétique et les infections oculaires).

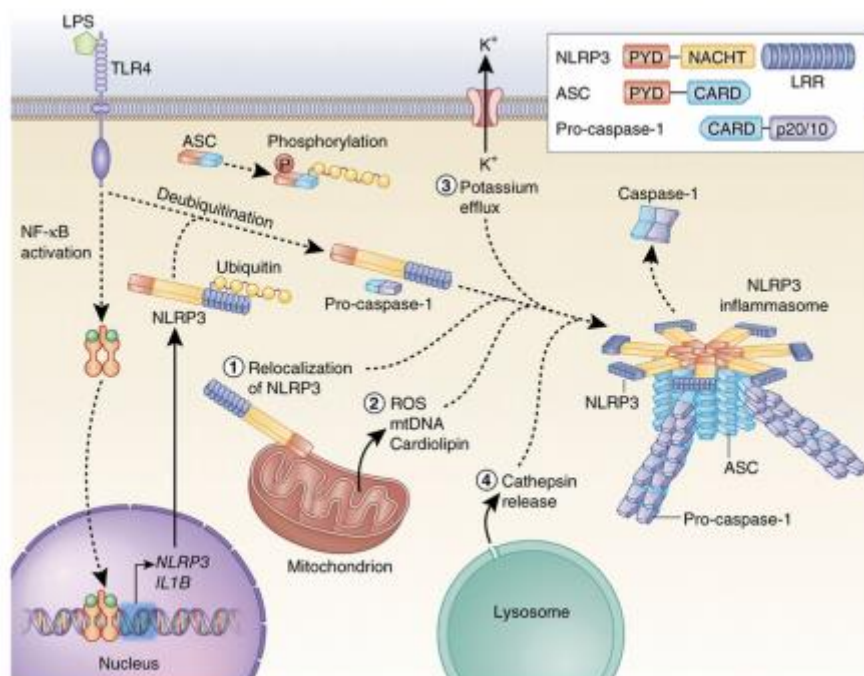


Figure 20 : Mécanismes d'activation de l'inflammasome via NLRP3. (Guo et al., 2015)

Les stratégies pour empêcher la signalisation des TLR sont par exemple l'appauvrissement des dinucléotides CpG dans le génome viral améliore l'expression du transgène et réduit l'infiltration des cellules T CD8⁺ (Wu et al. 2014). Cependant la suppression de certaines séquences CpG n'est pas toujours possible. Ensuite l'incorporation de séquences inhibitrices de TLR9 (TLR9i), comme l'incorporation du motif TTAGGG, dans le vecteur permet de réduire les réponses immunitaires associées au rAAV chez les souris et les porcs. Enfin l'activation de NF-κB grâce aux TLR2 peut être évitée en utilisant des inhibiteurs de NF-κB. Les modifications apportées au vecteur comme le tropisme et la capside peuvent aussi aider à réduire la dose de vecteur et l'exposition aux signaux de danger.

La réponse innée permet la production de cytokines pro-inflammatoires en grande quantité et d'initier la réponse immunitaire innée. En effet, les cytokines pro-inflammatoires permettent de faciliter le recrutement, l'activation et l'expansion des cellules immunitaires adaptatives anti-transgène et/ou anti-capside. Dans les sections suivantes, nous détaillerons comment le rAAV peut être à l'origine de l'activation et du développement des cellules immunitaires adaptatives ainsi que les stratégies mises en place pour moduler ces réponses spécifiques du rAAV (Guo, Callaway, et Ting 2015; Lamkanfi et Dixit 2014).

3.1.2. Réponses immunitaires adaptatives dirigées contre la capside

Étant donné que les rAAV conservent les caractéristiques du virion, ils peuvent déclencher les réponses immunitaires adaptatives de l'hôte contre la capside du rAAV et/ou le produit du transgène (Basner-Tschakarjan et Mingozzi 2014; Brantly et al. 2009; Mingozzi et al. 2009). Ces réponses prennent en compte les anticorps neutralisants préexistants (NAbs) et l'amorçage et l'expansion des cellules immunitaires spécifiques de l'antigène préexistant T et B.

3.1.2.1. Immunité préexistante

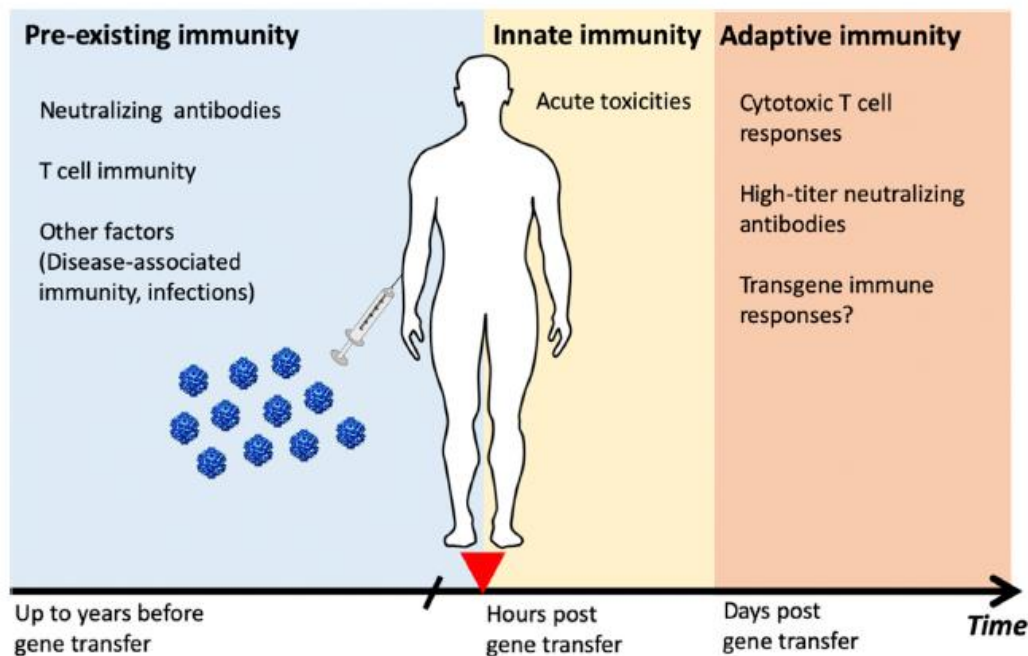


Figure 21 : Ensemble des réponses immunitaires de l'hôte contre les vecteurs AAV. Avant l'administration du vecteur, les humains sont exposés naturellement à l'AAV sauvage et peuvent développer une immunité humorale et médiée par les lymphocytes T contre le vecteur. L'exposition à l'AAV sauvage avant le transfert de gènes détermine le contexte immunologique global du patient. Immédiatement après l'administration du vecteur, ce dernier peut déclencher une reconnaissance immunitaire innée. Plus tard après l'administration du vecteur, des anticorps anti-capside sont produits et persistent pendant plusieurs années après le transfert de gènes. L'activation des cellules T anti-capside et anti-transgène a également été documentée dans plusieurs essais. Dans certains cas, elle est en corrélation directe avec la perte d'expression du transgène. Ces réponses immunitaires constituent un risque pour les patients traités et en cas de ré-administration du traitement (Verdera, Kuranda, et Mingozi 2020).

Du fait que les rAAV, sont des dérivés d'AAV sauvage, une préoccupation principale est l'induction d'une réponse immunitaire adaptative pré-existante anti-capside. En effet d'après plusieurs études publiées, bien que la séroprévalence varie selon les régions géographiques, plus de 90 % de la population mondiale a été infectée par l'AAV « sauvage » (Figure 21). En raison de la large réactivité croisée entre les sérotypes d'AAV, les anticorps neutralisants (NAb) reconnaissent pratiquement tous les sérotypes (60% pour l'AAV2). Ensuite la prévalence des anticorps totaux est de 70 % de la population pour l'AAV1 et l'AAV2, de 45 % pour l'AAV6 et l'AAV9, et de 38 % pour l'AAV8.

Les **NAb** vont entraîner une réduction de la transduction du vecteur, ce phénomène a été mis en évidence dans un essai de transfert de gène hépatique (AAV2-F.IX) (L. Wang et al. 2005; Rogers et al. 2014). Deux individus de la cohorte présentant des titres de NAb élevés, et ayant

reçu une dose élevée de vecteur, avaient des taux de F.IX circulants extrêmement faibles. C'est pourquoi, à l'heure actuelle, la prévalence sérologique positive des patients est un facteur d'exclusion pour les essais cliniques utilisant de la thérapie par AAV. En plus d'entraîner un manque d'efficacité thérapeutique, la présence d'anticorps dirigé contre la capside peut également entraîner l'activation du complément (Muhuri et al. 2021) .

Le système du complément comprend une trentaine de protéines solubles ou membranaires et est essentiel au système immunitaire inné. De nombreux composants essentiels à l'activation du complément sont présents sous forme de précurseurs inactifs et subissent une cascade d'événements de clivage protéolytique et d'étapes d'activation. Selon le contexte pathogène, la cascade du système du complément converge au niveau de la protéine du complément C3 et conduit à la formation du complexe d'attaque de la membrane (MAC), la lyse cellulaire et aussi à l'opsonisation des agents pathogènes et leur élimination par phagocytose. Ce mécanisme va aussi permettre d'établir un lien entre l'immunité innée et adaptative.

La communauté scientifique s'est aussi intéressé à l'immunité cellulaire préexistante contre l'AAV ainsi que son impact potentiel sur les thérapies à base d'AAV. Grâce à des tests fonctionnels tel que l'ELISpot et la cytométrie en flux, la prévalence des cellules T dirigées contre AAV1 et AAV2 dans la population pu être a été étudiée. Les études s'accordent sur le fait que les réponses cellulaires anti-capside sont moins fréquentes ou moins détectables que les réponses humorales anti-capside.

3.1.2.2. Induction de réponses immunitaires adaptatives anti-capside

Il existe peu de documentation sur les types de cellules qui participent à l'élaboration d'une réponse immunitaire innée anti-capside cependant il est établi que les CPA jouent un rôle essentiel dans le développement de la réponse adaptative. Grâce au TLR et à la signalisation intrinsèque de MyD88, les CPA vont être à l'origine d'une réponse innée mais aussi une réponse adaptative humorale anti-capside. Différentes études ont montré que la production d'anticorps IgG2 anti-capside AAV ne dépend de la signalisation intrinsèque de MyD88 dans les cellules B. Or l'injection d'AAV conduit aussi à la production d'anticorps IgG1 et IgM. Ces derniers sont générés indépendamment de l'activation de MyD88, ce qui indique une cinétique différentielle et fait appel à une réponse cellulaire. En effet, il est établi que pour qu'une réponse immunitaire humorale robuste se mette en place, l'activation des cellules T est essentielle. Plusieurs études témoignent du rôle essentiel des CPA (dont les macrophages) dans le

déclenchement des réponses lymphocytaires T. Par exemple, l'administration intraveineuse d'AAV induisait une expression transitoire de TNF- α , de RX et de RXP. (régule l'activation, des LT et leur sécrétion), IP-10, MIP-1 β , MCP- 1, et MIP-2 dépendantes des cellules de Kupffer, les macrophages résidents du foie (Figure 22).

Principalement les peptides de la capsid vont être chargés sur le CMH de classe II et présentés aux cellules T CD4+ par les CPA. La reconnaissance des épitopes dérivés de la capsid liée au CMH de classe II à la surface des APC active les cellules T *helper* CD4+, et facilite les réponses immunitaires humores et à médiation cellulaire. Lors de cette réponse adaptative, après l'activation des lymphocytes T et B, les lymphocytes se développent et se différencient en cellules effectrices afin d'assurer la médiation de l'infection et l'élimination des antigènes par l'induction réponse humorale ou cytotoxique. Puis une fois l'antigène éliminé, on observe une phase de contraction et la génération de lymphocytes T et B à mémoire, qui seront réactivés lors d'une réexposition à l'antigène. L'établissement de la mémoire immunologique va favoriser l'immunotoxicité (Figure 22).

Enfin il a été démontré que les cellules transduites et les CPA professionnels présentaient des épitopes immunogènes dérivés de la capsid aux cellules T CD8+ cytotoxiques par l'intermédiaire du CMH de classe I. Les T CD8+ sont responsables de la clairance des cellules transduites par l'AAV, ce qui provoque une inflammation dans l'organe cible et peut réduire la durée et l'efficacité du transfert de gènes. La présentation de la capsid par le CMH de classe I est une conséquence de la présentation antigénique croisée aux cellules T CD8+ à partir de la présentation de l'antigène par les APC. La participation des CPA professionnels est essentielle tout comme les pDC et les cDC qui coopèrent pour reconnaître le génome viral par l'intermédiaire d'un système d'identification des virus (via un TLR). Le protéasome. (voie cytosolique) permet également la présentation antigénique croisée aux cellules T CD8+ (Figure 22).

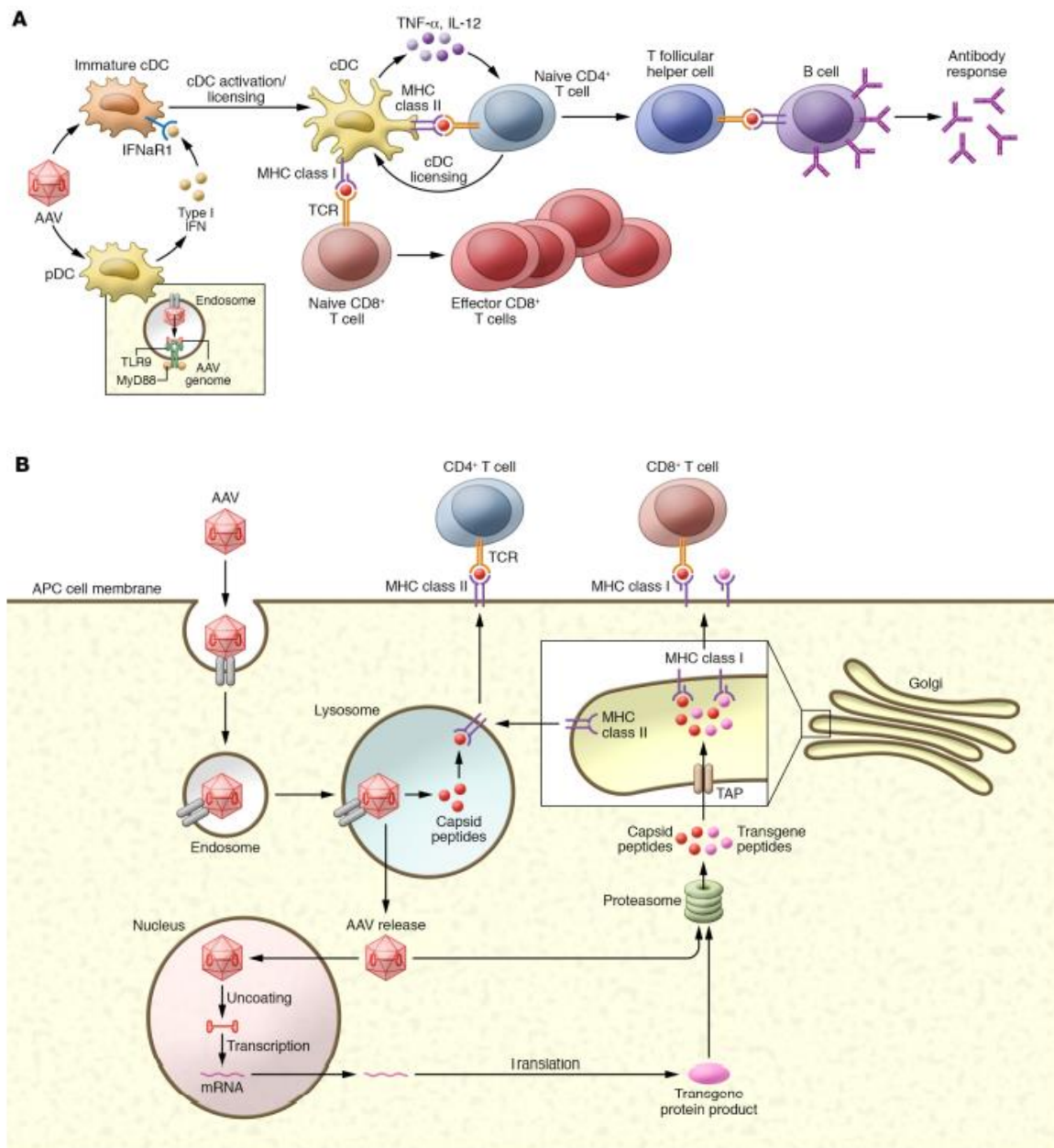


Figure 22 : Le rôle des réponses immunitaires médiées par les APC envers les vecteurs AAV. (A) Mécanisme d'activation des cellules dendritiques (DC) par le rAAV. La détection du génome de l'AAV par TLR9 dans les endosomes des DC déclenche l'activation de la voie de signalisation TLR9/MyD88, qui aboutit à la production d'IFN de type I, directement transmis aux DC immatures. Cet événement de signalisation est essentiel pour un amorçage efficace, l'activation et la transformation des DC immatures en DC matures. Les DC activées interagissent avec les cellules T CD4⁺ et les T CD8⁺ spécifiques de la capside du rAAV. Les cellules Th CD4⁺ activées favorisent également la formation d'anticorps contre la capside du rAAV. (B) Mécanisme de présentation de l'antigène spécifique du rAAV par les CPA. Les virions d'AAV vont entrer dans les cellules par endocytose, les peptides de la capsides rAAV sont chargés sur des molécules du CMH de classe II pour être présentés aux lymphocytes T CD4⁺ et ainsi être éliminés. Des virions peuvent entrer dans le noyau et profiter de la machinerie cellulaire pour que le génome soit transcrit et la traduit pour générer des protéines transgéniques. Les protéines transgéniques peuvent être ubiquitylées et dégradées dans le protéasome en petits peptides chargés sur la molécule du CMH de classe I. Les cellules seront reconnues par les lymphocytes T CD8⁺ pour être éliminées. (Muhuri *et al.*, 2021)

Une multitude de stratégies visant à éviter l'action des anticorps préexistants sont mises en place comme la modification de la biologie de l'AAV (i.e. modifications génétiques de la capside) pour empêcher leur reconnaissance par les NAb, l'ajout de capsides vides pour saturer les anticorps préexistants. D'autres approches non génétiques existent comme l'utilisation d'agents pharmacologiques, tels que le *rituximab* et la rapamycine, qui vont empêcher les LB de produire des NAb. L'aphérèse plasmatique (diminuer les titres sanguins de NAb) et l'enrobage de la surface de l'AAV par des lipides ou des vésicules extracellulaires pour couvrir les épitopes de l'AAV sont d'autres stratégies. Enfin une autre stratégie est l'utilisation d'IdES qui sont des protéases non spécifiques qui vont cliver les IgG circulantes (Leborgne et al. 2020).

Enfin d'autres pistes visent à limiter les réponses immunitaires adaptatives anti-capside, en utilisant par exemple des promoteurs spécifiques à un type de cellule ou des promoteurs naturels ou synthétiques et le détraquage médié par les miARN ont été largement explorés.

3.1.3. Réponses immunitaires adaptatives dirigées contre le produit du transgène

Les particules de rAAV qui échappent à la neutralisation des NAb, interagissent avec des récepteurs et des corécepteurs à la surface des cellules pour initier leur accrochage cellulaire, leur absorption et leur trafic intracellulaire à travers le réseau endosomal. L'échappement endosomal du rAAV permet à l'ADN recombinant d'être délivré au noyau, où généralement il persiste de manière épisomique. L'ADN recombinant va pouvoir profiter de la machinerie cellulaire pour être transcrit et traduit en produits protéiques thérapeutiques (ou produit du transgène). Les antigènes des produits transgéniques exprimés de manière endogène peuvent être dégradés par le protéasome, traités dans le réticulum endoplasmique et être présentés par le CMH I. Les réponses immunitaires induites par le rAAV et le produit du transgène vont conduire à la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et d'IFN de type I, qui recrutent des cellules immunitaires, telles que des neutrophiles, des macrophages et des cellules dendritiques. Ces réponses pourront aboutir à la stimulation de réponses immunitaires adaptatives humores et cellulaires contre les capsides du rAAV et les produits transgéniques codés (Figure 22). Ainsi les cellules cibles transduites et exprimant le transgène pourront être dégradées par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques et conduire à une perte d'expression du transgène, une perte d'efficacité et une immunogénicité caractérisée par une inflammation locale et systémique. La temporalité entre les réponses anti-capside et anti-produit du transgène est donc différente à cause du temps d'expression du transgène et son appréhension, elle se met place

2 à 3 jours après l'injection du vecteur. Cependant cette réponse cytotoxique anti-produit du transgène prend place plus tardivement mais dure plus longtemps dans la durée ce qui la rend plus dangereuse. La prise en charge thérapeutique ne sera donc pas la même (Ronzitti, Gross, et Mingozzi 2020; Mingozzi et High 2013; Rabinowitz, Chan, et Samulski 2019; Nidetz et al. 2020).

3.2. Réponses immunitaires associées à la thérapie génique oculaire

3.2.1. Réponses immunitaires associées à la thérapie génique oculaire dans les études précliniques

Les premières études précliniques chez les rongeurs et d'autres espèces n'ont pas révélé que l'immunité contre le vecteur ou le transgène constituerait un obstacle important à l'expression durable des gènes. Bien que des réponses immunitaires anti-AAV dans les études précliniques aient été détectées, la communauté scientifique pensait qu'elles seraient trop faibles et transitoires pour avoir un impact négatif sur la transduction durable. De plus la question de l'immunité préexistante est un point à ne pas négliger. La nécessité d'obtenir de meilleurs modèles animaux pour évaluer et surmonter ces réactions est importante. Cependant il faut garder à l'esprit que les modèles animaux qui ont présentés des complications immunitaires ont fourni des informations précieuses pour évaluer la dose et le type de vecteur, la différence entre les sérotypes, et la voie d'administration du vecteur. En effet ces facteurs peuvent avoir un impact sur l'immunité. (Martino et Markusic 2020; Tse, Moller-Tank, et Asokan 2015; Ramachandran et al. 2016a; Chandler et al. 2021).

3.2.2. Réponses immunitaires associées à la thérapie génique oculaire dans les essais cliniques

Actuellement, au total 31 essais cliniques de thérapies géniques oculaires pour des dégénérescences rétiniennes, dont 18 qui sont actuellement en cours, sont basés sur l'injection de vecteurs dérivés de virus adéno-associés (rAAV) en zone sous-rétinienne. Les essais pour lesquels les résultats ont été publiés rapportent une amélioration de la vision chez la majorité des patients, avec un effet plus marqué pour les patients ayant reçus les plus fortes doses de vecteur.

Néanmoins, des patients de plusieurs essais cliniques (NCT00481546, NCT00643747) ont développé une perte secondaire de la vue dans les 6 à 12 mois après le traitement (Bainbridge et al. 2015a; Jacobson et al. 2015a; Weleber et al. 2016a). Les hypothèses qui pourraient

expliquer cette perte secondaire de la vision sont que, **(i)** la dégénérescence rétinienne est génétiquement programmée et n'est pas contrecarrée par l'expression du transgène ; **(ii)** il y a une perte de l'expression du transgène sur le long terme, c'est-à-dire que les vecteurs n'ont pas suffisamment délivrés de transgène dans les cellules cibles ou bien qu'il y a une régulation négative de l'expression du transgène; Enfin l'hypothèse retenue et pouvant expliquer cette perte secondaire de la vision serait l'induction d'une réponse immunitaire infra-clinique envers le vecteur et/ou le transgène qui causerait la perte des cellules transduites (Photorécepteurs ou RPE). En effet les cellules transduites seraient éliminées à cause d'une réaction anti-capside et/ou anti-transgène (Jacobson et al. 2015a; Herzog 2017). La première chose à faire pour démontrer cette hypothèse est de prouver qu'il y a bien une réponse immunitaire subséquente à l'injection intraoculaire du vecteur. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux données d'immuno-motoring des essais cliniques de thérapie génique oculaire (Tableau 5).

En effet, nous avons recensé parmi l'ensemble de tous les essais cliniques de thérapie génique oculaire, que douze présentent des données d'immuno-monitoring (Tableau 5). Parmi ces douze essais cliniques tous sauf un (NCT01267422) présentent des conséquences immunologiques comme des inflammations oculaires et/ou des réponses anti-capside et pour certains les réponses anti-transgène. On peut observer que 16% des patients présentent des inflammations oculaires, qui ont pu être résolues après l'administration d'un traitement immunosuppresseur local. De plus, des réponses anti-capside et anti-transgène ont été mise en évidence chez les patients et cela malgré l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur et quelle que soit la pathologie. En effet, l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur local, systémique ou une combinaison des deux, avant et/ou après l'injection intraoculaire de vecteur de thérapie génique, ne permet pas d'endiguer l'ensemble des réponses immunitaires déclenchées. Ensuite lorsqu'aucun traitement immunosuppresseur n'est appliqué aux patients avant et après l'opération, notamment dans l'essai NCT02064569 (LHON, utilisation du rAAV2/2-ND4), 13 patients sur 15 ont déclenché une inflammation oculaire. Ce qui nous amène à nous questionner sur l'utilisation préventive des traitements immuno-modulateurs chez les patients traités. En effet, les traitements immuno-modulateurs ont des effets secondaires au niveau local, directement sur l'œil, comme une augmentation du risque de cataracte et une augmentation de la pression intraoculaire (IOP) mais aussi une augmentation du risque de cancer et une susceptibilité accrue aux infections. Le risque de développement d'effets secondaires et la persistance de réponses inflammatoires malgré l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur

nous a amené à évaluer dans un modèle murin si le transfert de gène par rAAV conduit au développement de réponses immunitaires cellulaires anti-transgène spécifique au niveau local et systémique, mais aussi de développer une stratégie immuno-modulatrice pour pouvoir les contrôler. Il est possible d'inhiber des réponses anti-transgène périphériques en utilisant un mécanisme de déviation immunitaire appelé ACAID (*Anterior Chamber-Associated Immune Deviation*) (Vendomèle et al. 2018a)). La co-injection d'un rAAV codant pour HY avec les peptides HY inhibe la réponse lymphocytaire anti-HY.

Tableau 5 : Données d'immuno-monitoring dans les essais de thérapie génique oculaire médiés par AAV. AMD : Dégénérescence maculaire liée à l'âge ; CMH : Choroïdérémie ; LCA : Amaurose congénitale de Leber ; LHON : Neuropathie optique de Leber ; ND : Non déterminé

Pathology	Clinical trial number	Immuno-monitoring						References
		Ocular inflammation	Anti-capsid		Humoral	Anti-transgene		
			Cellular			Cellular	Humoral	
			ELISpot	Proliferation				
LCA	NCT00643747	3/12	0/12	ND	3/12	ND	0/12	(Bainbridge et al., 2008); (Bainbridge et al., 2015)
LCA	NCT00481546	0/14	1/14	2/14	ND	ND	ND	(Hauswirth et al., 2008) ; (Cideciyan et al., 2009) ; (Jacobson et al., 2012)
LCA	NCT00516477	0/12	0/12	ND	7/10	1/12	1/12	(Maguire et al., 2008) ; (Maguire et al., 2009) ; (Simonelli et al., 2010) ; (Melillo et al., 2012)
LCA	NCT01208389 (re-administration of NCT00516477)	1/11	2/11	ND	2/11	2/11	1/11	(Bennett et al., 2012a) ; (Bennett et al., 2016)
LCA	NCT01496040	3/9 (subclinical by LFM)	1/9	ND	3/9	1/9	ND	(Le Meur et al., 2017)
AMD	NCT01024998	1/19	ND*	ND	ND	ND	ND	(Heier et al., 2017) Personal communication
AMD	NCT01494805 (Phase 1)	0/6	2/6	ND	1/6	ND	ND	(Rakoczy et al., 2015) ; (Constable et al., 2017)
AMD	NCT01494805 (Phase 2a)	2/21	0/21	ND	9 seronegative before -> 3/9 seropositive after	ND	ND	(Constable et al., 2016)
LHON	NCT01267422	0/9	ND	ND	0/9	ND	ND	(Yang et al., 2016a) ; (Wan et al., 2016)
LHON	NCT02161380	0/5	ND	ND	1/5	ND	ND	(Feuer et al., 2016)
LHON	NCT02064569	13/15	ND	ND	ND	ND	ND	(Vignat et al., 2018) (Vignat et al., 2016)
CHM	NCT01461213	0/6	2/6	ND	ND	2/6	ND	(MacLaren et al., 2014)

3.3. Stratégie d'immuno-modulation associée à la thérapie génique oculaire

Comme mentionné précédemment, chez les modèles animaux et les humains, on note que l'administration de thérapie génique médié par rAAV induit des réponses immunitaires innées et adaptatives dirigée contre la capsid du vecteur mais aussi contre le produit du transgène. Ces réponses inflammatoires transitoires peuvent être délétères pour l'efficacité thérapeutique du traitement mais aussi pour le patient, en effet son état de santé peut en pâtir. C'est pourquoi de nombreuses stratégies d'immuno-modulation ou d'immuno-suppression sont envisagées afin d'inhiber ou de limiter les réponses immunitaires dans les essais cliniques après l'administration du rAAV. Ces stratégies visent à inhiber ou limiter les réponses induites après thérapie génique par AAV, envers la capsid et le produit du transgène. On peut classer ces stratégies en deux catégories, la stratégie dites « non spécifique » et les stratégies qui cherchent à induire une modulation spécifique de la réponse immunitaire.

3.3.1. Utilisation d'immunosuppresseurs non spécifiques

A l'heure actuelle, dans les essais cliniques de thérapie génique seuls les immunosuppresseurs tels que la prednisolone ou la cyclosporine sont utilisés. Ils permettent une inhibition générale des réponses immunitaires cellulaires. Les désavantages de ces immunosuppresseurs sont qu'ils ne sont pas spécifiques et les effets indésirables associés à l'inhibition générale du système immunitaire, tels qu'une susceptibilité accrue aux cancers et aux infections. De plus, en bloquant les réponses immunitaires de façon générale, ces molécules peuvent potentiellement inhiber l'induction de réponses tolérogènes.

Dans le contexte de thérapie génique oculaire, il est important de noter que la majorité des patients dans les essais cliniques ont reçu des immunosuppresseurs. En effet malgré le statut immuno-privilegié de l'œil, les investigateurs préfèrent jouer la carte de la sûreté en administrant des traitements immunosuppresseurs en préventif et après l'administration du traitement par rAAV afin de prévenir au maximum toute réponse délétère.

Cependant, les traitements immunosuppresseurs utilisés sont très variables d'un essai clinique à l'autre comme en témoigne le Tableau 6. Le type de molécule administrée, la voie d'administration (systémique, locale ou une combinaison des deux), la posologie et la durée du traitement (pré et post-injection intraoculaire) sont des facteurs variables. Par exemple certains utilisent un traitement systémique basé sur de la prednisolone par voie orale (NCT00643747, 00516477, 01208389, 01461213, 01267422), mais à des posologies et durées différentes. Le

traitement oral, peut être initié 2 à 7 jours avant l'injection, puis maintenu entre 7 jours à 2 mois après injection en fonction des essais mais aussi des patients et de leur état. D'autre part, certains utilisent un traitement local en sous-conjonctival ou en topique (instillations) de molécules immunosuppressives, seules (NCT00481546, 01024998, 01494805) ou en combinaison avec un traitement systémique (NCT00643747, NCT01496040), la posologie est variable (de 3 jours à 1 mois post-injection, avec 1 à 3 instillations par jour). Un seul essai, pour la NOHL, mené par John Guy, ne rapporte pas l'utilisation de traitement immunosuppresseur en préventif et post-injection. Quel que soit la stratégie d'immuno-modulation utilisée, elle va impacter les réponses immunitaires décrites dans les essais. Il apparaît donc nécessaire de garder à l'esprit que les résultats publiés sont sous le contrôle d'immunosuppresseurs. Au vu de la pluralité des stratégies d'immunosuppression, il semble que le suivi immunologique des patients dans les essais cliniques soit complexe à analyser car il n'est non homogène et incomplet. Il n'est pas homogène au vu de la pluralité des stratégies immuno-modulatrices utilisées mais aussi dû à la nature de la maladie des patients et l'intégrité de la structure rétinienne (les atteintes rétinienne sont différentes et à des degrés variables). Le suivi immunologique des patients est incomplet car seuls les yeux et le sang sont utilisés pour effectuer des test d'immuno-monitorage. En effet aucun organe immunitaire ne peut être testé (i.e. rate, thymus ou ganglions cervicaux) car éthiquement il est inconcevable de faire des biopsies pour analyser les réponses immunitaires.

Tableau 6 : Traitement immunosuppresseur des patients dans les essais cliniques de thérapie génique oculaire.
AMD : Dégénérescence maculaire liée à l'âge ; CMH : Choroïdérémie ; LCA : Amaurose congénitale de Leber ; LHON : Neuropathie optique de Leber ; ND : Non déterminé.

Pathology	Clinical trial number	Immunosuppressive treatment					References
		Local			Oral		
		Molecule	Posology		Molecule	Posology	
Administration	Timing (days)						
LCA	NCT00643747	Betamethasone	subconjunctival	Day of injection	Prednisolone	1 week before injection (0.5mg/kg/day) + 2 months post-injection	(Bainbridge et al., 2008) (Bainbridge et al., 2015)
		Dexamethasone	topical	28 days post-injection			
LCA	NCT00481546	Steroids	subconjunctival + topical	Day of injection + 20 days post-injection	-	-	(Hauswirth et al., 2008) (Cideciyan et al., 2009) (Jacobson et al., 2012)
LCA	NCT00516477	-	-	-	Prednisolone	3 days before injection (1mg/kg/day) + 7 days post-injection (starting at 0.5mg/kg/day and progressively decreasing)	(Maguire et al., 2008) ; (Maguire et al., 2009) ; (Simonelli et al., 2010) (Melillo et al., 2012)
LCA	NCT01208389 (re-administration of NCT00516477)	-	-	-	Prednisolone	3 days before injection (1mg/kg/day) + 7 days post-injection (starting at 0.5mg/kg/day and progressively decreasing)	(Bennett et al., 2012a) ; (Bennett et al., 2016)
LCA	NCT01496040	Dexamethasone-tobramycin	topical	3 times / day during 1 month post-injection	Prednisolone	1 week before injection (0.5mg/kg/day) + 1 month post-injection (starting at 1mg/kg/day and progressively decreasing)	(Le Meur et al., 2017)
AMD	NCT01024998	Corticosteroids	topical	In 1 patient with intraocular inflammation	-	-	(Heier et al., 2017) Personal communication
AMD	NCT01494805 (Phase 1)	Prednisolone	topical	4 times/day during 3 days post-injection	-	-	(Rakoczy et al., 2015) ; (Constable et al., 2017)
AMD	NCT01494805 (Phase 2a)	Prednisolone	topical	4 times/day during 3 days post-injection	-	-	(Constable et al., 2016)
LHON	NCT01267422	-	-	-	Prednisolone	1 week before injection (0.5mg/kg/day) + 2 months post-injection (starting at 1mg/kg/day and progressively decreasing)	(Yang et al., 2016a) ; (Wan et al., 2016)
LHON	NCT02161380	-	-	-	-	-	(Feuer et al., 2016)
LHON	NCT02064569	Fluorometholone Dexamethasone	topical	Adapted for each patient	Prednisone	Adapted for each patient	(Vignal et al., 2018) (Vignal et al., 2016)
CHM	NCT01461213	-	-	-	Prednisolone	2 days before injection (1mg/kg/day) + 10 days post-injection	(MacLaren et al., 2014)

Toutefois le suivi immunologique des patients dans les essais clinique reste essentiel et il semble que l'idée de Barnard *et al* de mettre en place des protocoles de tests standardisés soit irrémédiable.

3.3.2. Nouvelles approches d'immunosuppression spécifique d'antigène

Des approches d'immuno-modulation telles que l'utilisation de Treg induisant un effet *by stander* (Gross et al. 2006) et ou l'utilisation de Treg spécifique comme dans le cas d'uvéites (Grégoire et al. 2016) pourrait être envisagé pour moduler l'inflammation subséquente aux thérapies oculaires. L'idéal serait de mettre en place une immuno-modulation antigène spécifique. Pour cela nous cherchons à utiliser le système de l'ACAID pour immuno-moduler les réponses immunitaires spécifiquement.

OBJECTIFS

D'un point de vue immunitaire, l'œil est largement considéré comme un site immuno-privilégié, dans lequel les réponses immunitaires sont fortement inhibées et contrôlées ce qui fait de lui une cible idéale pour la thérapie génique. En effet, les résultats de thérapie génique oculaire pour le traitement des dystrophies rétinienne sont approuvés. Néanmoins, certains patients traités ont présenté des effets néfastes tels que des inflammations oculaires malgré la prise d'un traitement immunosuppresseur non spécifique mais aussi une perte secondaire de la vue. Cette perte secondaire de la vue pourrait être la conséquence d'une inflammation, suite à une réponse immunitaire contre le produit du transgène et/ou la capside. En effet les patients *null*, n'expriment pas la molécule thérapeutique délivrée et exprimée par les cellules cibles, ce qui fait d'elle un néo-antigène, assimilé à une molécule du « non-soi » elle peut engendrer une réponse immunitaire spécifique. De plus l'utilisation d'immunosuppresseurs non spécifiques peut induire des effets secondaires tels qu'une augmentation de la susceptibilité aux infections, une augmentation du risque de cancers, une augmentation de la pression intraoculaire (et une compression du nerf optique) et un risque accru de cataracte. Dans ce contexte, il apparaît nécessaire de se questionner quant aux conséquences immunitaires de l'injection de rAAV, et plus précisément caractériser les mécanismes inflammatoires infra-cliniques subséquents à une injection sous-rétinienne de rAAV en condition physiologique ou pathologique. Mais aussi de développer et d'évaluer le bénéfice anti-inflammatoire d'une stratégie immuno-modulatrice locale spécifique.

L'objectif principal de cette thèse est de caractériser les réponses lymphocytaires T induites par l'injection sous-rétinienne d'AAV et de les moduler par co-injection de peptides du produit du transgène, dans deux modèles murins.

Plus précisément, ce travail vise à :

- (1) Caractériser les réponses immunitaires périphériques induites envers le produit du transgène et la capside après injection sous-rétinienne de vecteur AAV dans les modèles murins C57BL/6J ou rd10 (Figure 23A).
- (2) Tester et caractériser une stratégie d'immuno-modulation des réponses immunitaires en exploitant le potentiel immuno-modulateur de peptides injectés en sous-rétinien dans les modèles murins C57BL/6J ou rd10 (Figure 23B).

Les objectifs complémentaires au cours de ma thèse ont aussi d'investiguer les réponses lymphocytaires T cytotoxiques anti-transgène et la réponses cellulaire T anti-capside.

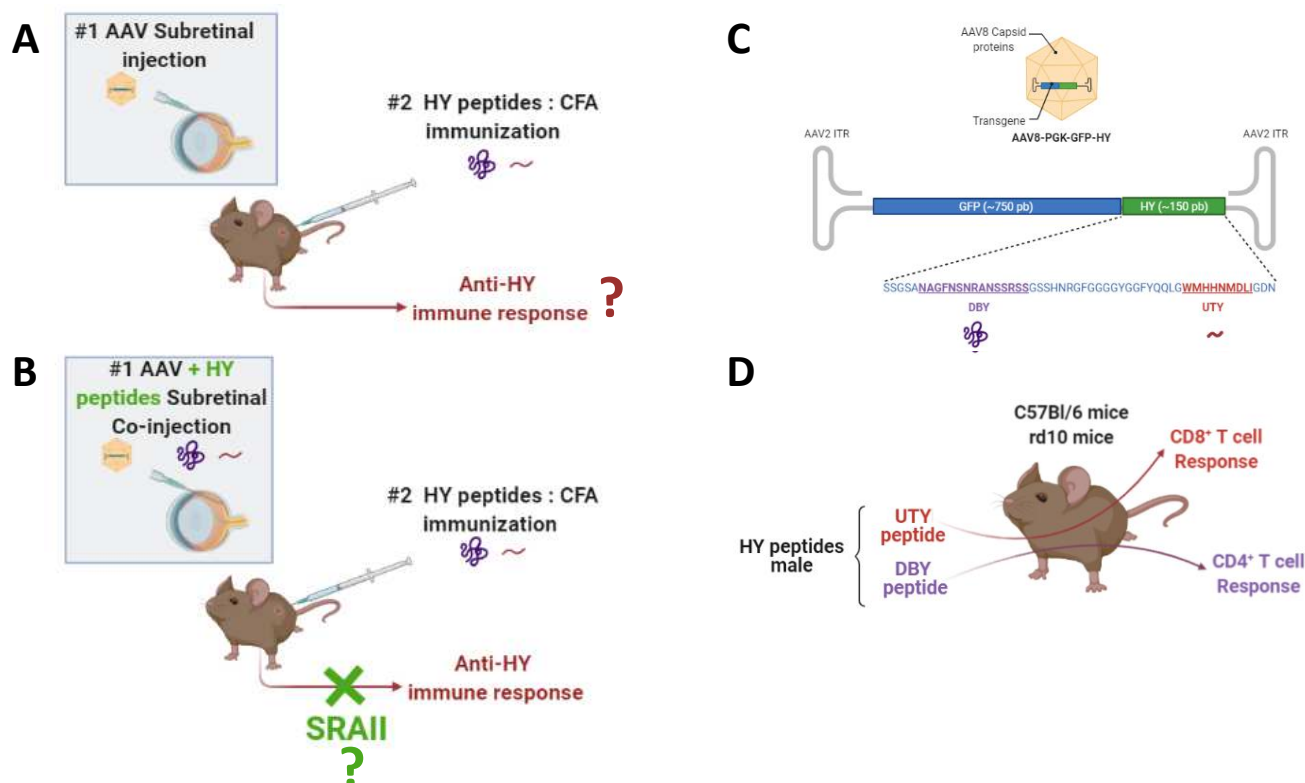


Figure 23 : Objectifs et modèles utilisés. (A) Caractérisation des réponses lymphocytaires T après transfert de gène intraoculaire. (B) Test et caractérisation d'une stratégie d'immun-modulation des réponses immunitaires après un transfert de gène. (C) Vecteur AAV2/8-PGK-GFP-HY utilisé codant les peptides HY fusionné à la protéine rapportrice GFP. (D) Détail du modèle antigénique utilisé (peptides UTY + DBY).

Au laboratoire, un modèle murin basé sur l'antigène HY a été développé et utilisé dans des contextes d'induction de tolérance en thérapie génique systémique (Gross et al. 2006). HY est un antigène mâle, immunogène chez les souris C57BL/6 femelles (H-2b) et rd10 femelles (H-2b). Plus précisément, les épitopes UTY et DBY, respectivement restreints aux CMH de classe I et II, induisent des réponses T CD8+ et CD4+ chez les souris femelles. Les souris femelles immunocompétentes (C57BL/6J ou rd10) reçoivent une injection sous-rétinienne d'un vecteur rAAV2/8-GFP-HY permettant l'expression d'un transgène (antigène mâle HY), et de molécules rapporteuses (i.e. GFP, Luciferase), le tout sous la coupe d'un promoteur ubiquitaire PGK (PhosphoGlycérate Kinase). Une co-injection de molécules immuno-modulatrices a été testée afin d'évaluer l'impact bénéfique sur la persistance à moyen-long terme des réponses anti-

transgène et anti-capside. Les réponses immunitaires sont analysées sur la rate et les ganglions par différentes techniques, comme l'ELISpot IFN γ , les analyses de productions cytokiniques multiplexées (CBA), sont utilisés afin de caractériser les modulations immunologiques (inflammatoires ou immunosuppressives) subséquentes à l'injection intraoculaire du vecteur viral. Les conséquences immunitaires au niveau local sont étudiées en effectuant des colorations Hématoxyline Eosine (HE) et des immunomarquages sur des coupes d'yeux de souris ayant reçu différentes doses de vecteurs.

RESULTATS

Depuis 2007, la thérapie génique par AAV est testée en clinique pour restaurer la vision de patients atteints de dystrophies rétinienne d'origine génétique ou liée à l'âge. Ces AAV, sont des complexes multiprotéiques contenant de l'ADN simple brin codant pour des protéines du *non-soi*, injectés dans la zone sous-rétinienne pour cibler les cellules du RPE et les photorécepteurs. Les résultats de thérapie génique oculaire ont été approuvés malgré la détection de faibles réponses immunitaires transitoires contre la capsid ou le produit du transgène. Toutefois, certains patients traités ont présenté des effets néfastes tels que des inflammations oculaires malgré la prise d'un traitement immunosuppresseur non spécifique ainsi qu'une perte secondaire de la vue chez certains patients. L'une des hypothèses proposées est l'induction d'une réponse inflammatoire infra-clinique dirigée contre le produit du transgène et/ou la capsid, qui induirait la destruction des cellules corrigées (exprimant le transgène) et induirait la perte secondaire de la vision observée chez les patients. Ensuite, les propriétés immunosuppressives de l'œil et la mise en place d'un mécanisme d'inhibition périphérique nommé ACAID (*Anterior Chamber-Associated Immune Deviation*) font de lui un site « immuno-privilegié ». A l'heure actuelle, de nombreuses approches thérapeutiques ciblant la zone sous- rétinienne sont en cours, cependant la capacité immuno-modulatrice périphérique de la zone sous-rétinienne (équivalent de l'ACAID) est actuellement peu explorée. C'est pourquoi l'étude présentée ci-après* a pour but de (1) caractériser les réponses immunitaires périphériques induites envers le produit du transgène après injection sous-rétinienne d'AAV. Pour cela, à J0, des souris C57BL/6 femelles ont reçu différentes doses de vecteur AAV2/8 codant pour les peptides UTY et DBY, en fusion avec une molécule rapportrice, soit la protéine fluorescente GFP, soit la Luc2, permettant un suivi par bioluminescence. Elles ont été immunisées à J14 avec ces mêmes peptides injectés en sous-cutané. A J2, J7, J14 et J21, la réponse immunitaire systémique est analysée par ELISpot IFN γ et l'expression du transgène a

été suivie de manière longitudinale par bioluminescence. Puis (2) de tester et caractériser une stratégie d'immuno-modulation des réponses immunitaires en exploitant le potentiel immuno-modulateur de peptides injectés en sous-rétinien dans les modèles murins C57BL/6J ou rd10. Pour cela, à J0, des souris C57BL/6 et rd10 femelles ont reçu différentes doses de vecteur AAV2/8-PGK-GFP-HY (codant pour les peptides UTY et DBY) co-injecté avec les peptides UTY et DBY. Elles ont été immunisées à J14 avec ces mêmes peptides injectés en sous-cutané. A J21, la réponse immunitaire systémique est analysée par ELISpot IFN γ et l'expression du transgène a été suivie de manière longitudinale par bioluminescence.

Anti-Transgene Cellular Immune Responses are Induced Dose-Dependently by Subretinal Gene Transfer with AAV8 and can be Modulated by the Subretinal Associated Immune Inhibition Mechanism

Gaëlle Anne Chauveau^{1,2,3}, Julie Vendomèle^{1,2}, Deniz Dalkara³, Anne Galy^{1,2}, Sylvain Fisson^{1,2,3*}

¹Université Paris-Saclay, Univ Evry, Inserm, Genethon, Integrare research unit UMR_S951, 91000, Evry-Courcouronnes, France.

²Genethon, 91000, Evry-Courcouronnes, France

³Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, F-75012 Paris, France

*Corresponding author: Sylvain Fisson. 1 bis rue de l'Internationale, Evry F-91002, France.

Phone: +33 662 089 334. Fax: +33 160 778 698. E-mail: sylvain.fisson@univ-evry.fr

GAC and JV contributed equally to this work.

Short title: Subretinal AAV dose-dependent T-cell response and SRAII

Article type: Original article

Title (max 120 characters): 162

Short title (max 50 characters): 49

Abstract word count (max 200 words): 205

Number of tables: 0

Number of figures: 6

Number of references: 43

Keywords: adeno-associated virus (AAV), eye, gene transfer, immune response, T-cells, subretinal-associated immune inhibition (SRAII), anterior chamber-associated immune deviation (ACAID)

Abstract

For more than a decade, AAV-mediated gene transfer has been tested successfully in clinical trials to treat several inherited retinal diseases. Despite the eye's immune-privileged status, some patients display inflammatory events requiring the use of corticoids as an adjunct treatment and led us to question the immune consequences of a subretinal injection of AAV vector. We aimed to characterize anti-transgene immune responses induced in the periphery after a subretinal AAV injection. Different doses of AAV8 encoding reporter proteins fused with the HY male antigen were injected into the subretinal space of C57BL/6 and rd10 female mice. Transgene expression was monitored over time with bioluminescence imaging and T-cell immune responses in the spleen were analyzed by IFN γ ELISpot and cytokine multiplex assays. Our data show that the subretinal injection of doses of AAV8 from 2.10^9 vg can induce a proinflammatory T-cell immune response against the transgene product, correlated with the transgene expression level. Moreover, co-injection of AAV8 with immunodominant peptides of the transgene product modulates the immune response whatever the AAV doses tested. Taken together, our data suggest that injection of AAV8 in the subretinal space induces proinflammatory peripheral T-cell responses to the transgene that can be modulated by the subretinal associated immune inhibition (SRAII) mechanism.

Introduction

In 1996, Ali *et al.* opened a new path toward adeno-associated virus (AAV)-mediated gene transfer in the retina by showing that photoreceptors and retinal pigment epithelium cells can be efficiently transduced by an AAV2 vector (Ali *et al.*, 1996). During the following decade, several studies sought to characterize the tropism of several AAV serotypes in the retina (Allocca *et al.*, 2007; Auricchio *et al.*, 2001; Leberherz *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2003). Preclinical studies that were performed with AAV in non-human primates (Jacobson *et al.*, 2006a; Maclachlan *et al.*, 2011; Ramachandran *et al.*, 2016; Vandenberghe *et al.*, 2013) and dogs (Acland *et al.*, 2001, 2005; Jacobson *et al.*, 2006b; Le Meur *et al.*, 2007; Petit *et al.*, 2012) aimed at treating monogenic retinal dystrophies such as Leber's congenital amaurosis (LCA). In 2007, the first clinical trials for the correction of LCA by AAV-mediated ocular gene transfer began, led by Samuel Jacobson (NCT00481546), Robin Ali (NCT00643747) and Albert Maguire (NCT00516477). These three trials were soon followed by several others, for LCA (Timothy Stout NCT00749957, Michel Weber NCT01496040) and for other diseases such as choroideremia (NCT01461213) and age-related macular degeneration (NCT01024998, NCT01494805). Preliminary results published soon afterwards reported the safety of AAV vectors, along with vision improvement in some patients (Bainbridge *et al.*, 2015; Hauswirth *et al.*, 2008; Le Meur *et al.*, 2017; Maguire *et al.*, 2009). On the long term, however, some patients have experienced ocular inflammation events and secondary loss of vision in the treated eye (Bainbridge *et al.*, 2015; Jacobson *et al.*, 2015). What can explain this phenomenon? Several complementary hypotheses may be suggested. One is the ongoing degenerative process, which could lead to the programmed death of degenerating cells, despite the partial rescue of their function (Cideciyan *et al.*, 2013). Another might be the induction of gene expression or post-transcriptional regulatory mechanisms, as described for Duchenne muscular dystrophy (Dupont

et al., 2015). The third hypothesis involves the induction of immune responses to the transduced cells expressing the transgene product, a non-self protein imported by the AAV vector. The well-known immune privilege of the eye appears to have resulted in a failure to fully consider the role of immune response. Indeed, several properties of the eye limit and tightly control the induction of proinflammatory immune responses. Locally, physical barriers, such as the tight junctions that constitute the blood-retinal barrier, limit exchanges with the rest of the organism (Rizzolo et al., 2011). Moreover, the secretion of a large panel of anti-inflammatory molecules such as TGF- β (Stein-Streilein, 2013; Taylor et al., 1997) tends to inhibit immune responses. Lastly, immunomodulatory mechanisms can induce an antigen-specific immune deviation in the periphery after its introduction into the eye; that is, injection of antigen into the anterior chamber or subretinal space induces respectively anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) (Stein-Streilein and Streilein, 2002; Vandomèle et al., 2017) or subretinal-associated immune inhibition (SRAII) (Vandomèle et al., 2018). Nonetheless, the eye is not hermetic to inflammatory processes. In several of its compartments, viruses and bacteria can induce inflammation such as endophthalmitis and uveitis (Chan et al., 2017; Kurniawan et al., 2017). Clinical trials of AAV-mediated ocular gene therapy seem to induce low levels of adaptive immune response, although ophthalmologic examinations have revealed transient and sometimes subclinical inflammation in several patients during the first few days (NCT00643747, NCT01494805). For obvious ethical reasons, immune monitoring has been performed only on blood samples, since in-depth investigation of the immunological mechanisms involved in these innovative approaches has not been possible.

In the present study we aimed to characterize peripheral anti-transgene T-cell immune responses induced by the subretinal injection of an AAV8 vector. As a model, we used the HY male antigen, and more specifically its UTY and DBY peptides, restricted respectively to MHC-

I or MHC-II in the female H-2^b murine background. These HY peptides can thus stimulate CD8⁺ and CD4⁺ T-cells in wild type C57BL/6 and pathophysiological rd10 mice. Rd10 mice carry a mutation of the rod-phosphodiesterase gene, leading to a rod degeneration and later cones degeneration mimicking the autosomal recessive human retinitis pigmentosa (Chang et al., 2002). In this study, we show that the injection of AAV8 in the subretinal space induces subclinical peripheral proinflammatory T-cell immune responses to the transgene, correlated with the transgene expression level in the eye and the periphery. Co-injection of immunodominant peptides from the transgene whatever the dose of AAV8 inhibits the T-cell immune responses to the transgene product in both physiological (C57BL/6) and pathophysiological (rd10) murine models.

Results

Dose-dependent anti-transgene proinflammatory T-cell immune response is induced by a subretinal AAV8 injection.

To evaluate the possibility that subretinal injection of AAV8 induces anti-transgene cellular immune responses, wild-type female mice were subretinally injected at different timepoints with PBS or different doses of AAV8 encoding for GFP fused with HY sequence (AAV-GFP-HY). The transgene encoding the HY male antigen was packaged into AAV8 under the ubiquitous PGK promoter. This HY antigen contains the immuno-dominant UTY and DBY peptides (HY peptides) in H-2^b female mice, that are MHC class I- and MHC class II-restricted T-cell epitopes, respectively. Two, 7 and 14 days after the subretinal injection of AAV-GFP-HY ($5 \cdot 10^{10}$ vg) or PBS as negative control, spleen cells were harvested and stimulated *in vitro* with HY peptides for ELISpot quantification of spot forming units (SFU) IFN γ secretion by HY-specific T-cells (Figure 1A). No significant IFN γ secretion was detected in PBS groups (<40 SFU/ 10^6 cells) at the different time points. A time-dependent increase of IFN γ secretion was noticed starting from day 7 in mice receiving AAV (215 and 412 SFU/ 10^6 cells at day 7 and day 14, respectively). Dose-response experiments were analyzed at day 21 following an initial subretinal injection of AAV-GFP-HY (10^3 to $5 \cdot 10^{10}$ vg) or PBS as negative control, and subcutaneous immunization with PBS or HY peptides at day 14 as previously reported (Vendôme et al., 2018). (Figure 1B). As a positive control for anti-HY immune response, mice received PBS in the subretinal space on day 0 and HY peptides subcutaneously on day 14. In this case, 150 to 250 SFU were counted in response to HY peptides immunization, corresponding to IFN γ -secreting spleen cells (Figure 1B). To normalize the data from the different experiments, the index of IFN γ secretion of the positive control was set to 100. As a

negative control, some mice received PBS in the subretinal space, and the immune response was challenged by subcutaneous immunization by PBS:CFA (1:1). No significant IFN γ secretion was detected in this control group (25 SFU/10⁶ cells). Increasing dose of AAV-GFP-HY in the subretinal space at day 0 showed an inflammatory effect on spleen T-cells starting from 2.10⁹ vg (p-value=0.0493). A dose-response effect was noticed up to 5.10¹⁰ vg (p-value<0.0001), corresponding to the maximum dose that was possible to inject. Taken together, these data showed that, medium and high subretinally-injected doses of AAV8 (2.10⁹ to 5.10¹⁰ vg) induced a time-dependent anti-transgene proinflammatory T-cell immune response in the periphery.

Peripheral anti-transgene T-cell immune response is closely correlated with local-regional, and peripheral transgene expression levels.

After demonstrating that subretinal injection of a high dose of AAV8 induced peripheral T-cell immune responses to the transgene product, we assessed the impact of the transgene expression level on the anti-transgene immune response. Mice were injected with PBS, HY peptides, or different doses of AAV8 encoding for Luciferase (Luc2) fused with HY peptides; two weeks later, they were subcutaneously immunized with PBS or HY peptides. Spleen cells were harvested on day 21 and stimulated *in vitro* with HY peptides to quantify IFN γ secretion by HY-specific T cells with ELISpot. In parallel, bioluminescence imaging of mice every three days enabled detection of Luc2 expression. Figure 2A illustrates the views used to quantify transgene (Luc2) expression by respect to the luminosity method described elsewhere (Cosette et al., 2016). For each mouse, dorsal and ventral views were acquired, and for each view, 2 regions of interest (ROI) drawn. Local-regional (head of each mouse) transgene expression was calculated as: Head^{dorsal view} + Head^{ventral view} (blue ROIs) whereas peripheral

transgene expression was calculated as: $(\text{Body}^{\text{dorsal view}} + \text{Body}^{\text{ventral view}}) - (\text{Head}^{\text{dorsal view}} + \text{Head}^{\text{ventral view}})$ (red ROIs – blue ROIs).

Control mice (negative, positive, and HY-injected) were imaged but obviously no Luc2 expression was detected locally nor in periphery. Medium ($4 \cdot 10^8$ to $2 \cdot 10^9$ vg) and high ($5 \cdot 10^{10}$ to 10^{11} vg) doses of AAV8 induced dose-dependent transgene expression from 3 days post-injection; this expression remained stable over 3 weeks (Figure 2B, Figure 2C). High doses of AAV8 induced transgene expression from day 3, that increased until day 13 and then declined until day 20 (p -value < 0.01 between day 13 and day 20) (Figure 2D). Note that the local-regional expression of the transgene was restricted to the eye, and there was no evidence of expression in the ipsilateral cervical lymph node through 21 days (Figure 2A, Figure 2B), regardless of the AAV dose. On day 21, an IFN γ ELISpot assay was performed on spleen cells stimulated *in vitro* with HY peptides. Figure 2E shows a plot of each mouse according to its transgene expression level on day 20 and the number of its SFU (ELISpot). Results show that the IFN γ secretion was correlated with local-regional (head) transgene expression (p -value=0.0056). Nonetheless, according to the coefficient of determination ($r^2=0.5123$), this transgene expression in the eye explains only 51% of the immune response (Figure 2E). At the same time, we assessed AAV8 leakage in the periphery. No transgene expression was observed in the periphery with AAV8 doses up to $2 \cdot 10^9$ vg, while doses exceeding $2 \cdot 10^9$ vg clearly induced transgene expression in the periphery, most likely in the liver (Figure 2F). Figure 2F clearly confirms these observations, highlighting a threshold of leakage in the periphery starting at $5 \cdot 10^{10}$ vg. According to correlations between the peripheral transgene expression level on day 20 and the IFN γ ELISpot assay results, peripheral transgene expression clearly affected immune response (p -value=0.0059) (Figure 2F). Taken together, these data show that the transgene expression level in the eye was correlated to the dose of AAV8 injected subretinally,

but more importantly, that high doses of AAV8 injected in the subretinal space leak into the periphery and seems to induce transgene expression in the liver. These data suggest that this leakage might explain, at least in part, the induction of a proinflammatory immune response by high doses of AAV8.

Subretinal associated immune inhibition by co-injection with HY peptides can occur whatever the AAV dose injected subretinally.

We have shown that subretinal injection of medium or high doses of AAV induce proinflammatory anti-transgene immune responses that are not observed with low doses. We have previously pointed out that the subretinal associated immune inhibition (SRAII) mechanism, consisting in a subretinal injection of HY peptides, leads to peripheral immune inhibition when immunizing subcutaneously with the HY antigen (Vendomele et al., 2018). Accordingly, we tested the possibility of using this SRAII mechanism as an immune-modulatory tool in subretinal AAV gene transfer, by co-injecting peptides from the transgene together with the AAV. Mice were injected with PBS, HY peptides, 2.10^9 or 5.10^{10} vg of AAV8-GFP-HY or the same AAV8 doses plus HY peptides. Two, 7 and 14 days after the subretinal injection, spleen cells were harvested and stimulated *in vitro* with HY peptides for ELISpot quantification of IFN γ secretion by HY-specific T cells (Figure 3A). In control groups such as PBS and HY peptides injected mice, no significant IFN γ secretion was detected (<50 SFU/ 10^6 cells) at the different time points. In AAV-injected mice, significant IFN γ secretion was detected (100 to 500 SFU/ 10^6 cells) at day 7 and day 14. Interestingly, co-injecting HY peptides with 5.10^{10} vg of AAV8, compared to the 5.10^{10} vg of AAV8 alone, significantly reduced IFN γ secretion at day 7 and day 14 (p-values<0.0001). Analyses were also performed at day 21 following an initial subretinal injection of AAV-GFP-HY (2.10^9 vs 5.10^{10} vg) or PBS as control, and subcutaneous immunization with PBS or HY peptides was performed at day 14.

Spleen cells were harvested on day 21 and stimulated *in vitro* with HY peptides to quantify IFN γ secretion by HY-specific T-cells with ELISpot (Figure 3B and 3C). As a control of the SRAII mechanism induction, our results showed that IFN γ secretion was inhibited by 48.4% (p-value=0.003) in mice that received HY peptides subretinally (Figure 3C, white bar), compared with the positive control. Interestingly, co-injecting HY peptides with 2.10⁹ vg of AAV8, compared to the 2.10⁹ vg of AAV8 alone, reduced IFN γ secretion significantly (p-value=0.0086), by 39.9%. In the same way, co-injection of HY peptides with the high dose of AAV8 (5.10¹⁰ vg) decreased IFN γ secretion by HY-specific T cells by 50.1% (p-value<0.0001). Taken together, these data show that co-injection of immunodominant peptides from the transgene product together with medium or high dose of AAV8 can inhibit T-cell immune response to the transgene.

After the proof-of-concept that a subretinal co-injection of the HY peptides and AAV can induce HY-specific inhibition of IFN γ secretion by ELISpot, we investigated the effect of this injection on other cytokine profiles in wild type C57BL/6 mice. Spleen cells were cultured for 36h under conditions of *in vitro* stimulation by DBY, UTY, or HY (UTY+DBY) peptides to analyze CD4⁺ or CD8⁺ or all T cells cytokine secretion, respectively. Characteristic cytokines of Th1/Tc1 (IL-2, IFN γ , TNF α , GM-CSF), Th2/Tc2 (IL-4, IL-10, IL-13), Th17/Tc17 (IL-17), inflammation (IL-1 β , IL-6), and chemoattraction (RANTES, MCP-1) were then measured in the culture supernatant to determine the polarization of these cells (Figure 4). To have a synthetic and standardized view of cytokine secretions, the Kiviat diagrams were used to represent the proportion of production of 12 cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN γ , GM-CSF, TNF α , RANTES and MCP-1). For the all T-cells group, spleen cells from the negative control group of mice subretinally injected with PBS at day 0 and subcutaneously with PBS:CFA at day 14, secreted low amounts of each cytokines, apart from

MCP-1. The positive control group of mice subretinally injected with PBS at day 0 and rechallenged with HY peptides:CFA at day 14, presented a multiple cytokinic production, mostly pro-inflammatory cytokines and chemokines. The SRAII control group of mice subretinally injected with HY peptides at day 0 and rechallenged with HY peptides:CFA at day 14, presented global inhibition of inflammation which makes the cytokine profile similar to that of the negative control group. Interestingly, the medium (2.10^9 vg) and high (5.10^{10} vg) dose AAV groups presented a pro-inflammatory profile, mostly Th1/Tc1. Medium (2.10^9 vg) and high (5.10^{10} vg) dose AAV groups subjected to the SRAII strategy presented both a strong inhibition of inflammation which makes the cytokine profile similar to that of the negative control group. Differential analysis of CD4⁺ or CD8⁺ T-cells was performed using DBY, UTY or HY (UTY + DBY) peptides to restimulate splenocytes in vitro, respectively. CD4⁺ and CD8⁺ T-cells profile showed a pro-inflammatory profile and an inhibition similar to the profile of the all T-cells group. To summarize, AAV injection into the subretinal space induces a Th1/Tc1-oriented pro-inflammatory response, which can be inhibited by the SRAII strategy whatever the AAV dose.

Anti-transgene cell cytotoxicity can be inhibited by a simultaneous injection of peptides from the transgene product and AAV8 in the retina.

Since we have demonstrated that a simultaneous subretinal injection of high doses of AAV and peptides from the transgene product can lead to peripheral inhibition of the secretion by T-cells of pro-inflammatory cytokines such as IFN γ , we investigated the potentiality to inhibit the anti-transgene in vivo cytotoxicity. PBS, a high dose (5.10^{10} vg) of AAV8-GFP-HY alone, or AAV8-GFP-HY + HY peptides were injected in the subretinal space of C57BL/6 female mice on day 0, and two weeks later the immune response was challenged by subcutaneous immunization with HY:CFA. At day 17, a mixture of 3.10^6 CD45.1⁺ CD45.2⁻ CTV^{low} male and

3.10^6 CD45.1⁻ CD45.2⁺ CTV^{high} female spleen cells from C57BL/6 wild type mice were injected intravenously. At day 20, leucocyte analysis showed that the same proportion of male HY⁺ (CTV^{low}) and female HY⁻ (CTV^{high}) cells survived in the PBS-injected control group (Figure 5). As expected, very few male cells survived in the AAV-GF-HY injected group (5.2% male vs 94.8% female cells), in contrast to the AAV + HY peptides immunomodulatory group (26.4% male vs 73.6% female cells). Thus, co-injection of immunodominant peptides from the transgene together with a high dose of AAV8 is able to inhibit *in vivo* anti-transgene cell cytotoxicity.

Subretinally-induced immune inhibition by co-injection with HY peptides can occur in a murine model of retinal degeneration.

To evaluate the possibility that subretinal injection of AAV8 induces anti-transgene cellular immune responses and the possibility of using immunomodulatory mechanism as an immunomodulatory tool, rd10 mice were injected with PBS, HY peptides, 2.10^9 vg AAV8 encoding for GFP fused with HY peptides or AAV8-GFP-HY + HY peptides. Two weeks later, these mice were subcutaneously immunized with PBS or HY peptides. Spleen cells were harvested on day 21 and stimulated *in vitro* with HY peptides for ELISpot quantification of IFN γ secretion by HY-specific T cells. The 2.10^9 vg AAV dose induced an increase of IFN γ secretion compared to the positive control. These data show that, subretinally-injected doses of AAV8 induced an anti-transgene proinflammatory T-cell immune response in the periphery (Figure 6A). Moreover, our results show that IFN γ secretion was inhibited by 81.1% (p-value=0.0489) in mice that received HY peptides subretinally, compared to the positive control (Figure 6B). Interestingly, co-injecting HY peptides with 2.10^9 vg of AAV8, compared to the 2.10^9 vg of AAV8 alone, reduced IFN γ secretion by 62.3% (p-value=0.0005). Similarly, we noticed that the co-injection of HY peptides with high dose of AAV8 (5.10^{10} vg) decreased IFN γ secretion

by HY-specific T cells by 54.17% (Data not shown). Taken together, these data show that medium subretinally-injected doses of AAV8 induced an anti-transgene proinflammatory T-cell immune response in the periphery and it can be inhibited by the co-injection of immunodominant peptides from the transgene together in a specific immune context such as retinal degeneration. Following the demonstration that a subretinal co-injection of the HY peptides and AAV can induce HY-specific inhibition of IFN γ secretion by ELISpot in the rd10 pathophysiological murine model, we investigated the effect of the SRAII strategy on other cytokine profiles with the multiplex cytokine titration in the same conditions than for wild type mice. For the all T-cells group, spleen cells from the negative control group of mice subretinally injected with PBS at day 0 and subcutaneously with PBS:CFA at day 14, secreted low amounts of each cytokines (Figure 6C). The positive control group of mice subretinally injected with PBS at day 0 and rechallenged with HY peptides:CFA at day14, presented a multiple cytokinic production, mostly pro-inflammatory cytokines and chemokines. The SRAII control group of mice subretinally injected with HY peptides at day 0 and rechallenged with HY peptides:CFA at day 14, presented global inhibition of inflammation which makes the cytokine profile similar to that of the negative control group. Interestingly, the 2.10^9 vg AAV group presented a pro-inflammatory profile, mostly Th1/Tc1. Similarly to the wild type murine model, the AAV group in rd10 mice subjected to the SRAII strategy presented a strong inhibition of inflammation which makes the cytokine profile similar to that of the negative control group, but with a basal production of MCP-1. Differential analysis of CD4 $^+$ or CD8 $^+$ T-cells was performed using DBY, UTY or HY (UTY + DBY) peptides to restimulate splenocytes in vitro, respectively. CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T-cells profile showed a pro-inflammatory profile and an inhibition similar to the profile of the all T-cells group. To summarize, AAV injection into the subretinal space of

rd10 mice induces a Th1/Tc1-oriented pro-inflammatory response similarly to the wild type murine model, which can be inhibited by the SRAII strategy.

Discussion

AAV-mediated gene transfer in the retina has drastically advanced over the past 20 years, from the proof-of-concept in 1996 (Ali et al., 1996) to clinical trials in the 2000s. Despite initially promising results, long-term follow-up in some clinical trials have revealed inflammatory events and secondary loss of vision after the initial AAV-induced improvement for some patients (Bainbridge et al., 2015; Jacobson et al., 2015; Pennesi et al., 2018). On the one hand, the eye is considered as an immune-privileged organ, in which immune responses are often deviated toward pro-tolerogenic responses. However, inflammatory immune responses can occur, as revealed by ocular pathologies such as uveitis. This duality led us to explore the possibility of subclinical anti-transgene immune response in subretinal AAV-mediated gene transfer. Indeed, patients enrolled in clinical trials received immunosuppressive treatments, either locally and/or systemically during the first few days after AAV injection, which probably limited, delayed, or masked the induction of immune responses. Because transgene expression continues to be expressed after the treatment, however, an immune response to the transgene product can be induced on the long term.

Our data clearly demonstrate that a dose-dependent pro-inflammatory T-cell immune response toward the transgene is induced in wild-type and rd10 mice. This Th1/Tc1 immune response is induced from 7 days post-injection in periphery and lasts at least 3 weeks. These data echo the study of Song et al. published in 2020 on a canine model of retinitis pigmentosa, in which dogs that received high doses of AAV (4.5×10^{11} vg) displayed ocular inflammation. This dose-responses study also revealed local retinal infiltration of CD8⁺ and CD4⁺ T cells (Song et al., 2020). The development of an inflammatory immune response, toward the transgene an/or the capsid must be investigated further, especially to assess the impact on a contralateral injection.

Our study also revealed a dose-dependent expression of the transgene in periphery. Indeed, with high doses of AAV, the transgene was detected in periphery, probably in the liver. Understanding how the transgene is expressed in periphery remains to be elucidated. It could be a leakage of the vector, which could transduce liver cells, and/or the migration of transduced cells from the retina to the periphery. Be that as it may, this peripheral expression is correlated to the induction of the anti-transgene immune response that we describe. Several questions must be further investigated, especially the impact in a pathophysiological context in which the retina and the blood-retinal barrier is degenerated. A leakage at lower doses might occur and could trigger a pro-inflammatory immune response at doses lower than ones we have tested in wild type mice. Moreover, keeping this transgene expression in periphery in mind, the question of a specific promoter must be raised. Restricting the expression to retinal cells might lower the induction of the immune response that we have observed, by limiting the expression in periphery. However, it does not mean that it would completely forbid the induction of immune responses, as ocular antigen-presenting cells, such as microglia, can migrate to the periphery and trigger an immune response (Karlstetter et al., 2010).

Finally, we have also highlighted the possibility to modulate the immune response using an antigen-specific immune-modulatory strategy. Indeed, the eye has been described as an immune-privileged site for years. ACAID (Anterior Chamber-Associated Immune Deviation) was described in animal models the 90s (Cone et al., 2010; Wang et al., 1997) as a mechanism which induces antigen-specific immune tolerance toward an antigen injected in the anterior chamber. Further studies have shown a similar mechanism in the vitreous cavity (Jiang and Streilein, 1991; Sparrow et al., 1993; Streilein, 1987) and in the subretinal space. For instance, delayed-type hypersensitivity measurements have shown that subretinal injection of ovalbumin induces inhibition of the Th1 profile in the periphery (Wenkel and Streilein, 1998), and

McPherson et al. showed that regulatory T cells specific to retinal antigens are generated in the periphery (McPherson et al., 2011). We have previously described the SRAII (SubRetinal Associated Immune Inhibition) with the HY male antigen. (Vendomèle et al., 2018). Moreover, several elements such as the tolerance of corneal transplants (85-90% rejection-free at 2 years, little immunosuppression) and the induction of delayed hypersensitivity in patients with retinal necrosis due to Varicella-Zoster Virus (Kozuka et al., 2001) suggest that the ACAID and SRAII mechanism could take place in humans. Taken together, we decided to use this SRAII mechanism to modulate the anti-transgene pro-inflammatory immune responses triggered by subretinal AAV injection. Our data clearly show that the co-injection of immunodominant peptides from the transgene together with the AAV vector (medium and high doses) inhibits the anti-transgene immune responses (40-50% inhibition). Interestingly, the basal proinflammatory pathophysiological context of rd10 mice does not impact the SRAII immunomodulatory potential since the subretinal co-injection inhibits the Th1/Tc1-oriented pro-inflammatory response similarly to the wild type murine model. This is a major point-of-interest for future clinical trials. Indeed, patients in ocular AAV-mediated clinical trials received local and/or systemic immunosuppressive treatments (*eg.*, prednisolone) before and for a few days after their injection. This kind of approach enables non-specific inhibition of the immune response, which can be deleterious for the patient. Moreover, its effect is only transient, while the transgene is expressed over the long term. Our unique approach, which does not require a supplemental surgical procedure, and which induces an antigen-specific inhibition of the immune response, appears to be very promising.

If this approach is confirmed in other models, the SRAII mechanism could be used in other therapies which requires a specific immune modulation. On the long term, these results could lead to improvements in the safety and effectiveness of AAV-mediated gene transfer for

patients. Our work opens a new avenue of investigation in the field of immune responses in AAV-mediated subretinal gene transfer and may provide insights for transgene-specific immune modulation in a larger context.

Materials and methods

Animals

Wild-type six- to eight-week-old C57BL/6 J female mice (H-2^b) were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Wild-type six- to eight-week-old C57BL/6 N female albino mice named B6N-Tyrc-Brd/BrdCrCl (H-2^b) were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). The B6 albino strain was received by Dr. Allan Bradley at Baylor College of Medicine in 2000. Retinal degeneration 10 (rd10) mice, identified by Chang et al. in 2002, are a model of autosomal recessive Retinitis Pigmentosa (RP). These mice carry a spontaneous mutation of the rod-phosphodiesterase (PDE) gene, leading to a rod degeneration that starts around P18 and later, cones are also lost. These mice mimic typical human RP. Animals were anesthetized either by intraperitoneal injection of 120 mg/kg ketamine (Virbac, Carros, France) and 6 mg/kg xylazine (Bayer, Lyon, France) or by inhalation of isoflurane (Baxter, Guyancourt, France). They were euthanized by cervical elongation. All mice were housed, cared for, and handled in accordance with the European Union guidelines and with the approval of the local research ethics committee (CEEA-51 Ethics Committee in Animal Experimentation, Evry, France; authorization number 2015102117539948).

AAV vectors

AAV8-GFP-HY, encoding the GFP-HY transgene under the ubiquitous PGK promoter, was produced by INSERM unit U1089 in Nantes, France. They used the tri-transfection technique in 293T cells cultured in CF10. AAV8-Luc2-HY, encoding the Luc2-HY transgene under the ubiquitous PGK promoter, was produced by Vector Core in G  n  thon, Evry, France. They used the tri-transfection technique in 293T cells cultured in roller bottles (Liu et al., 2003). Endotoxin levels were below 6 E.U/mL.

Peptides

The DEAD Box polypeptide 3 Y-linked (DBY) and Ubiquitously Transcribed tetratricopeptide repeat gene Y-linked (UTY) peptides, NAGFNSNRANSSRSS and WMHHNMDLI respectively, were synthesized by Genepep (Montpellier, France) and shown to be more than 95% pure.

Subretinal injections

The eye was protruded under microscopic visualization and perforated with a 27G bevelled needle. A blunt 32G needle set on a 10 μ L Hamilton syringe was inserted in the hole and 2 μ L of PBS or HY peptides (UTY+DBY) and/or AAV vector was injected into the subretinal space. The quality of the injection was verified by checking the detachment of the retina.

Subcutaneous injections

PBS or UTY+DBY were emulsified in Complete Freund's Adjuvant (Sigma, Lyon, France) at a 1:1 ratio, and 100 μ L of the preparation (200 μ g of UTY+DBY/mouse) was injected at the base of the tail.

Cell extraction from spleen

After euthanasia, spleens were removed and crushed with a syringe plunger on a 70- μ m filter in 2 mL of RPMI medium. Red cells were lysed by adding ACK buffer (8.29 g/L NH_4Cl , 0.037 g/L EDTA, and 1 g/L KHCO_3) for one min. Lysis was stopped by addition of complete RPMI medium (10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1% glutamine, and 50 μ M β -mercaptoethanol). After centrifugation, cells were counted, and the concentration was adjusted in complete RPMI medium.

ELISpot assay

Enzyme-Linked Immunospot plates (MAHAS45, Millipore, Molsheim, France) were coated with anti-IFN γ antibody (eBiosciences, San Diego, CA) overnight at +4°C. Stimulation media (complete RPMI, UTY (2 μ g/mL), DBY (2 μ g/mL), UTY+DBY (2 μ g/mL) or Concanavalin A (Sigma, Lyon, France) (5 μ g/mL) were plated and $5 \cdot 10^5$ splenocytes/well were added. After 24 hours of culture at +37°C, plates were washed and the secretion of IFN γ was revealed with a biotinylated anti-IFN γ antibody (eBiosciences), Streptavidin-Alcalin Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and BCIP/NBT (Mabtech, Les Ulis, France). Spot forming units (SFU) were counted with an AID ELISpot iSpot Reader system ILF05 and AID ELISpot Reader v6.0 software.

Bioluminescence imaging

Albino mice were injected intraperitoneally with luciferin (250 mg/kg of mice) and anesthetized with isoflurane for imaging. Ten minutes after luciferin injection, mice were placed in the imager for measurements. The imaging process used IVIS Lumina equipment and Living Image software.

Cytokine Titration by Multiplex Cytometric Bead Array (CBA)

Stimulation media [medium, UTY (2 µg/mL), DBY (2 µg/ mL), UTY + DBY (2 µg/mL), or Concanavalin A (5 µg/mL)] were plated and 10^6 splenocytes/well were added. After 36 h of culture at +37°C, supernatants from triplicates were pooled and frozen at -80°C until the titration. Cytometric bead arrays were performed with BD Biosciences flex kits (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IFNγ, GM-CSF, TNFα, RANTES and MCP-1). Briefly, capture bead populations with distinct fluorescence intensities and coated with cytokine-specific capture antibodies were mixed together. Next, 25 µL of the bead mix of beads was distributed and 25 µL of each sample (supernatants) was added. After 1h of incubation at room temperature, cytokine-specific PE-antibodies were mixed together and 25 µL of this mix was added. After 1 h of incubation at room temperature, beads were washed with 1 mL of Wash buffer and data were acquired with an LSRII flow cytometer (BD Biosciences). FACS software (BD Biosciences) was used for the analysis, and Kiviat diagrams were generated by Excel software.

In vivo cell cytotoxicity assay

Spleen cells from CD45.1⁺ CD45.2⁻ male and CD45.1⁻ CD45.2⁺ female C57BL/6 wild type mice were harvested as described above, and stained with Cell Trace Violet cell proliferation kit (Molecular Probes) in PBS at different concentration: 2µM for male and 20µM for female cells for 20 min at 37°C in the dark. The reaction was quenched by addition of cold complete RPMI medium containing 10% SVF. Cells were incubated for 5 min in complete RPMI medium at 37°C and then washed with PBS 1X. A mixture of 3×10^6 male cells and the same number of female cells in 200 µL was injected intravenously in the experimented (CD45.1⁻ CD45.2⁺) female C57BL/6 mice at day 17 of the protocol. Three days after injection, blood was harvested, red blood cells were lysed by adding ACK buffer, washed in PBS 1X, and leucocytes were stained for flow cytometry. First, cells were resuspended in 50µL of Fc block solution

(Pharmingen, BD Biosciences) diluted to 1.7 μ g/mL in PBS containing 1% BSA and incubated for 10 min at 4°C. Next, 50 μ L of anti-CD45.1-PE (Pharmingen, BD Biosciences) at 5 μ g/mL in PBS 1% BSA was added. The cells were then incubated for 20 min at 4°C. As a control, some cells were stained in the same conditions with a the corresponding isotype antibody: mouse IgG2a, κ -PE (Pharmingen, BD Biosciences). Data were acquired on a CytoFLEX LX flow cytometer (Beckman Coulter) and analyzed with the CytExpert software (Beckman Coulter).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism V6.0. After ANOVA, Dunnett or Tukey's test was performed. *P*-value < 0.05: *, <0.01: **, <0.001: ***, <0.0001: ****.

Acknowledgments

The authors thank the animal facility core (Genopole, Evry, France) for mice housekeeping and contribution to bioexperimentation. Authors are grateful to Sabrina Donnou, Mirella Mormin, Catherine Poinsignon and Audrey Pineiro for technical assistance.

Grant support: This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the University of Evry Val d'Essonne (UEVE), the Actions Thématiques Incitatives de Genopole (ATIGE), and the Fondation de France (Berthe Foissier) funds.

Abbreviations

Anterior chamber-associated immune deviation (ACAID); Adeno-associated virus (AAV); Leber's congenital amaurosis (LCA); Luciferase (Luc2); Region of interest (ROI); Spot-forming unit (SFU); Subcutaneous (SC); Subretinal (SR); Subretinal-associated immune inhibition (SRAII).

Author contributions

G.C., J.V. and S.F. designed experiments, analyzed data, and wrote the paper. G.C. and J.V. performed experiments. D.D. and A.G. provided expertise and feedback.

Conflicts of interest

Authors have no conflict of interest to declare

References

- Acland, G.M., Aguirre, G.D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Pearce-Kelling, S.E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A.M., et al. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat. Genet.* 28, 92–95.
- Acland, G.M., Aguirre, G.D., Bennett, J., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Bennicelli, J., Dejneka, N.S., Pearce-Kelling, S.E., Maguire, A.M., Palczewski, K., et al. (2005). Long-Term Restoration of Rod and Cone Vision by Single Dose rAAV-Mediated Gene Transfer to the Retina in a Canine Model of Childhood Blindness. *Mol. Ther.* 12, 1072–1082.
- Ali, R.R., Reichel, M.B., Thrasher, A.J., Levinsky, R.J., Kinnon, C., Kanuga, N., Hunt, D.M., and Bhattacharya, S.S. (1996). Gene Transfer into the Mouse Retina Mediated by an Adeno-Associated Viral Vector. *Hum. Mol. Genet.* 5, 591–594.
- Allocca, M., Mussolino, C., Garcia-Hoyos, M., Sanges, D., Iodice, C., Petrillo, M., Vandenbergh, L.H., Wilson, J.M., Marigo, V., Surace, E.M., et al. (2007). Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J. Virol.* 81, 11372–11380.
- Auricchio, A., Kobinger, G., Anand, V., Hildinger, M., O'Connor, E., Maguire, A.M., Wilson, J.M., and Bennett, J. (2001). Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. *Hum. Mol. Genet.* 10, 3075–3081.
- Bainbridge, J.W.B., Mehat, M.S., Sundaram, V., Robbie, S.J., Barker, S.E., Ripamonti, C., Georgiadis, A., Mowat, F.M., Beattie, S.G., Gardner, P.J., et al. (2015). Long-Term Effect of Gene Therapy on Leber's Congenital Amaurosis. *N. Engl. J. Med.* 372, 1887–1897.
- Chan, N.S.-W., Chee, S.-P., Caspers, L., and Bodaghi, B. (2017). Review for Disease of the Year: Clinic of Cytomegalovirus-Induced Anterior Uveitis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 1–9.
- Chang, B., Hawes, N.L., Hurd, R.E., Davisson, M.T., Nusinowitz, S., and Heckenlively, J.R. (2002). Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res.* 42, 517–525.
- Cideciyan, A.V., Jacobson, S.G., Beltran, W.A., Sumaroka, A., Swider, M., Iwabe, S., Roman, A.J., Olivares, M.B., Schwartz, S.B., Komáromy, A.M., et al. (2013). Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E517–E525.
- Cone, R.E., Chattopadhyay, S., Pais, R., Bhowmick, S., Sharafieh, R., Lemire, Y., and O'Rourke, J. (2010). The Induction of Circulating, ACAID-Inducing Monocytes Requires CCR2/CCL2-Dependent Migration of Circulating F4/80(+) Cells into the Anterior Chamber. *Ophthalmol. Eye Dis.* 2, 57–68.
- Cosette, J., Ben Abdelwahed, R., Donnou-Triffault, S., Sautès-Fridman, C., Flaud, P., and Fisson, S. (2016). Bioluminescence-Based Tumor Quantification Method for Monitoring Tumor Progression and Treatment Effects in Mouse Lymphoma Models. *J. Vis. Exp. JoVE.*
- Dupont, J.-B., Tournaire, B., Georger, C., Marolleau, B., Jeanson-Leh, L., Ledevin, M., Lindenbaum, P., Lecomte, E., Cogné, B., Dubreil, L., et al. (2015). Short-lived recombinant adeno-associated virus transgene expression in dystrophic muscle is associated with oxidative damage to transgene mRNA. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2, 15010.

- Hauswirth, W.W., Aleman, T.S., Kaushal, S., Cideciyan, A.V., Schwartz, S.B., Wang, L., Conlon, T.J., Boye, S.L., Flotte, T.R., Byrne, B.J., et al. (2008). Treatment of Leber Congenital Amaurosis Due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results of a Phase I Trial. *Hum. Gene Ther.* *19*, 979–990.
- Jacobson, S.G., Boye, S.L., Aleman, T.S., Conlon, T.J., Zeiss, C.J., Roman, A.J., Cideciyan, A.V., Schwartz, S.B., Komaromy, A.M., Doobrajh, M., et al. (2006a). Safety in nonhuman primates of ocular AAV2-RPE65, a candidate treatment for blindness in Leber congenital amaurosis. *Hum. Gene Ther.* *17*, 845–858.
- Jacobson, S.G., Acland, G.M., Aguirre, G.D., Aleman, T.S., Schwartz, S.B., Cideciyan, A.V., Zeiss, C.J., Komaromy, A.M., Kaushal, S., Roman, A.J., et al. (2006b). Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *13*, 1074–1084.
- Jacobson, S.G., Cideciyan, A.V., Roman, A.J., Sumaroka, A., Schwartz, S.B., Heon, E., and Hauswirth, W.W. (2015). Improvement and Decline in Vision with Gene Therapy in Childhood Blindness. *N. Engl. J. Med.* *372*, 1920–1926.
- Jiang, L.Q., and Streilein, J.W. (1991). Immune privilege extended to allogeneic tumor cells in the vitreous cavity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *32*, 224–228.
- Karlstetter, M., Ebert, S., and Langmann, T. (2010). Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models. *Immunobiology* *215*, 685–691.
- Kezuka, T., Sakai, J., Usui, N., Streilein, J.W., and Usui, M. (2001). Evidence for antigen-specific immune deviation in patients with acute retinal necrosis. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* *119*, 1044–1049.
- Kurniawan, E.D., Rocke, J.R., Sandhu, S.S., and Allen, P.J. (2017). Predictors of visual outcome and the role of early vitrectomy in streptococcal endophthalmitis. *Clin. Experiment. Ophthalmol.*
- Le Meur, G., Stieger, K., Smith, A.J., Weber, M., Deschamps, J.Y., Nivard, D., Mendes-Madeira, A., Provost, N., Péréon, Y., Cherel, Y., et al. (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther.* *14*, 292–303.
- Le Meur, G., Lebranchu, P., Billaud, F., Adjali, O., Schmitt, S., Béziau, S., Péréon, Y., Valabregue, R., Ivan, C., Darmon, C., et al. (2017). Safety and Long-Term Efficacy of AAV4 Gene Therapy in Patients with RPE65 Leber Congenital Amaurosis. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*
- Leberherz, C., Maguire, A., Tang, W., Bennett, J., and Wilson, J.M. (2008). Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. *J. Gene Med.* *10*, 375–382.
- Liu, Y.L., Wagner, K., Robinson, N., Sabatino, D., Margaritis, P., Xiao, W., and Herzog, R.W. (2003). Optimized production of high-titer recombinant adeno-associated virus in roller bottles. *BioTechniques* *34*, 184–189.
- MacLachlan, T.K., Lukason, M., Collins, M., Munger, R., Isenberger, E., Rogers, C., Malatos, S., Dufresne, E., Morris, J., Calcedo, R., et al. (2011). Preclinical safety evaluation of AAV2-sFLT01- a gene therapy for age-related macular degeneration. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *19*, 326–334.
- Maguire, A.M., High, K.A., Auricchio, A., Wright, J.F., Pierce, E.A., Testa, F., Mingozzi, F., Benniselli, J.L., Ying, G., Rossi, S., et al. (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber’s congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Lond. Engl.* *374*, 1597.

- McPherson, S.W., Heuss, N.D., Lehman, U., and Gregerson, D.S. (2011). Generation of Regulatory T Cells to Antigen Expressed in the Retina. *Curr. Immunol. Rev.* 7, 344–349.
- Pennesi, M.E., Weleber, R.G., Yang, P., Whitebitch, C., Thean, B., Flotte, T.R., Humphries, M., Chegarnov, E., Beasley, K.N., Stout, J.T., et al. (2018). Results at 5 Years After Gene Therapy for RPE65-Deficient Retinal Dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 29, 1428–1437.
- Petit, L., Lh riteau, E., Weber, M., Le Meur, G., Deschamps, J.-Y., Provost, N., Mendes-Madeira, A., Libeau, L., Guihal, C., Colle, M.-A., et al. (2012). Restoration of vision in the pde6 -deficient dog, a large animal model of rod-cone dystrophy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 2019–2030.
- Ramachandran, P.S., Lee, V., Wei, Z., Song, J.Y., Casal, G., Cronin, T., Willett, K., Huckfeldt, R., Morgan, J.I.W., Aleman, T.S., et al. (2016). Evaluation of Dose and Safety of AAV7m8 and AAV8BP2 in the Non-Human Primate Retina. *Hum. Gene Ther.*
- Rizzolo, L.J., Peng, S., Luo, Y., and Xiao, W. (2011). Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog. Retin. Eye Res.* 30, 296–323.
- Song, C., Dufour, V.L., Cideciyan, A.V., Ye, G.-J., Swider, M., Newmark, J.A., Timmers, A.M., Robinson, P.M., Knop, D.R., Chulay, J.D., et al. (2020). Dose Range Finding Studies with Two RPGR Transgenes in a Canine Model of X-Linked Retinitis Pigmentosa Treated with Subretinal Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* 31, 743–755.
- Sparrow, J.R., Matthews, G.P., Iwamoto, T., Ross, R., Gershbein, A., and Chang, S. (1993). Retinal tolerance to intravitreal perfluoroethylcyclohexane liquid in the rabbit. *Retina Phila. Pa* 13, 56–62.
- Stein-Streilein, J. (2013). Mechanisms of immune privilege in the posterior eye. *Int. Rev. Immunol.* 32, 42–56.
- Stein-Streilein, J., and Streilein, J.W. (2002). Anterior chamber associated immune deviation (ACAID): regulation, biological relevance, and implications for therapy. *Int. Rev. Immunol.* 21, 123–152.
- Streilein, J.W. (1987). Immune regulation and the eye: a dangerous compromise. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 1, 199–208.
- Taylor, A.W., Alard, P., Yee, D.G., and Streilein, J.W. (1997). Aqueous humor induces transforming growth factor-  (TGF- )-producing regulatory T-cells. *Curr. Eye Res.* 16, 900–908.
- Vandenberghe, L.H., Bell, P., Maguire, A.M., Xiao, R., Hopkins, T.B., Grant, R., Bennett, J., and Wilson, J.M. (2013). AAV9 targets cone photoreceptors in the nonhuman primate retina. *PloS One* 8, e53463.
- Vendomèle, J., Khebizi, Q., and Fisson, S. (2017). Cellular and Molecular Mechanisms of Anterior Chamber-Associated Immune Deviation (ACAID): What We Have Learned from Knockout Mice. *Front. Immunol.* 8.
- Vendomèle, J., Dehmani, S., Khebizi, Q., Galy, A., and Fisson, S. (2018). Subretinal injection of HY peptides induces systemic antigen-specific inhibition of effector CD4+ and CD8+ T-cell responses. *Front. Immunol.* 9.
- Wang, Y., Goldschneider, I., Foss, D., Wu, D.Y., O’Rourke, J., and Cone, R.E. (1997). Direct thymic involvement in anterior chamber-associated immune deviation: evidence for a nondeletional mechanism of centrally induced tolerance to extrathymic antigens in adult mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 158, 2150–2155.

- Weber, M., Rabinowitz, J., Provost, N., Conrath, H., Folliot, S., Briot, D., Chérel, Y., Chenuaud, P., Samulski, J., Moullier, P., et al. (2003). Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 7, 774–781.
- Wenkel, H., and Streilein, J.W. (1998). Analysis of immune deviation elicited by antigens injected into the subretinal space. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 1823–1834.

Figures

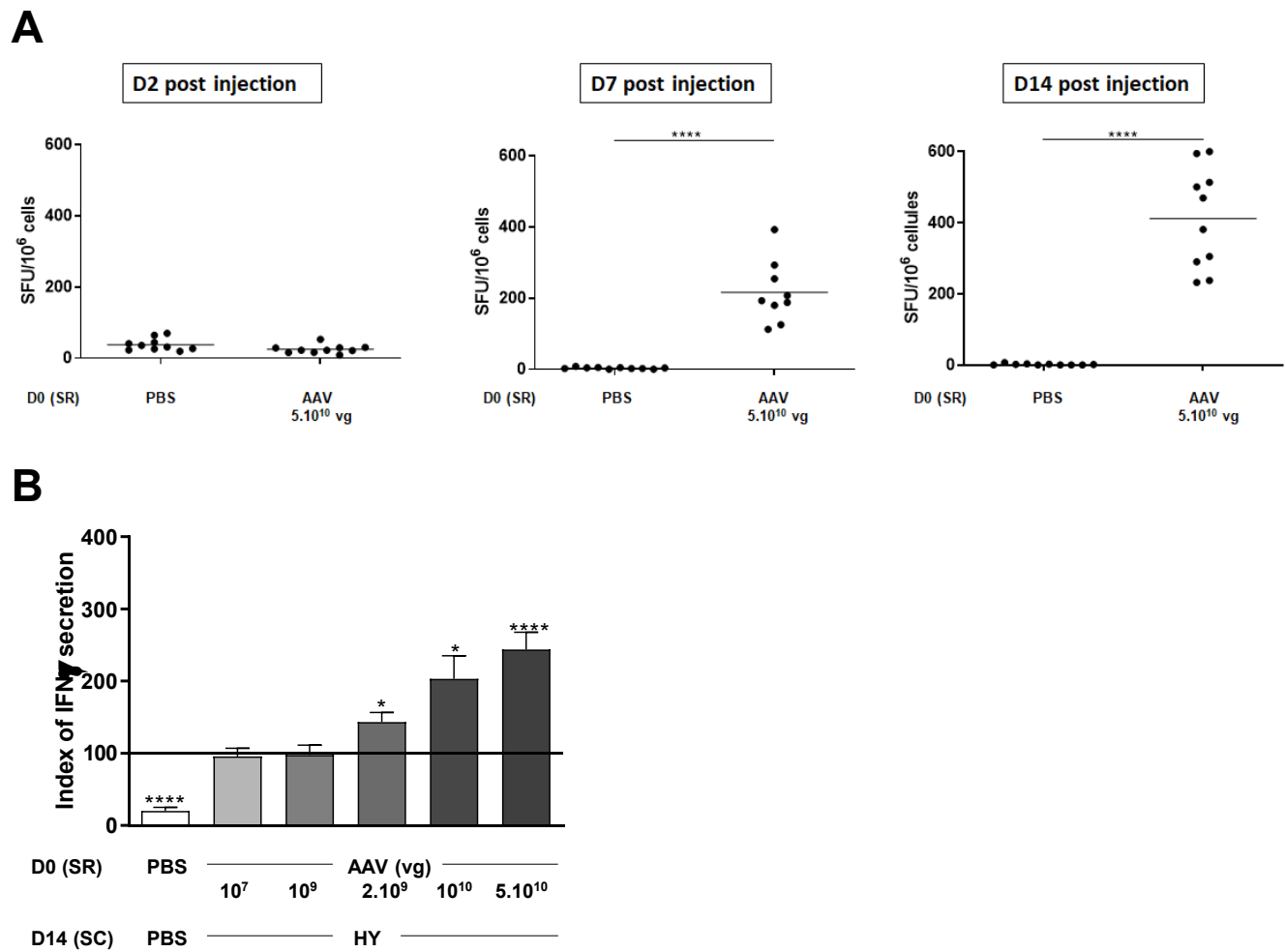


Figure 1. Induction of a dose-dependent anti-transgene proinflammatory T-cell immune response following a subretinal injection of AAV8 in wild type mice.

PBS, 50 μ g of HY peptides (DBY + UTY), different of AAV were injected in the subretinal space (SR) of C57BL/6 wild type female mice on day 0. Two weeks later, the immune response was challenged by subcutaneous immunization (SC) of either PBS:CFA or HY:CFA. (A) The immune response of total splenocytes re-stimulated *in vitro* by HY peptides was assessed 3, 7 or 14 days after the subretinal injection by IFN γ ELISpot (10 mice/group ; 2 independent experiments). SFU: Spot Forming Unit. (B) The immune response of total splenocytes re-stimulated *in vitro* by HY peptides was assessed 1 week after immunization by IFN γ ELISpot

(10 to 112 mice/group ; 2 to 22 independent experiments). Dunnett's test was performed *P*-value < 0.05: *, <0.01: **, <0.001: ***, <0.0001: ****.

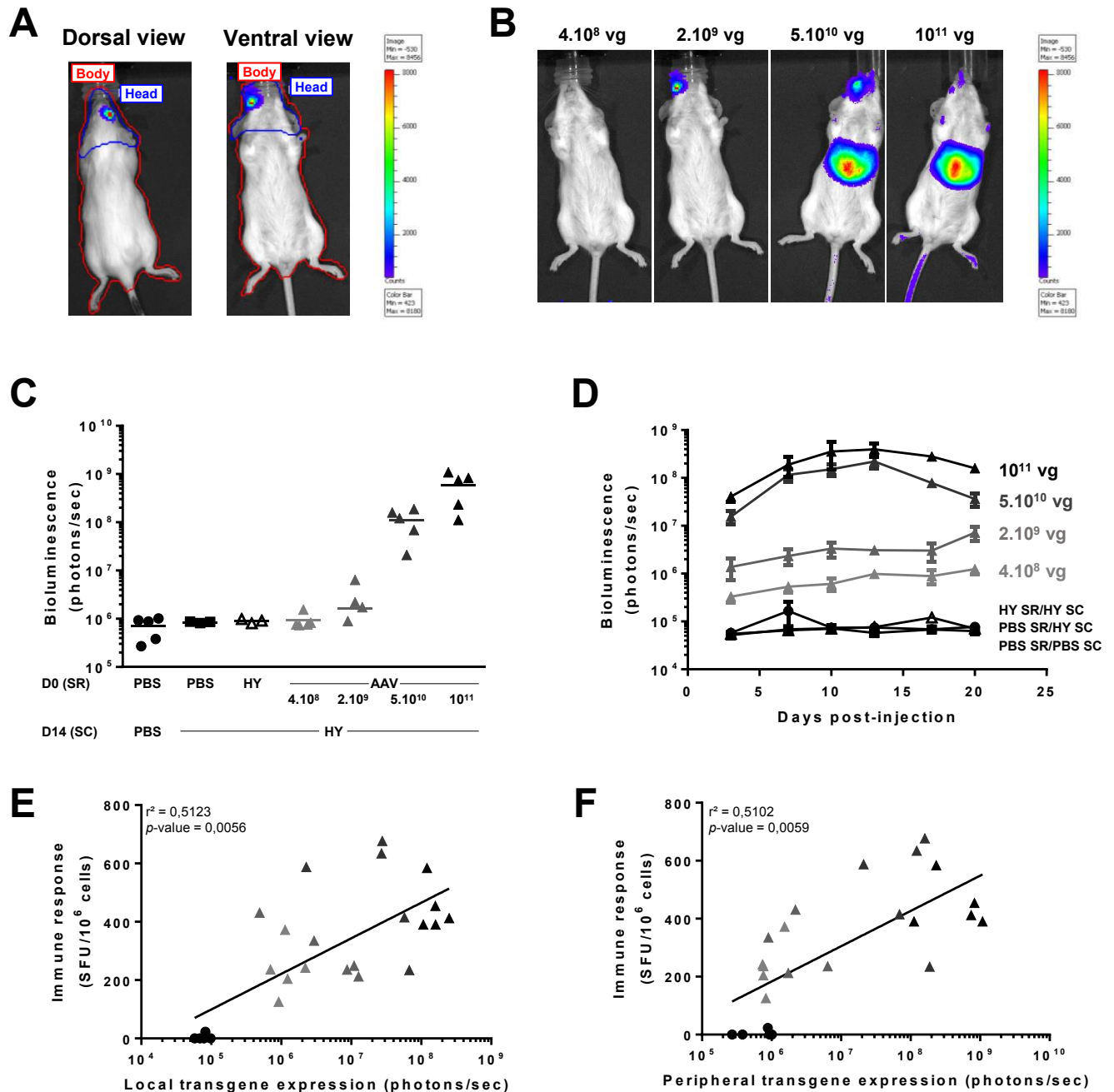


Figure 2. Correlation analysis between local-regional or peripheral transgene expression levels and peripheral anti-transgene T-cell immune response in wild type mice.

PBS, 50 μ g of HY peptides (or UTY + DBY), or different doses of AAV8-Luc2-HY were injected in the subretinal (SR) space of C57BL/6 wild type female mice on day 0. Two weeks later, the immune response was challenged by subcutaneous immunization (SC) of either PBS:CFA or HY:CFA. The immune response of total splenocytes re-stimulated *in vitro* by HY

peptides was assessed 1 week after immunization by IFN γ ELISpot. In parallel, bioluminescent imaging every 3-4 days monitored the transgene expression level (5 mice/group). (A) Mice were imaged on 2 sides: a dorsal view and a ventral view. For each mouse and each view, 2 regions of interest (ROI) were drawn. To assess local-regional (head) or peripheral transgene expression, 2 calculations were performed based on the defined ROIs. Local-regional transgene expression was calculated as: $\text{Head}^{\text{dorsal view}} + \text{Head}^{\text{ventral view}}$; peripheral transgene expression was calculated as: $(\text{Body}^{\text{dorsal view}} + \text{Body}^{\text{ventral view}}) - (\text{Head}^{\text{dorsal view}} + \text{Head}^{\text{ventral view}})$. (B) Visualization of the local-regional and peripheral transgene expression at day 20 on ventral view. The quantification of transgene expression by bioluminescence in the periphery at day 20 increased in a dose-dependant manner. (C) Kinetic study of the local-regional transgene expression by bioluminescence. (D) Visualization of the ocular local-regional transgene expression at day 20 on dorsal and ventral view. Data corresponding to mean $\pm$ SEM. (E) Correlation between local-regional transgene expression at day 20 and IFN γ secretion at day 21 after in vitro anti-HY T-cell stimulation. (F) Correlation between peripheral transgene expression at day 20 and IFN γ secretion at day 21 after in vitro anti-HY T-cell stimulation.

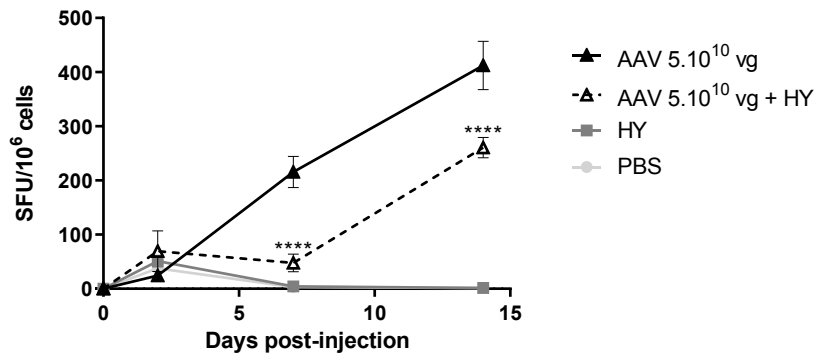
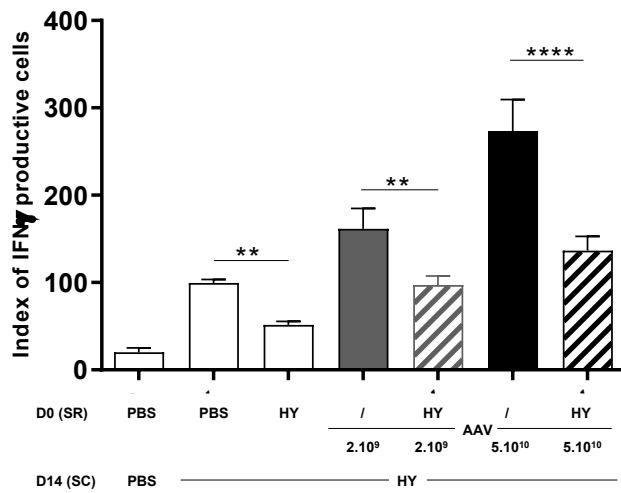
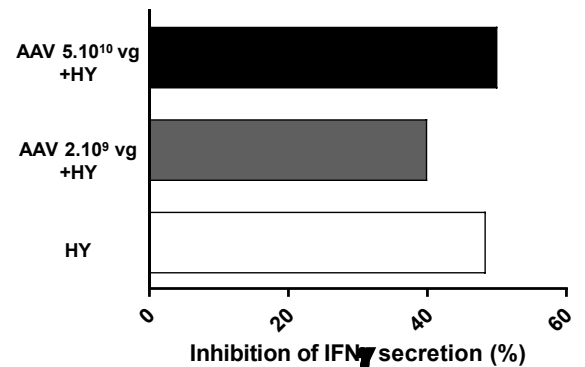
A**B****C**

Figure 3. Co-injection of AAV8 and HY peptides in wild type mice induces a subretinal associated immune inhibition of IFN γ -producing systemic T-cells.

PBS, 50 μ g of HY peptides (DBY + UTY), and medium (2.10^9 vg) or high (5.10^{10} vg) dose of AAV with or without HY peptides were injected in the subretinal space (SR) of C57BL/6 wild type female mice on day 0. (A) Kinetic study of the immune response of total splenocytes re-stimulated *in vitro* by HY peptides for IFN γ ELISpot (10 mice/group ; 2 independent experiments). Tukey's test was performed. *P*-value < 0.05: *, <0.01: **, <0.001: ***, <0.0001: ****. (B, C) Two weeks after intraocular injection, the immune response was challenged by a subcutaneous immunization (SC) of either PBS:CFA or HY:CFA. (B) The immune response

of total splenocytes re-stimulated *in vitro* by HY peptides for IFN γ ELISpot was assessed 1 week after immunization (44 to 112 mice/group ; 9 to 22 independent experiments). Bars correspond to mean $\pm$ SEM. Dunnett's test was performed (C) The percentage of inhibition for each indicated group was calculated compared to that of its respective control, such as AAV 2.10^9 vg + HY compared to AAV 2.10^9 vg group.

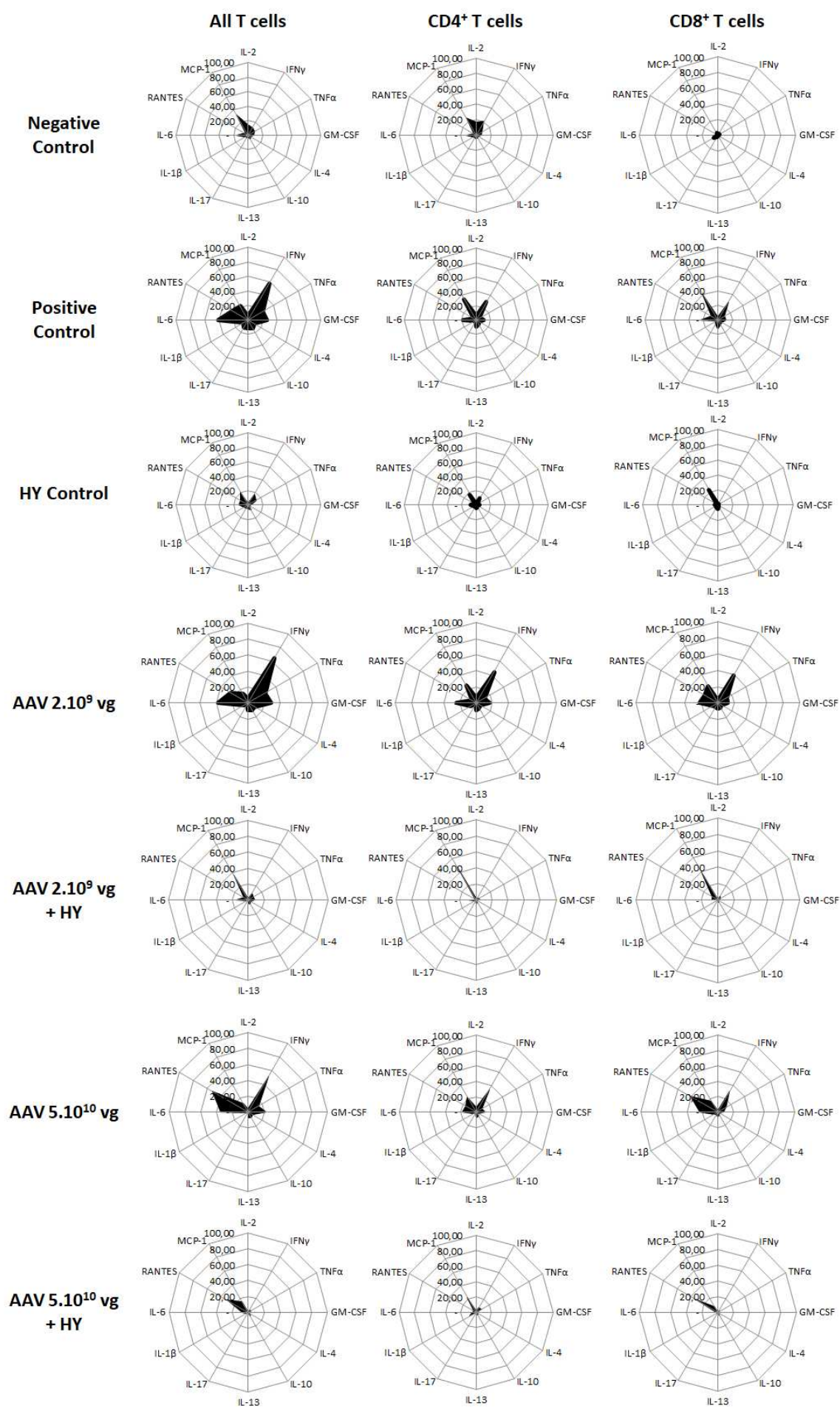


Figure 4. Global inhibition of the pro-inflammatory cytokine T-cell profile following a subretinal co-injection of AAV8 and HY peptides in wild type mice.

PBS, 50 µg of HY peptides (DBY + UTY), and AAV with or without HY peptides were injected in the subretinal space (SR) of C56BL/6 wild type female mice on day 0. Two weeks later, the immune response was challenged by subcutaneous immunization (SC) of either PBS:CFA or HY:CFA. Negative and positive control groups corresponds to a subretinal PBS injection at D0 followed by a subcutaneous injection at D14 of PBS:CFA or HY:CFA, respectively. HY peptides control group corresponds to a subretinal HY peptides injection at D0 followed by a subcutaneous injection at D14 of HY:CFA. Cytokines measurement secreted by T-cells with multiplex Cytometric Bead Array (CBA). Total splenocytes were re-stimulated in vitro by HY (All T-cells), DBY (CD4⁺ T-cells), or UTY (CD8⁺ T-cells) peptides. After 36 h of culture, supernatants were removed and titrated for the indicated cytokines (5 mice/group/experiment ; 13 independent experiments). Kiviat diagrams represent the percentage of cytokine secretion in the different groups based on the maximum of cytokine secretion.

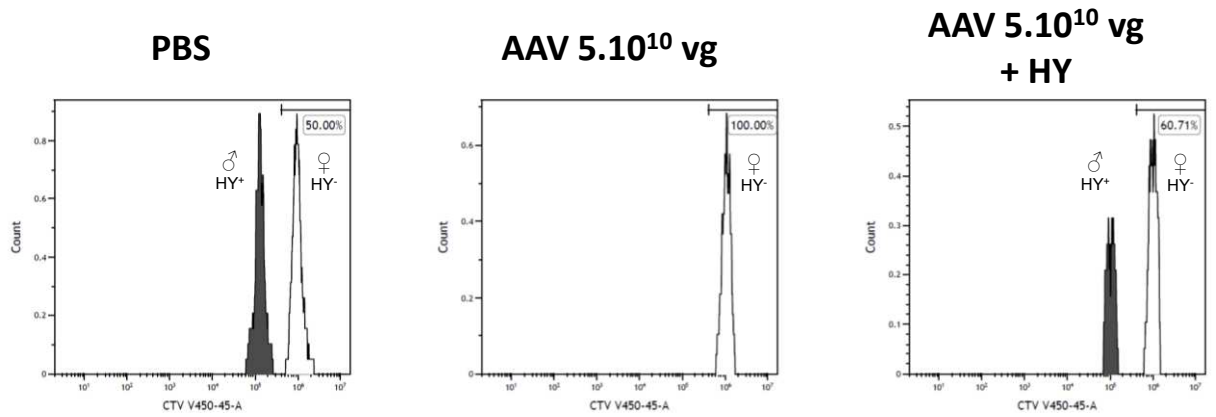
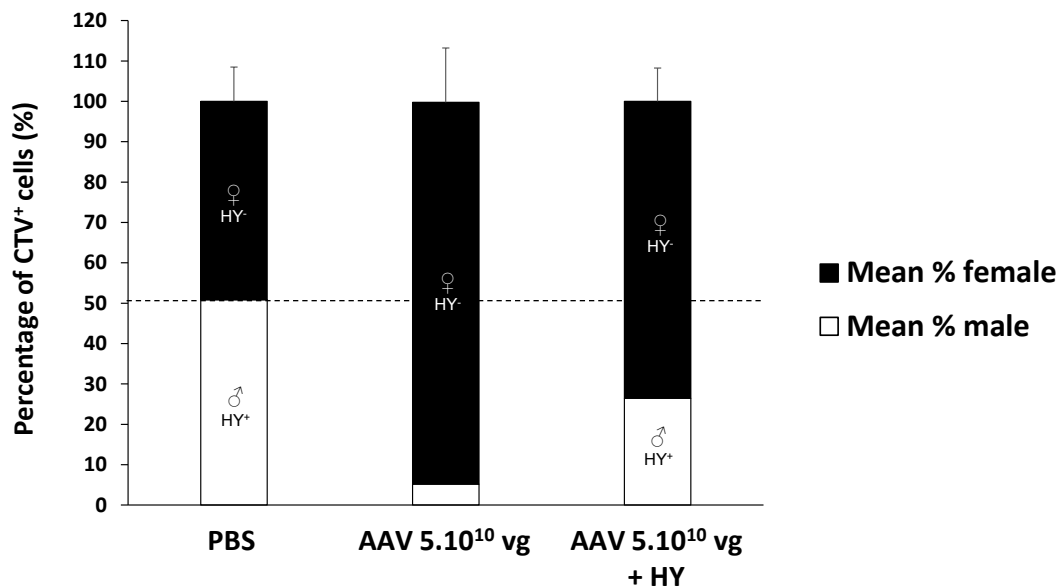
A**B**

Figure 5. Inhibition of in vivo anti-transgene cytotoxicity by a subretinal co-injection of HY peptides and a high dose of AAV8 in wild type C57BL/6 mice.

PBS, a high dose (5.10¹⁰ vg) of AAV8-GFP-HY alone, or AAV8-GFP-HY + HY peptides were injected in the subretinal space of C57BL/6 female mice at day 0. Two weeks later, the immune response was challenged by subcutaneous immunization with HY:CFA. At day 17, a mixture of 3.10⁶ CD45.1⁺ CD45.2⁻ CTV^{low} male and 3.10⁶ CD45.1⁻ CD45.2⁺ CTV^{high} female spleen cells from C57BL/6 wild type mice were injected intravenously. At day 20, blood was harvested

and leucocytes were stained for flow cytometry with an anti-CD45.1-PE mAb to analyse the male cell survival in vivo. Data shown are representative of 1 experiment out of 3 (5 mice/group/experiment). Bars correspond to mean $\pm$ SEM. Dunnett's test was performed. CTV: Cell Trace Violet.

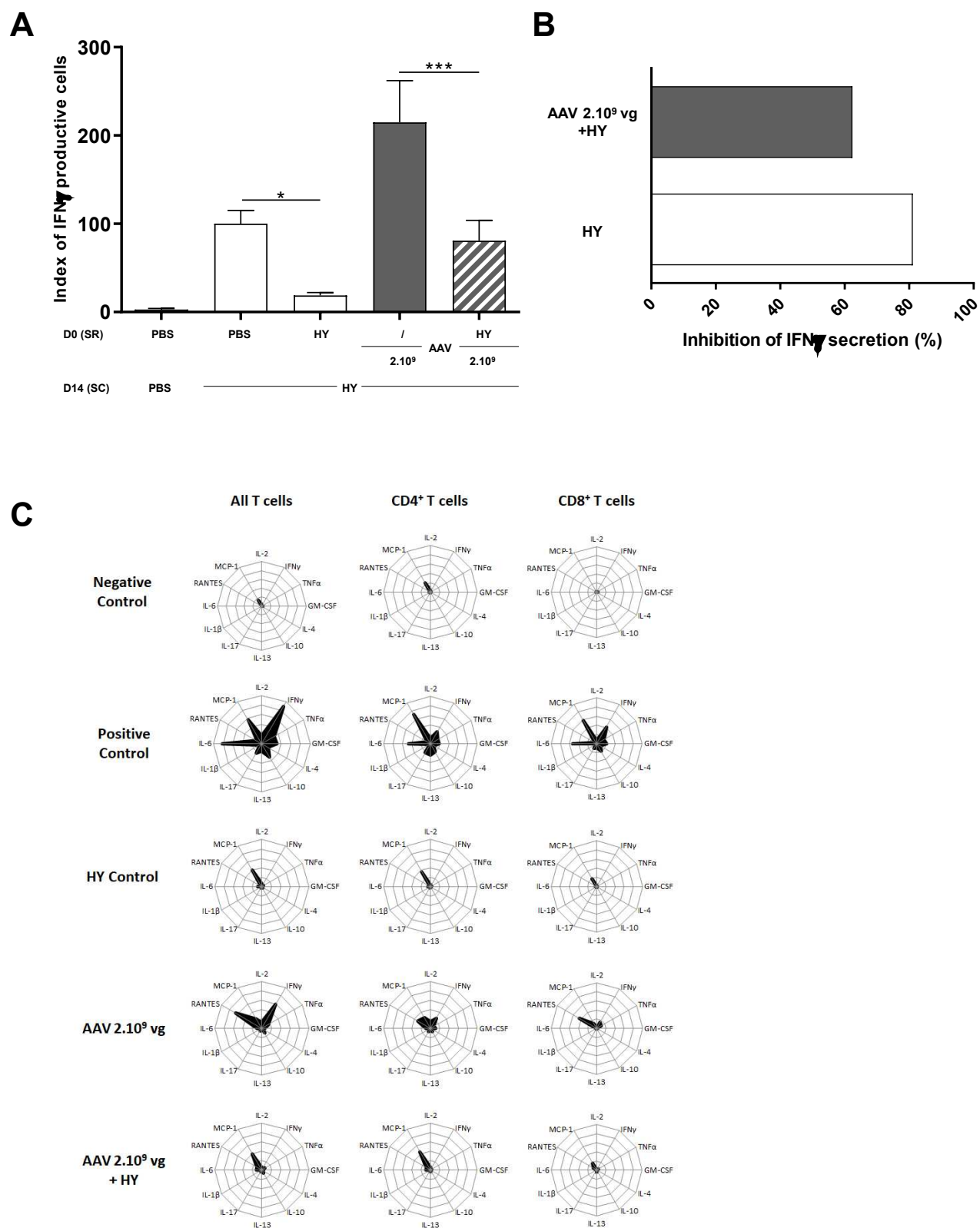


Figure 6. Co-injection of AAV8 and HY peptides in rd10 mice induces a subretinal associated immune inhibition.

PBS, 50 µg of HY peptides (DBY + UTY), and AAV with or without HY peptides were injected in the subretinal space (SR) of rd10 female mice on day 0. Two weeks later, the immune response was challenged by subcutaneous immunization (SC) of either PBS:CFA or HY:CFA.

(A) The immune response of total splenocytes re-stimulated *in vitro* by HY peptides was assessed 1 week after immunization by IFN γ ELISpot (14 to 20 mice/group ; 3 to 5 independent experiments). Bars correspond to mean $\pm$ SEM. Dunnett's test was performed. *P*-value < 0.05: *, <0.01: **, <0.001: ***, <0.0001: ****. (B) The percentage of inhibition for each indicated group was calculated compared to that of its control. For example, the percentage of inhibition of AAV 2.10⁹ vg + HY was calculated by comparison to AAV 5.10⁹ vg. Data were obtained from 3 independent experiments. (C) Cytokines measurement secreted by T-cells with multiplex Cytometric Bead Array (CBA). Negative and positive control groups corresponds to a subretinal PBS injection at D0 followed by a subcutaneous injection at D14 of PBS:CFA or HY:CFA, respectively. HY peptides control group corresponds to a subretinal HY peptides injection at D0 followed by a subcutaneous injection at D14 of HY:CFA. Total splenocytes were re-stimulated *in vitro* by HY (All T-cells), DBY (CD4⁺ T-cells), or UTY (CD8⁺ T-cells) peptides. After 36 h of culture, supernatants were removed and titrated for the indicated cytokines (14 to 21 mice/group ; 5 independent experiments). Kivi diagrams represent the percentage of cytokine secretion in the different groups based on the maximum of cytokine secretion.

Les résultats consignés dans mon manuscrit original montrent **qu'une injection sous-rétinienne d'AAV8 induit une réponse pro-inflammatoire dans le modèle murin physiologique C57BL/6 J dès 7 jours post-injection et est croissante à J14 et J21**. Cette cinétique est caractéristique de la mise en place d'une réponse immunitaire cellulaire spécifique. **La réponse pro-inflammatoire induite est dose-dépendante dans le modèle murin physiologique C57BL/6 J**. De plus, **le niveau d'expression du transgène en périphérie (i.e. foie) est corrélé avec l'induction d'une réponse pro-inflammatoire anti-transgène**, ce qui laisse à penser que la fuite d'AAV en périphérie serait en partie responsable de l'induction de cette réponse immunitaire anti-transgène. **L'injection sous-rétinienne d'AAV8 induit aussi une réponse pro-inflammatoire dans le modèle murin physiopathologique rd10**, d'un niveau similaire à celui observé dans le modèle physiologique C57BL/6 J. Il ne semble pas que le contexte immunosuppresseur spécifique et l'état de dégénérescence rétinienne est un impact néfaste sur la réponse pro-inflammatoire. Enfin, l'exploitation du mécanisme de SRAII par co-injection de peptides HY et d'AAV a mis en évidence que **le SRAII peut être induit lors de l'injection de doses intermédiaires et forte d'AAV (2.10^9 vg et 5.10^{10} vg) dans les deux modèles murins**.

Pour continuer à caractériser les réponses immunitaires périphériques induites envers le produit du transgène et explorer l'hypothèse d'une perte de cellules transduites exprimant le transgène, j'ai réalisé des études de cytotoxicité *in vivo*. Cette méthode permet de déterminer la cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺ ou autrement dit, de déterminer à un instant t, la capacité globale de l'hôte à éliminer les cellules "cibles". Le test consiste à isoler des splénocytes de souris donneuses, à former deux populations cellulaires, l'une dit "cible" (dans notre cas : population de splénocytes mâles CD45.1) et "non cible" (dans notre cas : population de splénocytes femelles CD45.2) et à les injecter en quantité égale (1:1) par voie intraveineuse dans les souris femelles. Après le sacrifice des souris, leur sang est prélevé et traité pour une analyse par cytométrie en flux. L'ampleur de la destruction des cellules "cibles" par rapport aux cellules "non cibles" est déterminée en comparant les proportions de survie de ces cellules. Dans notre cas, les souris étant des femelles, les splénocytes mâles CD45.1 marqués et injectés devraient être éliminés par les souris ayant reçu de l'AAV codant le peptides HY. Tandis que la population de splénocytes femelles CD45.2 restera la même. Pour cela, à D0, des souris C57BL/6 femelles ont reçu du PBS, du peptide HY, du vecteur AAV8-PGK-GFP-HY ou une co-injection du vecteur AAV8-PGK-GFP-HY et des peptides HY. Elles ont été immunisées à

D14 avec ces mêmes peptides injectés en sous-cutané. A D17, un mélange en quantité égale de splénocytes femelles (CD45.2) et mâles (CD45.1) marqués avec du *Cell Trace Violet* (CTV) a été injecté par voie intraveineuse au niveau du sinus retro-orbital. Puis à D20, une analyse de la cytotoxicité *in vivo* a été réalisée grâce à un marquage cellulaire sur du sang total et une analyse par cytométrie en flux (Figure 24A). Comme attendu, les souris « contrôles », ayant reçu du PBS en zone sous-rétinienne, présentent les 2 populations des splénocytes : mâles et femelles en quantité égales (50%-50%) (Figure 24B). Pour le groupe de souris ayant reçu de l'AAV en zone sous-rétiniennes, on note une disparition de la population de splénocytes mâles (0%) tandis que la population de splénocytes femelles est toujours présente (et représente 100% des cellules totales) (Figure 24B). Ceci est une preuve supplémentaire que l'injection de vecteur AAV en zone sous-rétinienne induit une réponse anti-transgène et que les lymphocytes T CD8⁺ participent à l'élimination des cellules transuites exprimant le transgène. Ensuite, pour le groupe ayant reçu la co-injection de vecteur et de peptides HY, on observe une persistance de la population de splénocytes mâles (Figure 24B). En effet, le pourcentage final des 2 populations va changer, initialement à D17 le pourcentage est de 50-50 (50% cellules mâles-50% cellules femelles) puis à D20 il est à 39,29%-60,71% (39,29% cellules mâles-60,71% cellules femelles) (Figure 24C). La persistance de la population de cellules mâles suggère la présence de l'effet inhibiteur du mécanisme SRAII, celui-ci a permis de moduler la réponse des cellules impliquées dans la mise en place de la réponse anti-transgène. Le mécanisme du SRAII a permis d'agir sur le lymphocytes T CD8⁺ et ralentir leur action cytotoxique.

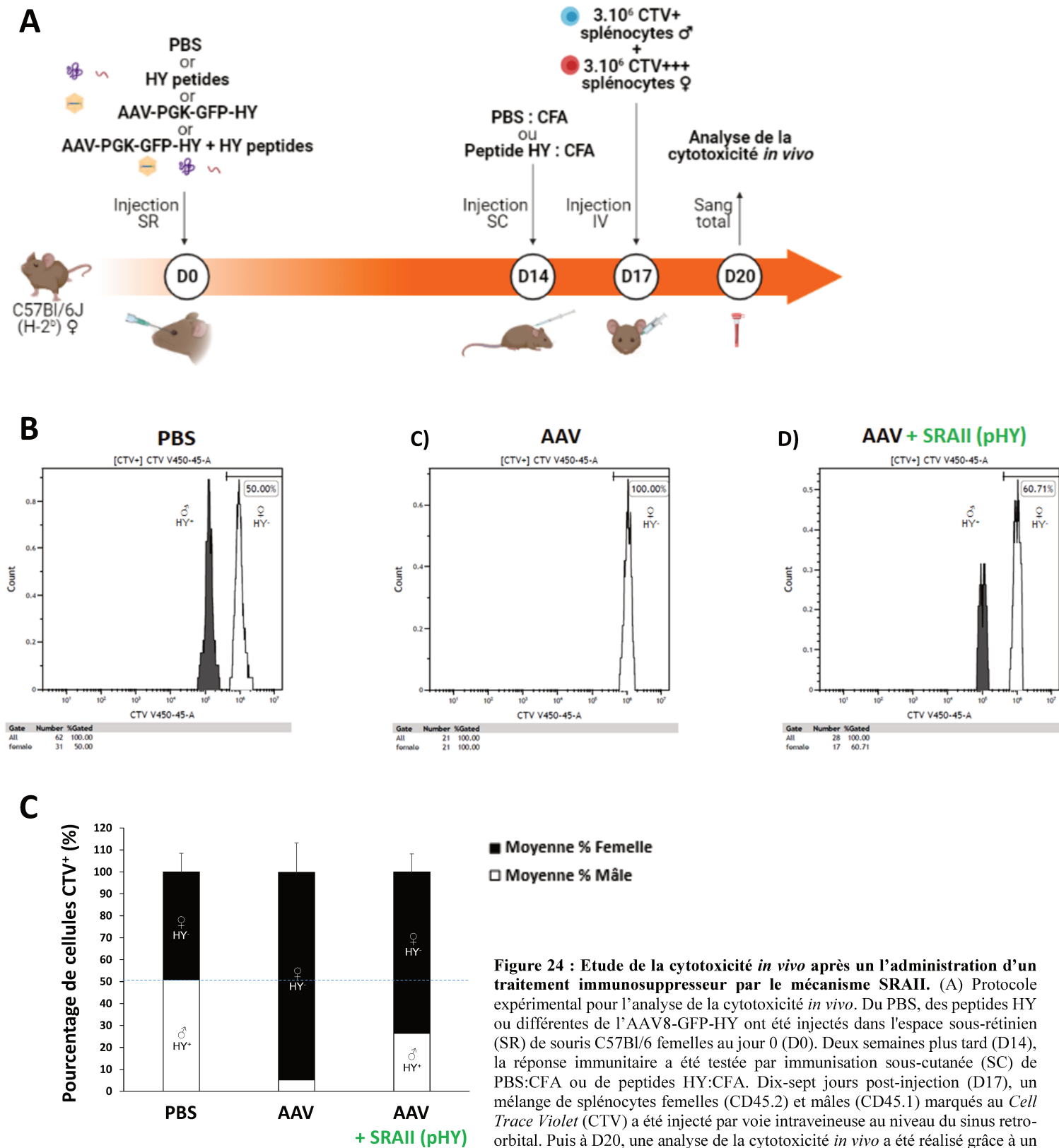


Figure 24 : Etude de la cytotoxicité *in vivo* après un l'administration d'un traitement immunosuppresseur par le mécanisme SRAII. (A) Protocole expérimental pour l'analyse de la cytotoxicité *in vivo*. Du PBS, des peptides HY ou différentes de l'AAV8-GFP-HY ont été injectés dans l'espace sous-rétinien (SR) de souris C57Bl/6 femelles au jour 0 (D0). Deux semaines plus tard (D14), la réponse immunitaire a été testée par immunisation sous-cutanée (SC) de PBS:CFA ou de peptides HY:CFA. Dix-sept jours post-injection (D17), un mélange de splénocytes femelles (CD45.2) et mâles (CD45.1) marqués au *Cell Trace Violet* (CTV) a été injecté par voie intraveineuse au niveau du sinus retro-orbital. Puis à D20, une analyse de la cytotoxicité *in vivo* a été réalisé grâce à un marquage cellulaire a été réalisé sur du sang total et analysé par cytométrie en flux. (B) Pourcentages des splénocytes mâles et femelles marqués au Cell Trace Violet à D20. (C) Comparaison des moyennes des pourcentages des splénocytes mâles et femelles à D20. pHY : Peptides HY

Enfin, comme évoqué précédemment outre le transgène, la capside fait partie des éléments pouvant induire une réponse immunitaire. Il paraît donc nécessaire d'étudier les réponses anti-capside associées à l'injection sous-rétinienne d'AAV puisqu'elles peuvent être aussi à l'origine de réponses délétères. De plus, la modulation des réponses immunitaires par effet *bystander* est aussi explorée. Les lymphocytes T régulateurs (LT_{reg}), spécifiques d'un antigène X, vont induire la suppression directe du développement des Lymphocytes T effecteurs anti-antigène X après reconnaissance par une CPA présentant l'antigène X. L'effet *bystander* (ou suppression liée) est un phénomène qui fait appel aux LT_{reg}, et qui conduit à la suppression indirecte de l'activation de lymphocytes T naïfs spécifiques d'un second antigène (par exemple antigène Y) en parallèle de leur suppression directe envers l'antigène X. Ce phénomène a été mis en évidence lorsque deux antigènes différents sont présentés simultanément dans un contexte local défini (c'est-à-dire lorsque deux antigènes sont présentés par la même CPA ou par des CPA étroitement adjacentes). Par conséquent, on observera la suppression directe et majoritaire des LT effecteurs spécifiques de l'antigène X et la suppression indirecte des LT naïfs spécifiques de l'antigène Y (Figure 25A). Ainsi l'effet *bystander* pourrait affecter les cellules T qui répondent aux antigènes présentés par les CPA à proximité et représenter un intérêt dans la modulation des réponses immunitaires spécifiques de différents antigènes (Mellor et Munn 2004). La question soulevée est de savoir si un effet *bystander* se met en place lors de l'immuno-modulation médiée par le mécanisme du SRAI. La co-injection de peptide HY et le vecteur simultanée et localisée peut-elle induire une inhibition des réponses pro-inflammatoires anti-transgène et anti-capside ? (Figure 25B)

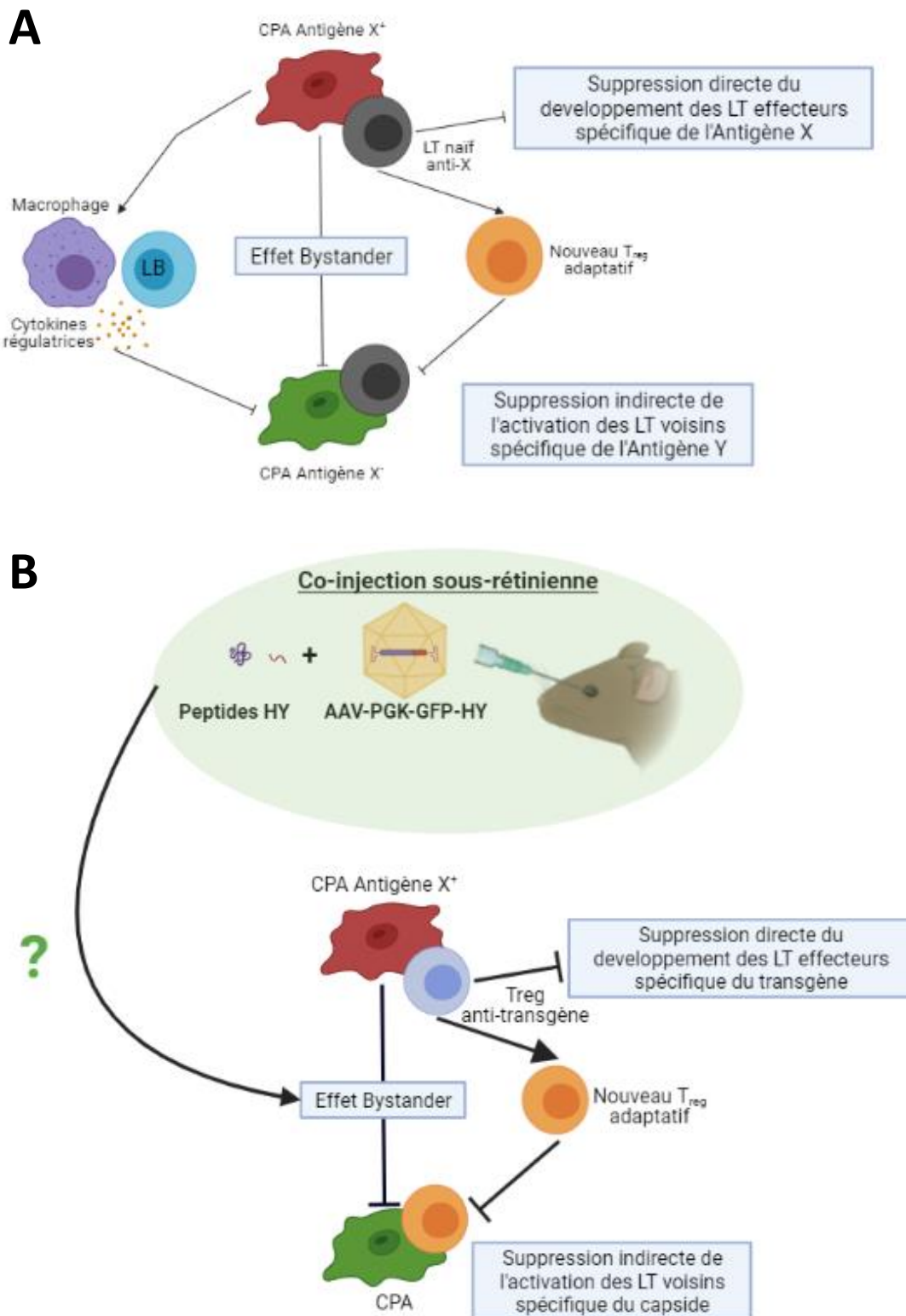


Figure 25 : Exploration de l'effet *by stander* dans la modulation des réponses immunitaires associées à un transfert de gène intra-oculaire. (A) Principe de l'effet *bystander*. (B) Exploration de l'effet *bystander* dans le cas d'une tentative d'immunomodulation des réponses associées aux capsides et aux transgènes après un transfert de gène intra-oculaire médié par AAV.

Pour cela, à D0, du PBS, des peptides HY ou de l'AAV8-GFP-HY avec ou sans peptides HY ont été injectés dans l'espace sous-rétinien (SR) de souris C57Bl/6 femelles au jour 0 (D0). La réponse immunitaire des splénocytes totaux restimulés *in vitro* par le vecteur AAV8 a été évaluée 7 ou 14 jours post-injection par ELISpot IFN γ (Figure 26A). A 7 et 14 jours post-injections, on note l'absence de production d'IFN γ pour les groupes contrôles à savoir les souris ayant reçu du PBS ou des peptides HY dans l'espace sous-rétinien (Figure 26B et 26C). Cependant à D7 et D14, chez les groupes ayant reçu de l'AAV, on observe une forte production d'IFN γ ce qui signifie la mise en place d'une réponse cellulaire anti-capside (Figure 26B et 26C). Toutefois, on remarque que la co-injection des peptides HY et de l'AAV induit une inhibition de la réponse pro-inflammatoire anti-capside. Ceci tend à appuyer l'hypothèse d'un effet *bystander* envers la capside lors de la co-injection de vecteur et de peptide du transgène (phénomène du SRAII).

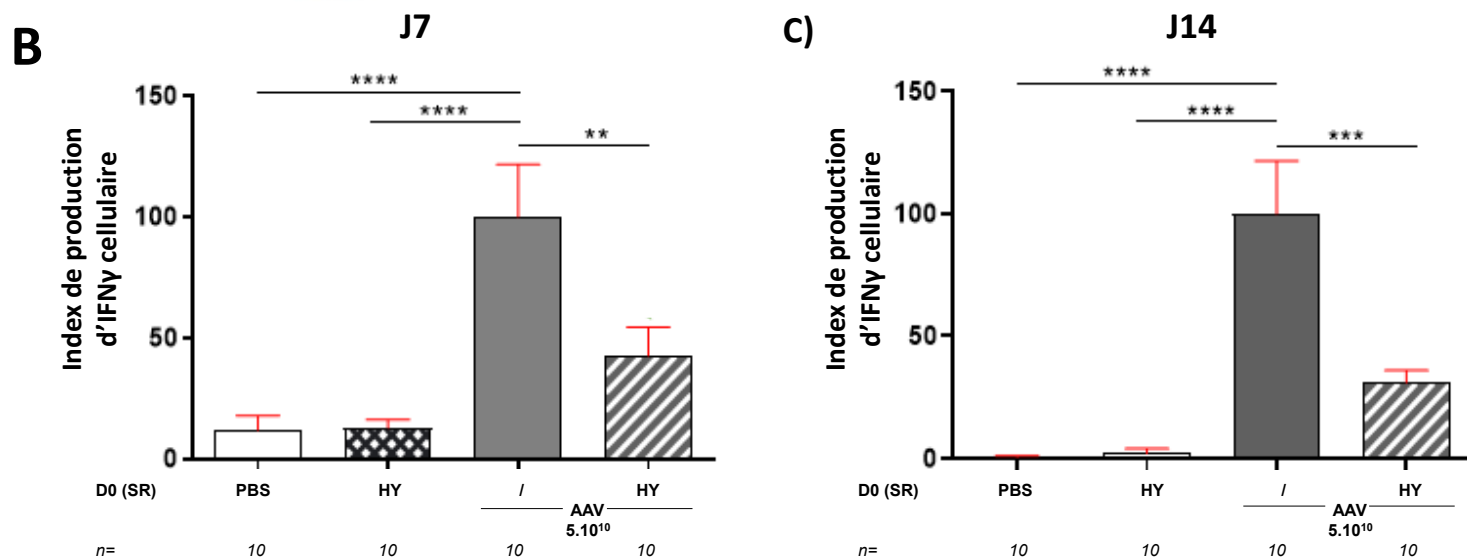
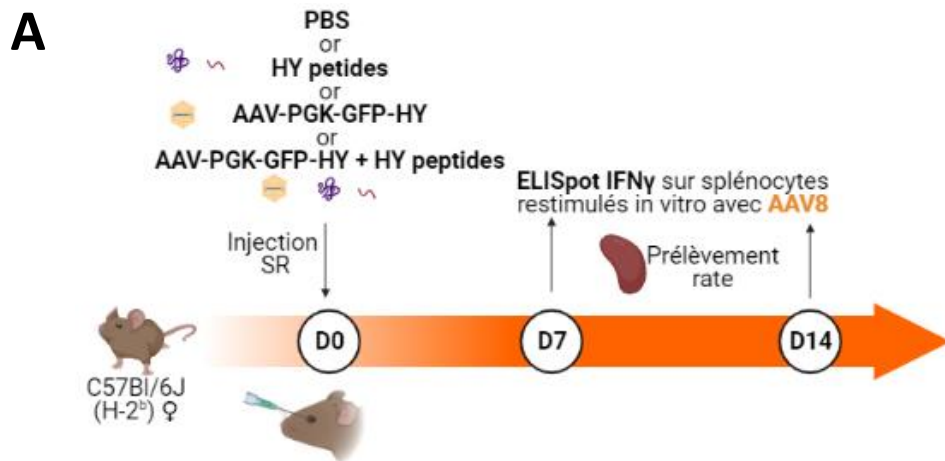


Figure 26 : Etude des réponses cellulaires anti-capside après un transfert de gène intraoculaire. (A) Représentation du protocole expérimental. Du PBS, des peptides HY ou différentes de l'AAV8-GFP-HY avec ou sans peptides HY ont été injectés dans l'espace sous-rétinien (SR) de souris C57Bl/6 femelles au jour 0 (D0). La réponse immunitaire des splénocytes totaux restimulés *in vitro* par le vecteur AAV8 a été évaluée 7 ou 14 jours après l'injection sous-rétinienne par ELISpot IFN- γ . (B) Index de production d'IFN- γ cellulaire 7 jours post-injection. (C) Index de production d'IFN- γ cellulaire 14 jours post-injection.

Figure 27 : Mise en place des réponses immunitaires cellulaires après un transfert de gène intraoculaire. Mise en place de réponses cellulaires anti-capside et anti-transgène après l'injection sous-rétinienne de différentes doses de vecteur AAV-PGK-GFP-HY (codant le peptide HY et la protéine GFP fusionnée le tout sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire PGK). La réponse immunitaire semble se déclencher uniquement lorsqu'un seuil minimum d'activation de la réponse inflammatoire est dépassé.

Figure 28 : Etude des réponses cellulaires anti-capside après un transfert de gène intraoculaire. (A) Représentation du protocole expérimental. Du PBS, des peptides HY ou différentes de l'AAV8-GFP-HY avec ou sans peptides HY ont été injectés dans l'espace sous-rétinien (SR) de souris C57Bl/6 femelles au jour 0 (D0). La réponse immunitaire des splénocytes totaux restimulés *in vitro* par le vecteur AAV8 a été évaluée 7 ou 14 jours après l'injection sous-rétinienne par ELISpot IFN- γ . (B) Index de production d'IFN- γ cellulaire 7 jours post-injection. (C) Index de production d'IFN- γ cellulaire 14 jours post-injection.

DISCUSSION

D'un point de vue anatomique, physiologique et immunitaire, l'œil est un organe très particulier. Il joue un rôle majeur dans la vision grâce à la présence d'une couche multicellulaire spécialisée, la rétine. Elle permet la prise en charge du signal lumineux et sa transformation en message électrique transmis au cerveau. La rétine n'a pas la capacité de se régénérer après la naissance, c'est pourquoi après une atteinte d'origine inflammatoire (*i.e.* uvéïte), génétique (*i.e.* Amaurose congénitale de Leber) ou liée à l'âge (*i.e.* dégénérescence maculaire liée à l'âge), une dégénérescence rétinienne est irréversible et donc une perte de la vision sera induite. Toutefois, l'œil semble être une cible idéale pour tester de nouvelles approches thérapeutiques. Précédemment, nous avons mis en évidence qu'il s'agit d'un organe relativement bien isolé du reste de l'organisme par la présence de barrière (*i.e.* barrière hémato-rétinienne, hémato-aqueuse et la membrane de Bruch), ce qui limite les risques de dissémination du produit thérapeutique par rapport à d'autres organes (Cunha-Vaz 1979). Ensuite, l'œil est un organe de petite taille ce qui implique que la quantité de produit thérapeutique nécessaire pour le traitement sera faible. Enfin et non pas des moindres, depuis plus d'un siècle, l'œil est décrit comme un site immuno-privilegié, en effet, il présente un environnement immunosuppresseur local et un mécanisme capable d'induire une réponse pro-toléro-gène en périphérie appelé ACAID (Perez et al. 2013). Grâce à ces propriétés, l'œil a été un des premiers organes faisant l'objet d'essais cliniques de thérapie génique *in vivo* par vecteur AAV, il y a plus de 10 ans (Bainbridge et al. 2008; Hauswirth et al. 2008b; Maguire et al. 2008a) et aux vus des résultats concluants, la validation du premier médicament de thérapie génique pour traiter la LCA (*i.e.* *Luxturna*®) a été possible en 2018. Néanmoins, la présence d'effets néfastes tel que des inflammations oculaires malgré la prise d'un traitement immunosuppresseur non spécifique et une perte secondaire de la vue chez certains patients traités (Bainbridge et al. 2015b) nous ont amené à nous questionner sur les conséquences immunitaires infra-cliniques de l'injection de rAAV. En effet peut-être que le statut immuno-privilegié de l'œil présente des limites ? La mise en place d'une réponse immunitaire anti-transgène contre les cellules transduites, pourrait se développer et induire la perte de l'expression du transgène et *in fine* une baisse de la vision après une phase d'amélioration.

C'est pourquoi, mon travail de thèse s'est concentré sur l'étude des conséquences immunitaires, et plus précisément caractériser les mécanismes inflammatoires infra-cliniques subséquents à une injection sous-rétinienne de rAAV en condition physiologique ou physiopathologique. Est-ce que l'injection sous-rétinienne de rAAV induit des réponses inflammatoires locales et ou

systemiques ? Est-ce qu'il s'agit de réponses anti-capside et/ou transgène ? Est-ce qu'un environnement pathologique peut avoir un impact plus important sur la mise en place de réponse inflammatoire ? Mon second objectif était de caractériser la modulation des réponses immunitaires induites par une stratégie d'immuno-modulation spécifique. Est-ce que les propriétés d'immuno-modulation périphérique de la zone sous-rétinienne sont maintenue dans le temps ? Les propriétés d'immuno-modulation locales sont-elles modifiées en conditions pathologiques, en particulier dans le cadre d'une dégénérescence rétinienne ?

Les expériences menées durant ma thèse ont montré que de fortes doses d'AAV (10^{10} et 5.10^{10} vg/œil) peuvent induire une réponse pro-inflammatoire anti-transgène en périphérie dans un modèle murin *wild type* dès 7 jours post-injection et augmente à J14 et J21. Ces résultats contrastent avec ceux observés lors de l'injection de faibles ou moyennes doses (10^8 à 10^9 vg/œil), en effet, elles n'induisent pas de réponses pro-inflammatoires ce qui ressemblerait à de « l'ignorance ». Ceci nous laisse penser qu'au-delà d'un certain seuil, une réponse pro-inflammatoire est possible, mais en dessous les signaux de danger associés à la dose seront tellement faibles qu'ils seront ignorés et aucune réponse pro-inflammatoire sera mise en place. Cependant lorsque ce seuil est dépassé, on observe la mise en place d'un effet dose entre le niveau d'expression du transgène et la réponse inflammatoire induite (Figure 27). Plus la dose de vecteur injectée est élevée, et par conséquent le niveau d'expression du transgène, plus la réponse pro-inflammatoire anti-transgène sera forte. Ceci est en accord avec ce que montre les essais cliniques, ainsi que plusieurs équipes de recherche (Khabou, Cordeau, et al. 2018b; Xiong et al. 2019; Chandler et al. 2021). Cette quantité de vecteur plus forte induit une expression du transgène croissante et donc la possibilité de conséquences sous-jacentes plus importantes comme des réponses inflammatoires.

A

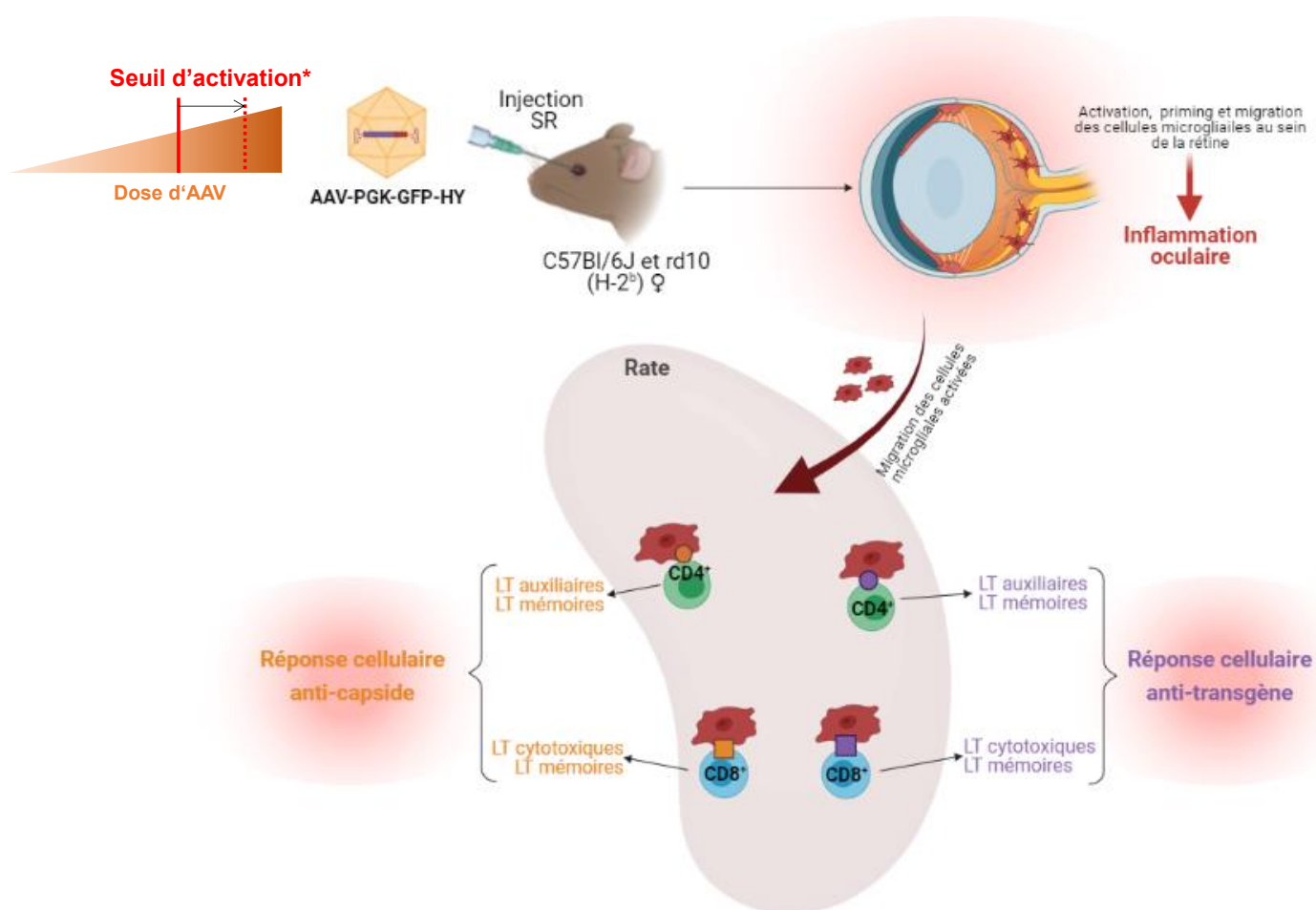


Figure 29 : Mise en place des réponses immunitaires cellulaires après un transfert de gène intraoculaire. Mise en place de réponses cellulaires anti-capside et anti-transgène après l'injection sous-rétinienne de différentes doses de vecteur AAV-PGK-GFP-HY (codant le peptide HY et la protéine GFP fusionnée le tout sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire PGK). La réponse immunitaire semble se déclencher uniquement lorsqu'un seuil minimum d'activation de la réponse inflammatoire est dépassé.

Ensuite, l'injection de doses moyennes et fortes d'AAV (2.10^9 et 5.10^{10} vg) induisent une réponse pro-inflammatoire anti-transgène en périphérie dans un modèle murin physiopathologique. On note que le contexte de dégénérescence rétinienne ainsi que le contexte immunologique spécifique n'induit pas de différence significative sur l'induction des réponses pro-inflammatoires anti-transgène comme nous pouvions l'imaginer.

Globalement, les résultats obtenus, en particulier avec les fortes doses de vecteurs, valident l'implication d'une réponse immunitaire anti-transgène dans la perte secondaire de la vision. Toutefois ceci n'exclue pas l'implication des autres hypothèses (i.e. la régulation génétique, mort programmée, effet *by stander*). Cependant déterminer la part d'implication de chaque facteur dans le déclenchement de la perte secondaire de la vue reste complexe.

Bien que les doses utilisées dans cette étude soient difficilement transposables aux doses utilisées chez l'Homme, les résultats indiquent qu'à partir d'une certaine dose d'AAV injectée en zone sous-rétinienne, un potentiel pro-inflammatoire peut se mettre en place et avoir des conséquences délétères. De plus, on peut noter qu'au fil des essais cliniques, l'une des stratégies pour augmenter l'expression du transgène et son efficacité était d'augmenter les doses d'AAV injectées tout en étant limité par le volume maximum injectable ce qui *in fine* pourrait être dangereux.

L'effet dose-réponse subséquent à l'injection d'AAV est observé au niveau systématique chez toutes les souris qui sont issues d'une lignée stabilisée, élevées dans des conditions contrôlées et sont soumises aux mêmes facteurs. Or chez l'homme, cela n'est pas le cas, c'est aléatoire, de nombreuses variables sont à prendre en compte comme la maladie et son état d'avancement, la dose injectée, la nature du vecteur, etc. Mais le facteur ayant le plus d'impact sur les réponses immunitaires est l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur non spécifique, celui-ci pourrait être à l'origine d'un effet de masquage puisqu'il induit une inhibition générale des réponses immunitaires

Ainsi, contrairement à ce qui était majoritairement avancé dans la littérature sur le sujet, des réponses inflammatoires peuvent être observées après injection sous-rétinienne d'AAV et possiblement avoir des conséquences néfastes sur le traitement, sur son efficacité mais aussi sur les capacités visuelles des patients. Ces réponses inflammatoires peuvent être masquées dans les essais cliniques par l'utilisation quasi-systématique d'immunosuppresseurs non spécifiques (Tableau 6). C'est pourquoi les caractéristiques immunologiques sont à prendre en considération dans les essais cliniques de phase I/II afin de tester la sécurité et la non-toxicité des vecteurs. Ensuite il apparaît aussi nécessaire d'établir un traitement immunosuppresseurs spécifique pour prévenir et inhiber les réponses immunitaires associées au transfert de gène.

Une autre approche pour mieux appréhender ces réponses immunitaires subséquentes à l'injection de vecteur est de mettre en place des traitement immuno-modulateurs spécifiques. C'est ce que nous avons développé en utilisant une stratégie se basant sur les propriétés immuno-modulatrice de l'œil, nommée ACAID et ou le SRAII. Nos principaux résultats ont montré que la co-injection de produit du transgène (peptide HY) et du vecteur permettait d'induire une inhibition de la réponse pro-inflammatoire anti-transgène de 39,97% et de 50,07% respectivement à deux doses de vecteurs ($2 \cdot 10^9$ vg et $5 \cdot 10^{10}$ vg) pour le modèle *wild*

type à J21. L'inhibition de la réponse pro-inflammatoire anti-transgène est observée dès 7 jours post-injection ainsi qu'à J14. Nous avons aussi mis en évidence que le SRAII fonctionne dans un modèle murin rd10, présentant un contexte immunologique local spécifique due à une dégénérescence rétinienne (Figure 28). En effet, on observe une inhibition de la réponse anti-transgène de 47,1 % et de 52,8% à 2.10^9 vg et 5.10^{10} vg respectivement. Bien que cette approche soit unique en son genre elle est prometteuse puisqu'elle s'apparente à ce qui a été fait dans le cadre de l'ACAID qui est bien caractérisé chez les modèles animaux. En effet, l'ACAID a été identifiée dans plusieurs modèles animaux tels que la souris et le rat et des mécanismes *ACAID-like* comme le VCAID chez le lapin (Sparrow et al. 1993; Streilein 1987; Jiang et Streilein 1991). Plusieurs éléments tels que la tolérance des greffes de cornée (85 à 90% sans rejet à 2 ans, peu d'immunosuppression) et l'induction d'une hypersensibilité retardée chez les patients atteints de nécrose rétinienne due au virus VZV (Virus Varicelle-Zona) (Kezuka et al. 2001) laisse à penser que le mécanisme de l'ACAID et du SRAII pourrait prendre place chez l'Homme. Ceci est prometteur puisque comparativement aux immunosuppresseurs classiques, cette approche a l'avantage d'être spécifique et donc de ne pas impacter l'immunité globale du patient. Ainsi si cette approche est reproductible, et que nous identifions un mécanisme de blocage (ou SRAII) alors il pourra être utilisé de façon systématique dans d'autres thérapies. En effet, la zone sous-rétinienne apparaît comme un site privilégié pour de nombreuses approches thérapeutiques, comme la thérapie cellulaire (Schwartz et al. 2015) et la thérapie génique (Campa et al. 2017). Aux vues de résultats préliminaires obtenus au laboratoire, il semble que le mécanisme du SRAII se mette en place dès 7 jours après la co-injection et soit maintenu jusqu'à 3 semaines (Vendomele et al. 2018a). L'aspect temporel est à explorer afin de mieux évaluer à partir de quand et combien de temps dure le phénomène pour pouvoir prédire son efficacité.

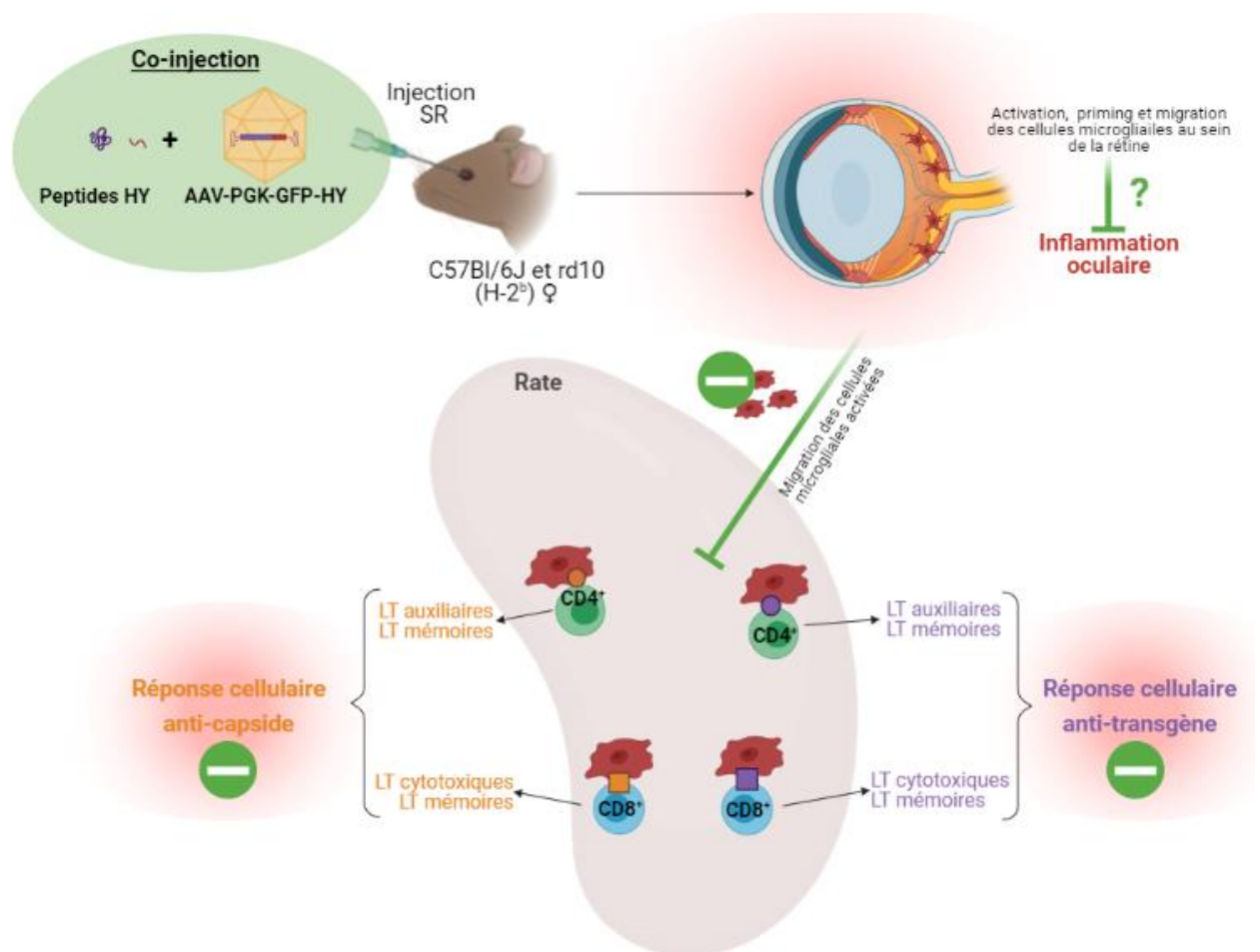
B

Figure 30 : Modulation des réponses immunitaires cellulaires après un transfert de gène intraoculaire. Inhibition des réponses cellulaires anti-capside et anti-transgène après la co-injection sous-rétinienne de peptides HY (peptide UTY et peptide DBY) et du vecteur AAV-PGK-GFP-HY HY (codant le peptide HY et la protéine GFP fusionnée le tout sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire PGK).

De plus des résultats préliminaires semble indiquer qu'un phénomène d'effet *bystander* se met en place (Al et Dh 2004). Celui-ci se caractérise par une inhibition des réponses pro-inflammatoires anti-transgène et anti-capside (par effet *bystander*) après la co-injection de peptide du transgène et le vecteur. Cet élément est très prometteur puisqu'il permettrait de remplacer les peptides du transgène par des peptides de la capside lors de la co-injection et toutefois induire une inhibition des réponses anti-capside et anti-transgène.

Globalement, les résultats obtenus pendant ma thèse ont permis de mettre à jour la dualité immunologique de l'œil, il est capable d'induire une immuno-modulation périphérique systémique (ACAID, SRAII) mais aussi une réponse pro-inflammatoire dans certains contextes. Cependant, il est important de garder à l'esprit que sont observations sont spécifiques aux modèles utilisés, en particulier aux modèles murins, à la nature de l'AAV et à la voie d'injection testée.

Tout d'abord, les expériences de ma thèse ont été réalisées sur des modèles murins : il s'agit donc d'un modèle *in vivo*, qui permet d'avoir une vue d'ensemble de l'organisme et prend en considération les interactions entre les différents organes. Cependant un modèle murin ne peut pas prédire totalement ce qui se passe chez l'Homme. Cela permet d'apporter des éléments de réponse ainsi que des pistes de réflexion quant aux propriétés immunitaires de la zone sous-rétinienne chez l'Homme.

Ensuite, les analyses immunologiques réalisées pendant ma thèse s'appuient sur un antigène modèle mâle HY injecté dans des souris femelles immunocompétentes. Ce transgène n'est pas thérapeutique, contrairement à ce qui est utilisé en clinique. Alors que les différentes mutations dans le génome des patients induisent l'absence de la protéine ou la synthèse d'une protéine tronquée et non fonctionnelle, le vecteur thérapeutique va apporter une version de la protéine complète, non tronquée, fonctionnelle ou nouvelle/étrangère comme dans le cas de l'optogénétique (Chaffiol et al. 2017; Ameline 2016; Khabou, Cordeau, et al. 2018b) et l'édition génique par CrisprCas9. Ceci signifie que l'immunogénicité du produit du transgène ne doit pas être négligée. C'est pourquoi pour compléter cette étude, nous envisageons d'étudier les réponses immunitaires après l'utilisation d'un vecteur thérapeutique.

Par ailleurs, au-delà du transgène utilisé, le choix du sérotype, du promoteur et de la dose sont important. En effet, nous utilisons un promoteur ubiquitaire (i.e. PGK) alors qu'actuellement les équipes tendent à utiliser des promoteurs spécifiques afin de mieux cibler les cellules et limiter l'impact sur les cellules voisines. De plus, il a été mis en évidence que les promoteurs ubiquitaires sont plus immunogène que les promoteurs photorécepteurs spécifiques (Khabou, Cordeau, et al. 2018b).

De plus, l'impact du sérotype de l'AAV serait intéressant à étudier. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus suggèrent une réponse humorale et cellulaire anti-capside. Ceci va dans le sens de la majorité des études en cours puisqu'elles révèlent l'induction d'une réponse humorale dans l'ensemble des modèles testés et dans les essais cliniques. Ensuite la dose est un facteur non négligeable puisque plus la dose est élevée plus le niveau de signaux de danger associé à celle-ci est élevé et susceptible de déclencher une inflammation.

Ensuite, mon étude a porté sur l'injection dans l'espace sous-rétinien mais il faudrait réaliser une étude comparative avec l'approche intra-vitréenne. En effet, les injections intra-vitréennes

font actuellement l'objet de beaucoup de travaux de recherche puisqu'elles ont l'avantage d'être moins invasives. Cependant, dans le contexte de la thérapie génique, il est nécessaire d'utiliser des AAV « ingénierés » pour qu'ils puissent traverser la membrane limitante interne et transduire efficacement la rétine profonde (Khabou et al. 2016).

De plus, plusieurs pistes semblent indiquer que la voie intra-vitréenne soit plus immunogène (neutralisation du vecteur par des anticorps préexistant lors d'une injection intra-vitréenne d'AAV (Kotterman et al. 2015a) ou l'induction d'une réponse humorale après injection intra-vitréenne d'AAV (Li et al. 2008a)). Il serait donc intéressant d'approfondir la comparaison d'une injection par voie sous-rétinienne ou par voie intra-vitréenne.

Par ailleurs, dans l'ensemble des essais, initialement seul l'œil le plus atteint est injecté pour une question de sécurité. En cas de complications, il est préférable que ce soit l'œil le plus détérioré qui soit abîmé et que le patient conserve son œil controlatéral plus fonctionnel. Toutefois, plusieurs essais ont effectué des injections dans l'œil controlatéral, en particulier l'essai de Albert M Maguire dans lequel 11 patients ont reçu une injection controlatérale 1 à 4 ans après la première injection (Bennett et al. 2016). Malgré des résultats d'immuno-monitorage montrant peu ou de faible réponse immunitaire, il est important de garder à l'esprit qu'une seconde injection sous-rétinienne d'AAV peut induire une réponse pro-inflammatoire et théoriquement la mise en place d'une mémoire immunitaire. C'est pourquoi, il serait utile de réaliser des études incluant des réinjections à différents points temps pour suivre une potentielle réactivation de cellules mémoires dans notre contexte.

Enfin, pour des raisons éthiques évidentes, dans les essais cliniques, les analyses d'immuno-monitorage sont réalisées à partir de prélèvements sanguin. Les résultats obtenus lors ma thèse ont été obtenus majoritairement à partir de cellules spléniques, ce qui permet d'avoir une idée plus précise des réponses immunitaires que sur un prélèvement sanguin. Ceci laisse à penser que des réponses immunitaires restent masquées, en particulier si elles sont infra-cliniques. Les réponses sont présentes mais ne sont pas détectées dans le sang des patients.

C'est pourquoi la mise en évidence de biomarqueurs d'une réponse inflammatoire infra-clinique facilement accessibles, rapide et transposable chez l'Homme serait un outil de diagnostic idéal. Il existe plusieurs pistes développées au laboratoire, comme l'étude des miARN sériques issus de souris pro-inflammatoires ou immuno-modulées. Ce travail a mis à

jour des candidats (miR142a-3p, miR101b-3p, miR-328-3p) et nous souhaitons maintenant les tester par RT-qPCR sur des sérums de souris ayant reçu les peptides UTY et DBY ou les différentes doses d'AAV en sous-rétinien. Ensuite au cours de ma thèse, j'ai collaboré avec Knight Scientific afin de développer leur technique de détection des espèces réactives à l'oxygène extracellulaires produites lors du *burst* oxydatif des réponses immunitaires dans plusieurs modèles murins. Cette production massive de ROS pourrait à terme servir de biomarqueur de l'inflammation. Si les résultats s'avèrent concluants, l'idée serait de les tester chez l'Homme afin de prédire et donc contrôler les réponses immunitaires dans le cadre des essais cliniques de thérapie génique oculaire par AAV.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Tout au long de ce travail de thèse, j'ai pu appréhender la double facette immunologique de la zone sous-rétinienne. Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence que l'injection sous-rétinienne de doses fortes et moyennes d'AAV8 (10^{10} et 2.10^9 vg) codant pour UTY et DBY induit une réponse pro-inflammatoire systémique dans un modèle murin sauvage et pathophysiologique. La co-injection des peptides antigéniques mâles UTY et DBY avec des doses de vecteurs rAAV induisent une inhibition périphérique des réponses lymphocytaires T spécifiques de ces peptides. Ce mécanisme d'immuno-modulation se nomme le SRAII, pour *SubRetinal-Associated Immune Inhibition*. Globalement, les résultats de ma thèse ont mis en avant la capacité immuno-modulatrice de la zone sous-rétinienne tout en soulignant ses limites. Des expériences préliminaires ont montré une altération de la structure rétinienne après l'injection de fortes doses d'AAV en zone sous-rétinienne, ainsi qu'une activation des cellules microgliales rétiniennes. C'est pourquoi l'étude des conséquences locales doit être explorée plus en détail, afin de déterminer les facteurs influençant l'induction d'une réponse immunitaire délétère à forte dose : signaux de danger ? Expression trop importante du transgène ? De plus, aux vues des résultats obtenus dans le modèle murin de dégénérescence rétinienne, il apparaît nécessaire de se rapprocher du contexte clinique. Tout d'abord, il faut tester un vecteur thérapeutiques, l'impact de la ré-administration sur la réponse immunitaire anti-transgène. Mais aussi explorer les réponses anti-capsides, l'ensemble des réponses immunitaires associées à un transfert de gène intraoculaire se doit d'être étudié afin de présenter un immuno-monitorage complet pour la prise en charge des patients dans les essais cliniques de thérapie génique oculaire par rAAV (mise en évidence de biomarqueurs de l'inflammation). Enfin l'impact de la stratégie d'immunosuppresseurs basée sur le SRAII *via* la co-injection avec des peptides immuno-dominants du produit du transgène avec une dose de vecteur rAAV doit être approfondie. Cette technique, d'un point de vue translationnel chez l'homme, permet d'espérer une immuno-modulation antigène spécifique dans des contextes de transfert de gène par AAV. Il pourrait aussi apporter des pistes d'induction de tolérance dans des contextes plus larges tels que le transfert de gène systémique.

BIBLIOGRAPHIE

- Acland G. M., G. D. Aguirre, J. Ray, Q. Zhang, T. S. Aleman, A. V. Cideciyan, S. E. Pearce-Kelling, et al. 2001. « Gene Therapy Restores Vision in a Canine Model of Childhood Blindness ». *Nature Genetics* 28 (1): 92-95. <https://doi.org/10.1038/88327>.
- Acland Gregory M., Gustavo D. Aguirre, Jean Bennett, Tomas S. Aleman, Artur V. Cideciyan, Jeannette Bennicelli, Nadine S. Dejneka, et al. 2005. « Long-Term Restoration of Rod and Cone Vision by Single Dose rAAV-Mediated Gene Transfer to the Retina in a Canine Model of Childhood Blindness ». *Molecular Therapy* 12 (6): 1072-82. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.08.008>.
- Al Mellor, et Munn Dh. 2004. « IDO Expression by Dendritic Cells: Tolerance and Tryptophan Catabolism ». *Nature Reviews. Immunology* 4 (10). <https://doi.org/10.1038/nri1457>.
- Ali Robin R., Martin B. Reichel, Adrian J. Thrasher, Roland J. Levinsky, Christine Kinnon, Naheed Kanuga, David M. Hunt, et Shomi S. Bhattacharya. 1996. « Gene Transfer into the Mouse Retina Mediated by an Adeno-Associated Viral Vector ». *Human Molecular Genetics* 5 (5): 591-94. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.5.591>.
- Allocca Mariacarmela, Claudio Mussolino, Maria Garcia-Hoyos, Daniela Sanges, Carolina Iodice, Marco Petrillo, Luk H. Vandenberghe, et al. 2007. « Novel Adeno-Associated Virus Serotypes Efficiently Transduce Murine Photoreceptors ». *Journal of Virology* 81 (20): 11372-80. <https://doi.org/10.1128/JVI.01327-07>.
- Amado Defne, Federico Mingozzi, Daniel Hui, Jeannette L. Bennicelli, Zhangyong Wei, Yifeng Chen, Erin Bote, et al. 2010. « Safety and Efficacy of Subretinal Readministration of a Viral Vector in Large Animals to Treat Congenital Blindness ». *Science Translational Medicine* 2 (21): 21ra16. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000659>.
- Ambroziak Anna M., Jerzy Szaflik, Jacek P. Szaflik, Maciej Ambroziak, Jan Witkiewicz, et Piotr Skopiński. 2016. « Immunomodulation on the Ocular Surface: A Review ». *Central-European Journal of Immunology* 41 (2): 195-208. <https://doi.org/10.5114/ceji.2016.60995>.
- Ameline Baptiste. 2016. *Evaluation du transfert d'optogènes pour le traitement par thérapie génique d'un modèle canin de dystrophies rétiniennes héréditaires*. Nantes. <http://www.theses.fr/2016NANT1001>.
- Ashtari Manzar, Laura L. Cyckowski, Justin F. Monroe, Kathleen A. Marshall, Daniel C. Chung, Alberto Auricchio, Francesca Simonelli, et al. 2011. « The Human Visual Cortex Responds to Gene Therapy-Mediated Recovery of Retinal Function ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (6): 2160-68. <https://doi.org/10.1172/JCI57377>.
- Auricchio A., G. Kobinger, V. Anand, M. Hildinger, E. O'Connor, A. M. Maguire, J. M. Wilson, et J. Bennett. 2001. « Exchange of Surface Proteins Impacts on Viral Vector Cellular Specificity and Transduction Characteristics: The Retina as a Model ». *Human Molecular Genetics* 10 (26): 3075-81.
- Bainbridge James W. B., Alexander J. Smith, Susie S. Barker, Scott Robbie, Robert Henderson, Kamaljit Balaggan, Ananth Viswanathan, et al. 2008. « Effect of Gene Therapy on Visual Function in Leber's Congenital Amaurosis ». *The New England Journal of Medicine* 358 (21): 2231-39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802268>.
- Bainbridge James W.B., Manjit S. Mehat, Venki Sundaram, Scott J. Robbie, Susie E. Barker, Caterina Ripamonti, Anastasios Georgiadis, et al. 2015a. « Long-Term Effect of Gene Therapy on Leber's Congenital Amaurosis ». *New England Journal of Medicine* 372 (20): 1887-97. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414221>.
- Bainbridge James W.B., 2015b. « Long-Term Effect of Gene Therapy on Leber's Congenital Amaurosis ». *New England Journal of Medicine* 372 (20): 1887-97. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414221>.
- Barber Amanda C., Claire Hippert, Yanai Duran, Emma L. West, James W. B. Bainbridge, Katherine Warre-Cornish, Ulrich F. O. Luhmann, et al. 2013. « Repair of the Degenerate Retina by Photoreceptor Transplantation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (1): 354-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212677110>.
- Basner-Tschakarjan Etiena, et Federico Mingozzi. 2014. « Cell-Mediated Immunity to AAV Vectors, Evolving Concepts and Potential Solutions ». *Frontiers in Immunology* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00350>.

- Ben M'Barek Karim, Walter Habeler, Olivier Goureau, et Christelle Monville. 2018. « Traitement des dystrophies rétinienues affectant l'épithélium pigmentaire par ingénierie tissulaire fondée sur les cellules souches embryonnaires humaines ». *médecine/sciences* 34 (5): 383-86. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183405004>.
- Ben M'Barek Karim, Florian Regent, et Christelle Monville. 2015. « Use of human pluripotent stem cells to study and treat retinopathies ». *World Journal of Stem Cells* 7 (3): 596-604. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i3.596>.
- Bennett Jean, Jennifer Wellman, Kathleen A Marshall, Sarah McCague, Manzar Ashtari, Julie DiStefano-Pappas, Okan U Elci, et al. 2016. « Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial ». *The Lancet* 388 (10045): 661-72. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30371-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30371-3).
- Berson E. L., B. Rosner, M. A. Sandberg, K. C. Hayes, B. W. Nicholson, C. Weigel-DiFranco, et W. Willett. 1993. « A Randomized Trial of Vitamin A and Vitamin E Supplementation for Retinitis Pigmentosa ». *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)* 111 (6): 761-72. <https://doi.org/10.1001/archoph.1993.01090060049022>.
- Berson Eliot L., Bernard Rosner, Michael A. Sandberg, Carol Weigel-DiFranco, Ann Moser, Robert J. Brockhurst, K. C. Hayes, et al. 2004. « Clinical Trial of Docosahexaenoic Acid in Patients with Retinitis Pigmentosa Receiving Vitamin A Treatment ». *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)* 122 (9): 1297-1305. <https://doi.org/10.1001/archoph.122.9.1297>.
- Bessis Alain, Catherine Béchade, Delphine Bernard, et Anne Roumier. 2007. « Microglial Control of Neuronal Death and Synaptic Properties ». *Glia* 55 (3): 233-38. <https://doi.org/10.1002/glia.20459>.
- Bevan M. J. 1976. « Cross-Priming for a Secondary Cytotoxic Response to Minor H Antigens with H-2 Congenic Cells Which Do Not Cross-React in the Cytotoxic Assay ». *The Journal of Experimental Medicine* 143 (5): 1283-88. <https://doi.org/10.1084/jem.143.5.1283>.
- Botto Catherine, Marco Rucli, Müge Defne Tekinsoy, Juliette Pulman, José-Alain Sahel, et Deniz Dalkara. 2021. « Early and Late Stage Gene Therapy Interventions for Inherited Retinal Degenerations ». *Progress in Retinal and Eye Research*, mai, 100975. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100975>.
- Brantly Mark L., Jeffrey D. Chulay, Lili Wang, Christian Mueller, Margaret Humphries, L. Terry Spencer, Farshid Rouhani, et al. 2009. « Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (38): 16363-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904514106>.
- Breuer Debra K., Beverly M. Yashar, Elena Filippova, Suja Hiriyanna, Robert H. Lyons, Alan J. Mears, Bersabell Asaye, et al. 2002. « A Comprehensive Mutation Analysis of RP2 and RPGR in a North American Cohort of Families with X-Linked Retinitis Pigmentosa ». *American Journal of Human Genetics* 70 (6): 1545-54. <https://doi.org/10.1086/340848>.
- Broderick Cathryn, Robert M. Hoek, John V. Forrester, Janet Liversidge, Jonathon D. Sedgwick, et Andrew D. Dick. 2002. « Constitutive Retinal CD200 Expression Regulates Resident Microglia and Activation State of Inflammatory Cells during Experimental Autoimmune Uveoretinitis ». *The American Journal of Pathology* 161 (5): 1669-77. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64444-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64444-6).
- Buck Thilo, et Jan Wijnholds. 2020. « Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors (RAAV)-Vector Elements in Ocular Gene Therapy Clinical Trials and Transgene Expression and Bioactivity Assays ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (12): 4197. <https://doi.org/10.3390/ijms21124197>.
- Calcedo Roberto, Suryanarayan Somanathan, Qiuyue Qin, Michael R. Betts, Andrew J. Rech, Robert H. Vonderheide, Christian Mueller, Terence R. Flotte, et James M. Wilson. 2017. « Class I-Restricted T-Cell Responses to a Polymorphic Peptide in a Gene Therapy Clinical Trial for α -1-Antitrypsin Deficiency ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (7): 1655-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617726114>.

- Campa C., C. E. Gallenga, E. Bolletta, et P. Perri. 2017. « The Role of Gene Therapy in the Treatment of Retinal Diseases: A Review ». *Current Gene Therapy* 17 (3): 194-213. <https://doi.org/10.2174/1566523217666171116170040>.
- Caspi Rachel R. 2011. « Understanding Autoimmune Uveitis through Animal Models The Friedenwald Lecture ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (3): 1873. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6909>.
- Chaffiol Antoine, Romain Caplette, Céline Jaillard, Elena Brazhnikova, Mélissa Desrosiers, Elisabeth Dubus, Laëtitia Duhamel, et al. 2017. « A New Promoter Allows Optogenetic Vision Restoration with Enhanced Sensitivity in Macaque Retina ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (11): 2546-60. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.07.011>.
- Chan Nicole Shu-Wen, Soon-Phaik Chee, Laure Caspers, et Bahram Bodaghi. 2017. « Review for Disease of the Year: Clinic of Cytomegalovirus-Induced Anterior Uveitis ». *Ocular Immunology and Inflammation*, novembre, 1-9. <https://doi.org/10.1080/09273948.2017.1394471>.
- Chandler Laurel C., Michelle E. McClements, Imran H. Yusuf, Cristina Martinez-Fernandez de la Camara, Robert E. MacLaren, et Kanmin Xue. 2021. « Characterizing the Cellular Immune Response to Subretinal AAV Gene Therapy in the Murine Retina ». *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 22 (septembre): 52-65. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.05.011>.
- Chang B., N. L. Hawes, R. E. Hurd, M. T. Davisson, S. Nusinowitz, et J. R. Heckenlively. 2002. « Retinal Degeneration Mutants in the Mouse ». *Vision Research* 42 (4): 517-25. [https://doi.org/10.1016/s0042-6989\(01\)00146-8](https://doi.org/10.1016/s0042-6989(01)00146-8).
- Chapot Camille A., Thomas Euler, et Timm Schubert. 2017. « How Do Horizontal Cells “Talk” to Cone Photoreceptors? Different Levels of Complexity at the Cone-Horizontal Cell Synapse ». *The Journal of Physiology*, avril. <https://doi.org/10.1113/JP274177>.
- Charlesworth Carsten T., Joab Camarena, M. Kyle Cromer, Sriram Vaidyanathan, Rasmus O. Bak, Jason M. Carte, Jason Potter, Daniel P. Dever, et Matthew H. Porteus. 2018. « Priming Human Repopulating Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for Cas9/SgRNA Gene Targeting ». *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 12 (septembre): 89-104. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.04.017>.
- Chinnery Holly R., Paul G. McMenamin, et Samantha J. Dando. 2017. « Macrophage Physiology in the Eye ». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 469 (3-4): 501-15. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1947-5>.
- Cideciyan Artur V., William W. Hauswirth, Tomas S. Aleman, Shalesh Kaushal, Sharon B. Schwartz, Sanford L. Boye, Elizabeth A.M. Windsor, et al. 2009. « Human RPE65 Gene Therapy for Leber Congenital Amaurosis: Persistence of Early Visual Improvements and Safety at 1 Year ». *Human Gene Therapy* 20 (9): 999-1004. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.086>.
- Cideciyan Artur V., Samuel G. Jacobson, William A. Beltran, Alexander Sumaroka, Malgorzata Swider, Simone Iwabe, Alejandro J. Roman, et al. 2013. « Human Retinal Gene Therapy for Leber Congenital Amaurosis Shows Advancing Retinal Degeneration despite Enduring Visual Improvement ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (6): E517-25. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218933110>.
- Coca-Prados Miguel. 2014. « The Blood-Aqueous Barrier in Health and Disease ». *Journal of Glaucoma* 23 (8 Suppl 1): S36-38. <https://doi.org/10.1097/IJG.000000000000107>.
- Coenen-Stass Anna M. L., Matthew J. A. Wood, et Thomas C. Roberts. 2017. « Biomarker Potential of Extracellular MiRNAs in Duchenne Muscular Dystrophy ». *Trends in Molecular Medicine* 23 (11): 989-1001. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.09.002>.
- Cone Robert E., Subhasis Chattopadhyay, Roshan Pais, Sourojit Bhowmick, Roshanak Sharafieh, Yen Lemire, et James O'Rourke. 2010. « The Induction of Circulating, ACAID-Inducing Monocytes Requires CCR2/CCL2-Dependent Migration of Circulating F4/80(+) Cells into the Anterior Chamber ». *Ophthalmology and Eye Diseases* 2: 57-68. <https://doi.org/10.4137/OED.S6113>.

- Cosette Jeremie, Rym Ben Abdelwahed, Sabrina Donnou-Triffault, Catherine Sautès-Fridman, Patrice Flaud, et Sylvain Fisson. 2016. « Bioluminescence-Based Tumor Quantification Method for Monitoring Tumor Progression and Treatment Effects in Mouse Lymphoma Models ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 113 (juillet). <https://doi.org/10.3791/53609>.
- Cunha-Vaz, J. 1979. « The Blood-Ocular Barriers ». *Survey of Ophthalmology* 23 (5): 279-96.
- Dalkara Deniz, Leah C. Byrne, Ryan R. Klimczak, Meike Visel, Lu Yin, William H. Merigan, John G. Flannery, et David V. Schaffer. 2013. « In Vivo-Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous ». *Science Translational Medicine* 5 (189): 189ra76-189ra76. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005708>.
- Damani Mausam R., Lian Zhao, Aurora M. Fontainhas, Juan Amaral, Robert N. Fariss, et Wai T. Wong. 2011. « Age-Related Alterations in the Dynamic Behavior of Microglia ». *Aging Cell* 10 (2): 263-76. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00660.x>.
- Daya Shyam, et Kenneth I. Berns. 2008. « Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors ». *Clinical Microbiology Reviews* 21 (4): 583-93. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-08>.
- Denniston Alastair K., et Pearse A. Keane. 2015. « Paravascular Pathways in the Eye: Is There an “Ocular Glymphatic System”? ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56 (6): 3955-56. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17243>.
- Deyle David R, et David W Russell. 2009. « Adeno-associated virus vector integration ». *Current opinion in molecular therapeutics* 11 (4): 442-47.
- DiCarlo James E., Vinit B. Mahajan, et Stephen H. Tsang. 2018. « Gene Therapy and Genome Surgery in the Retina ». *The Journal of Clinical Investigation* 128 (6): 2177-88. <https://doi.org/10.1172/JCI120429>.
- D’Orazio T. J., et J. Y. Niederkorn. 1998. « A Novel Role for TGF-Beta and IL-10 in the Induction of Immune Privilege ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160 (5): 2089-98.
- Doshi Rishi R., Sophie J. Bakri, et Anne E. Fung. 2011. « Intravitreal Injection Technique ». *Seminars in Ophthalmology* 26 (3): 104-13. <https://doi.org/10.3109/08820538.2010.541318>.
- Duebel Jens, Katia Marazova, et José-Alain Sahel. 2015. « Optogenetics ». *Current Opinion in Ophthalmology* 26 (3): 226-32. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000140>.
- Duncan Jacque L., Eric A. Pierce, Amy M. Laster, Stephen P. Daiger, David G. Birch, John D. Ash, Alessandro Iannaccone, et al. 2018. « Inherited Retinal Degenerations: Current Landscape and Knowledge Gaps ». *Translational Vision Science & Technology* 7 (4): 6-6. <https://doi.org/10.1167/tvst.7.4.6>.
- Dupont Jean-Baptiste, Benoit Tournaire, Christophe Georger, Béatrice Marolleau, Laurence Jeanson-Leh, Mireille Ledevin, Pierre Lindenbaum, et al. 2015. « Short-Lived Recombinant Adeno-Associated Virus Transgene Expression in Dystrophic Muscle Is Associated with Oxidative Damage to Transgene MRNA ». *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 2: 15010. <https://doi.org/10.1038/mtm.2015.10>.
- Edwards Thomas L., Charles L. Cottrill, Kanmin Xue, Matthew P. Simunovic, James D. Ramsden, Eberhart Zrenner, et Robert E. MacLaren. 2018. « Assessment of the Electronic Retinal Implant Alpha AMS in Restoring Vision to Blind Patients with End-Stage Retinitis Pigmentosa ». *Ophthalmology* 125 (3): 432-43. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.09.019>.
- Ernst Martijn P. T., Mike Broeders, Pablo Herrero-Hernandez, Esmee Oussoren, Ans T. van der Ploeg, et W. W. M. Pim Pijnappel. 2020. « Ready for Repair? Gene Editing Enters the Clinic for the Treatment of Human Disease ». *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 18 (septembre): 532-57. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.06.022>.
- Errera Marie-Hélène, Solène Coisy, Christine Fardeau, José-Alain Sahel, Sofiene Kallel, Mark Westcott, Bahram Bodaghi, et Michel Paques. 2014. « Retinal Vasculitis Imaging by Adaptive Optics ». *Ophthalmology* 121 (6): 1311-1312.e2. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.12.036>.
- Farsaii Mahnoosh, et Victoria P. Connaughton. 1995. « All Amacrine Cells ». In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, édité par Helga Kolb, Eduardo Fernandez, et Ralph Nelson. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11548/>.

- Ferreira Valerie, Jaap Twisk, Karin Kwinkkers, Eleonora Aronica, Diane Brisson, Julie Methot, Harald Petry, et Daniel Gaudet. 2014. « Immune Responses to Intramuscular Administration of Alipogene Tiparvovec (AAV1-LPL(S447X)) in a Phase II Clinical Trial of Lipoprotein Lipase Deficiency Gene Therapy ». *Human Gene Therapy* 25 (3): 180-88. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.169>.
- Feuer William J., Joyce C. Schiffman, Janet L. Davis, Vittorio Porciatti, Phillip Gonzalez, Rajeshwari D. Koilkonda, Huijun Yuan, Anil Lalwani, Byron L. Lam, et John Guy. 2016. « Gene Therapy for Leber Hereditary Optic Neuropathy: Initial Results ». *Ophthalmology* 123 (3): 558-70. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2015.10.025>.
- Fisson Sylvain, et Julie Vandomèle. 2017. « Bases fondamentales immunologiques ». In *Uvéite*, 2nd éd. Elsevier-Masson.
- Gomes Marleide da Mota. 2019. « Franz Nissl (1860-1919), Noted Neuropsychiatrist and Neuropathologist, Staining the Neuron, but Not Limiting It ». *Dementia & Neuropsychologia* 13 (3): 352-55. <https://doi.org/10.1590/1980-57642018dn13-030014>.
- Grégoire Sylvie, Céline Terrada, Gaëlle H. Martin, Gwladys Fourcade, Audrey Baeyens, Gilles Marodon, Sylvain Fisson, et al. 2016. « Treatment of Uveitis by In Situ Administration of Ex Vivo-Activated Polyclonal Regulatory T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 196 (5): 2109-18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501723>.
- Gross David-Alexandre, Pascal Chappert, Marylene Leboeuf, Virginie Monteilhet, Laetitia Van Wittenberghe, Olivier Danos, et Jean Davoust. 2006. « Simple Conditioning with Monospecific CD4+CD25+ Regulatory T Cells for Bone Marrow Engraftment and Tolerance to Multiple Gene Products ». *Blood* 108 (6): 1841-48. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-011981>.
- Gu Hongjing, Yaqian Gao, Shanshan Zhou, Fang Sun, Zhongpeng Zhao, Keyu Wang, Lingna Zhao, et al. 2018. « Bivalent Vaccine Platform Based on ca Influenza Virus Vaccine Elicits Protective Immunity against Human Adenoviruses ». *Antiviral Research*, mars. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.02.018>.
- Guignier B., K. Bourahla, V. Bekaert, D. Brasse, D. Gaucher, C. Speeg-Schatz, et T. Bourcier. 2013. « [Scintigraphic study of the lymphatic drainage of the anterior chamber of the mouse eye and its pathophysiological implications] ». *Journal Francais D'ophtalmologie* 36 (10): 836-42. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2012.11.021>.
- Guo Haitao, Justin B Callaway, et Jenny P-Y Ting. 2015. « Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics ». *Nature Medicine* 21 (7): 677-87. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>.
- Hamon Annaïg, Jérôme E. Roger, Xian-Jie Yang, et Muriel Perron. 2016. « Müller Glial Cell-Dependent Regeneration of the Neural Retina: An Overview across Vertebrate Model Systems ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 245 (7): 727-38. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24375>.
- Hauswirth William W., Tomas S. Aleman, Shalesh Kaushal, Artur V. Cideciyan, Sharon B. Schwartz, Lili Wang, Thomas J. Conlon, et al. 2008a. « Treatment of Leber Congenital Amaurosis Due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results of a Phase I Trial ». *Human Gene Therapy* 19 (10): 979-90. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.107>.
- Hauswirth William W., 2008b. « Treatment of Leber Congenital Amaurosis Due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results of a Phase I Trial ». *Human Gene Therapy* 19 (10): 979-90. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.107>.
- Heath William R., et Francis R. Carbone. 2001. « Cross-Presentation in Viral Immunity and Self-Tolerance ». *Nature Reviews Immunology* 1 (2): 126-34. <https://doi.org/10.1038/35100512>.
- Herzog Roland W. 2017. « Complexity of Immune Responses to AAV Transgene Products – Example of Factor IX ». *Cellular Immunology*, mai. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.05.006>.
- Hoek R. M., S. R. Ruuls, C. A. Murphy, G. J. Wright, R. Goddard, S. M. Zurawski, B. Blom, et al. 2000. « Down-Regulation of the Macrophage Lineage through Interaction with OX2 (CD200) ». *Science (New York, N.Y.)* 290 (5497): 1768-71. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1768>.

- Hong Sujeong, Sangjun Park, et Je-Wook Yu. 2011. « Pysin Domain (PYD)-containing Inflammasome in Innate Immunity ». *Journal of Bacteriology and Virology* 41 (3): 133-46. <https://doi.org/10.4167/jbv.2011.41.3.133>.
- Hu Jun, Min Kong, Yuanzhen Ye, Siqi Hong, Li Cheng, et Li Jiang. 2014. « Serum MiR-206 and Other Muscle-Specific MicroRNAs as Non-Invasive Biomarkers for Duchenne Muscular Dystrophy ». *Journal of Neurochemistry* 129 (5): 877-83. <https://doi.org/10.1111/jnc.12662>.
- Jacobson Samuel G., Gregory M. Acland, Gustavo D. Aguirre, Tomas S. Aleman, Sharon B. Schwartz, Artur V. Cideciyan, Caroline J. Zeiss, et al. 2006. « Safety of Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2-RPE65 Vector Delivered by Ocular Subretinal Injection ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 13 (6): 1074-84. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.03.005>.
- Jacobson Samuel G., Sanford L. Boye, Tomas S. Aleman, Thomas J. Conlon, Caroline J. Zeiss, Alejandro J. Roman, Artur V. Cideciyan, et al. 2006. « Safety in Nonhuman Primates of Ocular AAV2-RPE65, a Candidate Treatment for Blindness in Leber Congenital Amaurosis ». *Human Gene Therapy* 17 (8): 845-58. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.17.845>.
- Jacobson Samuel G., Artur V. Cideciyan, Alejandro J. Roman, Alexander Sumaroka, Sharon B. Schwartz, Elise Heon, et William W. Hauswirth. 2015a. « Improvement and Decline in Vision with Gene Therapy in Childhood Blindness ». *New England Journal of Medicine* 372 (20): 1920-26. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412965>.
- Jacobson Samuel G., 2015b. « Improvement and Decline in Vision with Gene Therapy in Childhood Blindness ». *New England Journal of Medicine* 372 (20): 1920-26. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412965>.
- Jiang L. Q., et J. W. Streilein. 1991. « Immune Privilege Extended to Allogeneic Tumor Cells in the Vitreous Cavity ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 32 (1): 224-28.
- Joussemet Béatrice, Brahim Belbellaa, Alexandra Mendes-Madeira, Thomas Bucher, Delphine Briot-Nivard, Laurence Dubreil, Marie-Anne Colle, Yan Cherel, Philippe Moullier, et Fabienne Rolling. 2011. « Neonatal Systemic Delivery of ScAAV9 in Rodents and Large Animals Results in Gene Transfer to RPE Cells in the Retina ». *Experimental Eye Research* 93 (4): 491-502. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.06.012>.
- Karlstetter Marcus, Stefanie Ebert, et Thomas Langmann. 2010. « Microglia in the Healthy and Degenerating Retina: Insights from Novel Mouse Models ». *Immunobiology* 215 (9-10): 685-91. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.010>.
- Kashiwakura Yuji, Kenji Tamayose, Kazuhisa Iwabuchi, Yukihiko Hirai, Takashi Shimada, Kunio Matsumoto, Toshikazu Nakamura, Masami Watanabe, Kazuo Oshimi, et Hiroyuki Daida. 2005. « Hepatocyte Growth Factor Receptor Is a Coreceptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Infection ». *Journal of Virology* 79 (1): 609-14. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.609-614.2005>.
- Kawai Taro, et Shizuo Akira. 2007. « Antiviral Signaling through Pattern Recognition Receptors ». *Journal of Biochemistry* 141 (2): 137-45. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm032>.
- Kettenmann Helmut, Uwe-Karsten Hanisch, Mami Noda, et Alexei Verkhratsky. 2011. « Physiology of Microglia ». *Physiological Reviews* 91 (2): 461-553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>.
- Kezuka T., J. Sakai, N. Usui, J. W. Streilein, et M. Usui. 2001. « Evidence for Antigen-Specific Immune Deviation in Patients with Acute Retinal Necrosis ». *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)* 119 (7): 1044-49. <https://doi.org/10.1001/archophth.119.7.1044>.
- Khabou Hanen, Chloé Cordeau, Laure Pacot, Sylvain Fisson, et Deniz Dalkara. 2018a. « Dosage Thresholds and Influence of Transgene Cassette in AAV-Related Toxicity ». *Human Gene Therapy*, août. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.144>.
- Khabou Hanen, 2018b. « Dosage Thresholds and Influence of Transgene Cassette in AAV-Related Toxicity ». *Human Gene Therapy*, août. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.144>.
- Khabou Hanen, et Deniz Dalkara. 2015. « La conception de vecteurs adaptés à la thérapie génique oculaire ». *médecine/sciences* 31 (5): 529-37. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153105015>.
- Khabou Hanen, Mélissa Desrosiers, Céline Winckler, Stéphane Fouquet, Gwenaëlle Auregan, Alexis-Pierre Bemelmans, José-Alain Sahel, et Deniz Dalkara. 2016. « Insight into the Mechanisms of

- Enhanced Retinal Transduction by the Engineered AAV2 Capsid Variant -7m8 ». *Biotechnology and Bioengineering* 113 (12): 2712-24. <https://doi.org/10.1002/bit.26031>.
- Khabou Hanen, Marcela Garita-Hernandez, Antoine Chaffiol, Sacha Reichman, Céline Jaillard, Elena Brazhnikova, Stéphane Bertin, et al. 2018. « Noninvasive Gene Delivery to Foveal Cones for Vision Restoration ». *JCI Insight* 3 (2): 96029. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96029>.
- Klimczak Ryan R., James T. Koerber, Deniz Dalkara, John G. Flannery, et David V. Schaffer. 2009. « A Novel Adeno-Associated Viral Variant for Efficient and Selective Intravitreal Transduction of Rat Müller Cells ». *PloS One* 4 (10): e7467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007467>.
- Kotterman M. A., L. Yin, J. M. Strazzeri, J. G. Flannery, W. H. Merigan, et D. V. Schaffer. 2015a. « Antibody Neutralization Poses a Barrier to Intravitreal Adeno-Associated Viral Vector Gene Delivery to Non-Human Primates ». *Gene Therapy* 22 (2): 116-26. <https://doi.org/10.1038/gt.2014.115>.
- Kotterman M. A., 2015b. « Antibody Neutralization Poses a Barrier to Intravitreal Adeno-Associated Viral Vector Gene Delivery to Non-Human Primates ». *Gene Therapy* 22 (2): 116-26. <https://doi.org/10.1038/gt.2014.115>.
- Kurniawan Emil D., John R. Rocke, Sukhpal S. Sandhu, et Penelope J. Allen. 2017. « Predictors of Visual Outcome and the Role of Early Vitrectomy in Streptococcal Endophthalmitis ». *Clinical & Experimental Ophthalmology*, septembre. <https://doi.org/10.1111/ceo.13077>.
- Lamkanfi Mohamed, et Vishva M. Dixit. 2014. « Mechanisms and Functions of Inflammasomes ». *Cell* 157 (5): 1013-22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.007>.
- Le Meur G., K. Stieger, A. J. Smith, M. Weber, J. Y. Deschamps, D. Nivard, A. Mendes-Madeira, et al. 2007. « Restoration of Vision in RPE65-Deficient Briard Dogs Using an AAV Serotype 4 Vector That Specifically Targets the Retinal Pigmented Epithelium ». *Gene Therapy* 14 (4): 292-303. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302861>.
- Le Meur Guylène, Pierre Lebranchu, Fanny Billaud, Oumeya Adjali, Sébastien Schmitt, Stéphane Béziau, Yann Péréon, et al. 2017. « Safety and Long-Term Efficacy of AAV4 Gene Therapy in Patients with RPE65 Leber Congenital Amaurosis ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, septembre. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.09.014>.
- Lebherz Corinna, Albert Maguire, Waixing Tang, Jean Bennett, et James M. Wilson. 2008a. « Novel AAV Serotypes for Improved Ocular Gene Transfer ». *The Journal of Gene Medicine* 10 (4): 375-82. <https://doi.org/10.1002/jgm.1126>.
- Lebherz Corinna, 2008b. « Novel AAV Serotypes for Improved Ocular Gene Transfer ». *The Journal of Gene Medicine* 10 (4): 375-82. <https://doi.org/10.1002/jgm.1126>.
- Leborgne Christian, Elena Barbon, Jeffrey M. Alexander, Hayley Hanby, Sandrine Delignat, Daniel M. Cohen, Fanny Collaud, et al. 2020. « IgG-Cleaving Endopeptidase Enables in Vivo Gene Therapy in the Presence of Anti-AAV Neutralizing Antibodies ». *Nature Medicine* 26 (7): 1096-1101. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0911-7>.
- Lee Sun Young, Shinichi Usui, Abu-Bakr Zafar, Brian C. Oveson, Young-Joon Jo, Lili Lu, Solmaz Masoudi, et Peter A. Campochiaro. 2011. « N-Acetylcysteine Promotes Long-Term Survival of Cones in a Model of Retinitis Pigmentosa ». *Journal of Cellular Physiology* 226 (7): 1843-49. <https://doi.org/10.1002/jcp.22508>.
- Léveillard Thierry, et José-Alain Sahel. 2010. « Rod-Derived Cone Viability Factor for Treating Blinding Diseases: From Clinic to Redox Signaling ». *Science Translational Medicine* 2 (26): 26ps16. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000866>.
- Leveziel N., C. Delcourt, J. Zerbib, H. Dollfus, J. Kaplan, P. Benlian, G. Coscas, E. H. Souied, et G. Soubrane. 2009. « [Epidemiology of age related macular degeneration] ». *Journal Français D'ophtalmologie* 32 (6): 440-51. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2009.04.009>.
- Li Qihong, Rehae Miller, Ping-Yang Han, Jijing Pang, Astra Dinculescu, Vince Chiodo, et William W. Hauswirth. 2008a. « Intracocular Route of AAV2 Vector Administration Defines Humoral Immune Response and Therapeutic Potential ». *Molecular Vision* 14: 1760.
- Li Qihong, 2008b. « Intracocular Route of AAV2 Vector Administration Defines Humoral Immune Response and Therapeutic Potential ». *Molecular Vision* 14: 1760.

- Liang Katharine J., Jung Eun Lee, Yunqing D. Wang, Wenxin Ma, Aurora M. Fontainhas, Robert N. Fariss, et Wai T. Wong. 2009. « Regulation of Dynamic Behavior of Retinal Microglia by CX3CR1 Signaling ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50 (9): 4444-51. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3357>.
- Liu Y. L., K. Wagner, N. Robinson, D. Sabatino, P. Margaritis, W. Xiao, et R. W. Herzog. 2003. « Optimized Production of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus in Roller Bottles ». *BioTechniques* 34 (1): 184-89.
- Liu Ying, Huiling Hu, Meixin Liang, Yunfan Xiong, Kang Li, Mengfei Chen, Zhigang Fan, et al. 2017. « Regulated Differentiation of WERI-Rb-1 Cells into Retinal Neuron-like Cells ». *International Journal of Molecular Medicine* 40 (4): 1172-84. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3102>.
- Liudahl Shannon M., et Lisa M. Coussens. 2018. « Chapter 8 - To Help or To Harm: Dynamic Roles of CD4+ T Helper Cells in Solid Tumor Microenvironments ». In *Immunology*, édité par M. A. Hayat, 97-116. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809819-6.00008-3>.
- MacLachlan Timothy K., Michael Lukason, Margaret Collins, Robert Munger, Elisabete Isenberger, Cindy Rogers, Shana Malatos, et al. 2011. « Preclinical Safety Evaluation of AAV2-SFLT01-a Gene Therapy for Age-Related Macular Degeneration ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (2): 326-34. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.258>.
- MacLaren Robert E. 2009. « An analysis of retinal gene therapy clinical trials: successful translation will depend on successful translation ». *Current opinion in molecular therapeutics* 11 (5): 540-46.
- MacLaren Robert E, Markus Groppe, Alun R Barnard, Charles L Cottrill, Tanya Tolmachova, Len Seymour, K Reed Clark, et al. 2014. « Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial ». *The Lancet* 383 (9923): 1129-37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62117-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62117-0).
- Maeda Akiko, Michiko Mandai, et Masayo Takahashi. 2019. « Gene and Induced Pluripotent Stem Cell Therapy for Retinal Diseases ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 20 (1): 201-16. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083118-015043>.
- Maeder Morgan L, et Charles A Gersbach. 2016. « Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy ». *Molecular Therapy* 24 (3): 430-46. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.10>.
- Maeder Morgan L., Michael Stefanidakis, Christopher J. Wilson, Reshica Baral, Luis Alberto Barrera, George S. Bounoutas, David Bumcrot, et al. 2019. « Development of a Gene-Editing Approach to Restore Vision Loss in Leber Congenital Amaurosis Type 10 ». *Nature Medicine* 25 (2): 229-33. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0327-9>.
- Maguire Albert M., Katherine A. High, Alberto Auricchio, J. Fraser Wright, Eric A. Pierce, Francesco Testa, Federico Mingozzi, et al. 2009. « Age-Dependent Effects of RPE65 Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis: A Phase 1 Dose-Escalation Trial ». *Lancet (London, England)* 374 (9701): 1597. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61836-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61836-5).
- Maguire Albert M., Francesca Simonelli, Eric A. Pierce, Edward N. Pugh, Jr, Federico Mingozzi, Jeannette Bennicelli, et al. 2008a. « Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis ». *The New England Journal of Medicine* 358 (21): 2240. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802315>.
- Maguire Albert M., 2008b. « Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis ». *The New England Journal of Medicine* 358 (21): 2240. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802315>.
- Manno Catherine S., Glenn F. Pierce, Valder R. Arruda, Bertil Glader, Margaret Ragni, John J. Rasko, John Rasko, et al. 2006. « Successful Transduction of Liver in Hemophilia by AAV-Factor IX and Limitations Imposed by the Host Immune Response ». *Nature Medicine* 12 (3): 342-47. <https://doi.org/10.1038/nm1358>.
- Martino Ashley T., et David M. Markusic. 2020. « Immune Response Mechanisms against AAV Vectors in Animal Models ». *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 17 (juin): 198-208. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.12.008>.
- Matonti F., S. Roux, D. Denis, S. Picaud, et F. Chavane. 2015. « Cécité et réhabilitation visuelle ». *Journal Français d'Ophthalmologie* 38 (2): 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2014.06.012>.

- McPherson Scott W., Neal D. Heuss, Ute Lehman, et Dale S. Gregerson. 2011. « Generation of Regulatory T Cells to Antigen Expressed in the Retina ». *Current Immunology Reviews* 7 (3): 344-49. <https://doi.org/10.2174/157339511796196584>.
- Mellor Andrew L., et David H. Munn. 2004. «IDO Expression by Dendritic Cells: Tolerance and Tryptophan Catabolism ». *Nature Reviews Immunology* 4 (10): 762-74. <https://doi.org/10.1038/nri1457>.
- Mendell Jerry R., Katherine Campbell, Louise Rodino-Klapac, Zarife Sahenk, Chris Shilling, Sarah Lewis, Dawn Bowles, et al. 2010. « Dystrophin Immunity in Duchenne's Muscular Dystrophy ». *The New England Journal of Medicine* 363 (15): 1429-37. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1000228>.
- Miller Joan W., et Luk H. Vandenberghe. 2018. « Breaking and Sealing Barriers in Retinal Gene Therapy ». *Molecular Therapy* 26 (9): 2081-82. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.08.003>.
- Mingozzi Federico, et Katherine A. High. 2013. « Immune Responses to AAV Vectors: Overcoming Barriers to Successful Gene Therapy ». *Blood* 122 (1): 23-36. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-306647>.
- Mingozzi Federico, Marcela V. Maus, Daniel J. Hui, Denise E. Sabatino, Samuel L. Murphy, John E. J. Rasko, Margaret V. Ragni, et al. 2007. « CD8(+) T-Cell Responses to Adeno-Associated Virus Capsid in Humans ». *Nature Medicine* 13 (4): 419-22. <https://doi.org/10.1038/nm1549>.
- Mingozzi Federico, Janneke J. Meulenberg, Daniel J. Hui, Etiena Basner-Tschakarjan, Nicole C. Hasbrouck, Shyrie A. Edmonson, Natalie A. Hutnick, 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 (10): 2077-86. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-167510>.
- Mittrücker Hans-Willi, Alexander Visekruna, et Magdalena Huber. 2014. « Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8⁺ T Cells ». *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 62 (6): 449-58. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y>.
- Moore S., et S. Thanos. 1996. « The Concept of Microglia in Relation to Central Nervous System Disease and Regeneration ». *Progress in Neurobiology* 48 (4-5): 441-60. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)00051-8](https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)00051-8).
- Muhuri Manish, Yukiko Maeda, Hong Ma, Sanjay Ram, Katherine A. Fitzgerald, Phillip W. L. Tai, et Guangping Gao. 2021. « Overcoming Innate Immune Barriers That Impede AAV Gene Therapy Vectors ». *The Journal of Clinical Investigation* 131 (1). <https://doi.org/10.1172/JCI143780>.
- Murphy Samuel L., Hojun Li, Federico Mingozzi, Denise E. Sabatino, Daniel J. Hui, Shyrie A. Edmonson, et Katherine A. High. 2009. « Diverse IgG Subclass Responses to Adeno-Associated Virus Infection and Vector Administration ». *Journal of Medical Virology* 81 (1): 65-74. <https://doi.org/10.1002/jmv.21360>.
- Nakamura Takahiko, Ania Terajewicz, et Joan Stein-Streilein. 2005. « Mechanisms of Peripheral Tolerance Following Intracameral Inoculation Are Independent of IL-13 or STAT6 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (4): 2643-46. <https://doi.org/10.1167/iov.02-0595>.
- Nakao Shintaro, Ali Hafezi-Moghadam, et Tatsuro Ishibashi. 2012. « Lymphatics and Lymphangiogenesis in the Eye ». *Journal of Ophthalmology* 2012: 783163. <https://doi.org/10.1155/2012/783163>.
- Narfström Kristina, Ragnheidur Bragadóttir, T. Michael Redmond, P. Elizabeth Rakoczy, Theo van Veen, et Anitha Bruun. 2003. « Functional and Structural Evaluation after AAV.RPE65 Gene Transfer in the Canine Model of Leber's Congenital Amaurosis ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 533: 423-30.
- Nidetz Natalie F., Michael C. McGee, Longping V. Tse, Chengwen Li, Le Cong, Yunxing Li, et Weishan Huang. 2020. « Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Immune Responses: Understanding Barriers to Gene Delivery ». *Pharmacology & Therapeutics* 207 (mars): 107453. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107453>.
- Niederhorn Jerry Y. 2007. « The Induction of Anterior Chamber-Associated Immune Deviation ». *Chemical Immunology and Allergy* 92: 27-35. <https://doi.org/10.1159/000099251>.

- Nieder Korn Jerry Y. 2009. « Immune Escape Mechanisms of Intraocular Tumors ». *Progress in retinal and eye research* 28 (5): 329-47. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.06.002>.
- Paglinawan Rey, Ursula Malipiero, Ralph Schlapbach, Karl Frei, Walter Reith, et Adriano Fontana. 2003. « TGFbeta Directs Gene Expression of Activated Microglia to an Anti-Inflammatory Phenotype Strongly Focusing on Chemokine Genes and Cell Migratory Genes ». *Glia* 44 (3): 219-31. <https://doi.org/10.1002/glia.10286>.
- Pearson R. A., A. C. Barber, M. Rizzi, C. Hippert, T. Xue, E. L. West, Y. Duran, et al. 2012. « Restoration of Vision after Transplantation of Photoreceptors ». *Nature* 485 (7396): 99-103. <https://doi.org/10.1038/nature10997>.
- Perez V. L., A. M. Saeed, Y. Tan, M. Urbiet, et F. Cruz-Guilloty. 2013. « The eye: A window to the soul of the immune system ». *Journal of Autoimmunity*, Abul Abbas: An epitome of scholarship, 45 (septembre): 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.06.011>.
- Petit Lolita, Elsa Lhériteau, Michel Weber, Guylène Le Meur, Jack-Yves Deschamps, Nathalie Provost, Alexandra Mendes-Madeira, et al. 2012. « Restoration of Vision in the Pde6 β -Deficient Dog, a Large Animal Model of Rod-Cone Dystrophy ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (11): 2019-30. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.134>.
- Peyman Gholam A., Eleonora M. Lad, et Darius M. Moshfeghi. 2009. « INTRAVITREAL INJECTION OF THERAPEUTIC AGENTS ». *RETINA* 29 (7): 875-912. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e3181a94f01>.
- Planul Arthur, et Deniz Dalkara. 2017. « Vectors and Gene Delivery to the Retina ». *Annual review of vision science* 3 (septembre): 121-40. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-102016-061413>.
- Provis Jan M. 2001. « Development of the Primate Retinal Vasculature ». *Progress in Retinal and Eye Research* 20 (6): 799-821. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(01\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(01)00012-X).
- Rabinowitz Joseph, Ying Kai Chan, et Richard Jude Samulski. 2019. « Adeno-Associated Virus (AAV) versus Immune Response ». *Viruses* 11 (2): 102. <https://doi.org/10.3390/v11020102>.
- Ramachandran Pavitra S., Vivian Lee, Zhangyong Wei, Ji Yun Song, Giulia Casal, Therese Cronin, Keirnan Willett, et al. 2016a. « Evaluation of Dose and Safety of AAV7m8 and AAV8BP2 in the Non-Human Primate Retina ». *Human Gene Therapy*, octobre. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.111>.
- Ramachandran Pavitra S. 2016b. « Evaluation of Dose and Safety of AAV7m8 and AAV8BP2 in the Non-Human Primate Retina ». *Human Gene Therapy*, octobre. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.111>.
- Rizzolo Lawrence J., Shaomin Peng, Yan Luo, et Wei Xiao. 2011. « Integration of Tight Junctions and Claudins with the Barrier Functions of the Retinal Pigment Epithelium ». *Progress in Retinal and Eye Research* 30 (5): 296-323. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.06.002>.
- Rogers Geoffrey L., Ashley T. Martino, Irene Zolotukhin, Hildegund C. J. Ertl, et Roland W. Herzog. 2014. « Role of the Vector Genome and Underlying Factor IX Mutation in Immune Responses to AAV Gene Therapy for Hemophilia B ». *Journal of Translational Medicine* 12 (janvier): 25. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-25>.
- Rogers Geoffrey L., Masataka Suzuki, Irene Zolotukhin, David M. Markusic, Laurence M. Morel, Brendan Lee, Hildegund C. J. Ertl, et Roland W. Herzog. 2015. « Unique Roles of TLR9- and MyD88-Dependent and -Independent Pathways in Adaptive Immune Responses to AAV-Mediated Gene Transfer ». *Journal of Innate Immunity* 7 (3): 302-14. <https://doi.org/10.1159/000369273>.
- Ronzitti Giuseppe, David-Alexandre Gross, et Federico Mingozzi. 2020. « Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors ». *Frontiers in Immunology* 11 (avril): 670. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00670>.
- Sahel José Alain, et Deniz Dalkara. 2019. « Gene Therapy for Retinal Dystrophy ». *Nature Medicine* 25 (2): 198-99. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0346-1>.
- Sahel José-Alain, Elise Boulanger-Scemama, Chloé Pagot, Angelo Arleo, Francesco Galluppi, Joseph N. Martel, Simona Degli Esposti, et al. 2021. « Partial Recovery of Visual Function in a Blind Patient after Optogenetic Therapy ». *Nature Medicine* 27 (7): 1223-29. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01351-4>.

- Santallier Martine, Pêchereau Jocelyne, et Pêchereau, Alain. 2008. « Anatomie pour les écoles d'Orthoptie, v1.0 ». A & J Pêchereau.
- Santos Ana M., Ruth Calvente, Mohamed Tassi, Maria-Carmen Carrasco, David Martín-Oliva, José L. Marín-Teva, Julio Navascués, et Miguel A. Cuadros. 2008. « Embryonic and Postnatal Development of Microglial Cells in the Mouse Retina ». *Journal of Comparative Neurology* 506 (2): 224-39. <https://doi.org/10.1002/cne.21538>.
- Schafer Dorothy P., Emily K. Lehrman, Amanda G. Kautzman, Ryuta Koyama, Alan R. Mardinly, Ryo Yamasaki, Richard M. Ransohoff, Michael E. Greenberg, Ben A. Barres, et Beth Stevens. 2012. « Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner ». *Neuron* 74 (4): 691-705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>.
- Schimel Andrew M., Linu Abraham, Douglas Cox, Abdoulaye Sene, Courtney Kraus, Dru S. Dace, Nuran Ercal, et Rajendra S. Apte. 2011. « N-Acetylcysteine Amide (NACA) Prevents Retinal Degeneration by up-Regulating Reduced Glutathione Production and Reversing Lipid Peroxidation ». *The American Journal of Pathology* 178 (5): 2032-43. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.01.036>.
- Schwartz Steven D., Carl D. Regillo, Byron L. Lam, Dean Elliott, Philip J. Rosenfeld, Ninel Z. Gregori, Jean-Pierre Hubschman, et al. 2015. « Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium in Patients with Age-Related Macular Degeneration and Stargardt's Macular Dystrophy: Follow-up of Two Open-Label Phase 1/2 Studies ». *Lancet (London, England)* 385 (9967): 509-16. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61376-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3).
- Simon Cardillia-Joe, José-Alain Sahel, Jens Duebel, Stefan Herlitze, et Deniz Dalkara. 2020. « Opsins for Vision Restoration ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 527 (2): 325-30. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.117>.
- Simonelli Francesca, Albert M. Maguire, Francesco Testa, Eric A. Pierce, Federico Mingozzi, Jeannette L. Bennicelli, Settimio Rossi, et al. 2010. « Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis Is Safe and Effective through 1.5 Years after Vector Administration ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (3): 643-50. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.277>.
- Simonelli Francesca, Carmela Ziviello, Francesco Testa, Settimio Rossi, Elisa Fazzi, Paolo Emilio Bianchi, Maurizio Fossarello, et al. 2007. « Clinical and Molecular Genetics of Leber's Congenital Amaurosis: A Multicenter Study of Italian Patients ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (9): 4284-90. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0068>.
- Spadoni Ilaria, Giulia Fornasa, et Maria Rescigno. 2017. « Organ-Specific Protection Mediated by Cooperation between Vascular and Epithelial Barriers ». *Nature Reviews Immunology* 17 (12): 761-73. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.100>.
- Sparrow J. R., G. P. Matthews, T. Iwamoto, R. Ross, A. Gershbein, et S. Chang. 1993. « Retinal Tolerance to Intravitreal Perfluoroethylcyclohexane Liquid in the Rabbit ». *Retina (Philadelphia, Pa.)* 13 (1): 56-62.
- Srivastava Arun. 2016. « In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors ». *Current Opinion in Virology, Virus-vector interactions / Viral gene therapy, vector host-interactions*, 21 (décembre): 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.08.003>.
- St. Paul Michael, et Pamela S. Ohashi. 2020. « The Roles of CD8+ T Cell Subsets in Antitumor Immunity ». *Trends in Cell Biology* 30 (9): 695-704. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.003>.
- Stein-Streilein Joan. 2013. « Mechanisms of Immune Privilege in the Posterior Eye ». *International Reviews of Immunology* 32 (1): 42-56. <https://doi.org/10.3109/08830185.2012.740535>.
- Stein-Streilein Joan, et J. Wayne Streilein. 2002. « Anterior Chamber Associated Immune Deviation (ACAID): Regulation, Biological Relevance, and Implications for Therapy ». *International Reviews of Immunology* 21 (2-3): 123-52.
- Stieger Knut, Elsa Lhériveau, Elsa Lhéariveau, Phillip Moullier, et Fabienne Rolling. 2009. « AAV-Mediated Gene Therapy for Retinal Disorders in Large Animal Models ». *ILAR Journal* 50 (2): 206-24.

- Streilein J. W. 1987. « Immune Regulation and the Eye: A Dangerous Compromise ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1 (3): 199-208.
- Streilein J. W. 1995a. « Immunological Non-Responsiveness and Acquisition of Tolerance in Relation to Immune Privilege in the Eye ». *Eye (London, England)* 9 (Pt 2): 236-40. <https://doi.org/10.1038/eye.1995.46>.
- Streilein J. W. 1995b. « Ocular Immune Privilege in the Immunosuppressive Intraocular Microenvironment ». *Ocular Immunology and Inflammation* 3 (2): 139-44. <https://doi.org/10.3109/09273949509085042>.
- Streilein J. W., et J. Y. Niederkorn. 1981. « Induction of Anterior Chamber-Associated Immune Deviation Requires an Intact, Functional Spleen ». *The Journal of Experimental Medicine* 153 (5): 1058-67.
- Sun H., R. Liang, B. Yang, Y. Zhou, M. Liu, F. Fang, J. Ding, Y. Fan, et G. Hu. 2016. « Aquaporin-4 Mediates Communication between Astrocyte and Microglia: Implications of Neuroinflammation in Experimental Parkinson's Disease ». *Neuroscience* 317 (mars): 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.003>.
- Tatour Yasmin, et Tamar Ben-Yosef. 2020. « Syndromic Inherited Retinal Diseases: Genetic, Clinical and Diagnostic Aspects ». *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 10 (10): E779. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10100779>.
- Taylor Andrew W., Pascale Alard, David G. Yee, et J. Wayne Streilein. 1997. « Aqueous humor induces transforming growth factor- β (TGF- β)-producing regulatory T-cells ». *Current Eye Research* 16 (9): 900-908. <https://doi.org/10.1076/ceyr.16.9.900.5043>.
- Taylor Sarah, Claudia J. Calder, Julie Albon, Jonathan T. Erichsen, Micheal E. Boulton, et James E. Morgan. 2011. « Involvement of the CD200 Receptor Complex in Microglia Activation in Experimental Glaucoma ». *Experimental Eye Research* 92 (5): 338-43. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.01.012>.
- Thanos S. 1992. « Sick Photoreceptors Attract Activated Microglia from the Ganglion Cell Layer: A Model to Study the Inflammatory Cascades in Rats with Inherited Retinal Dystrophy ». *Brain Research* 588 (1): 21-28. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91340-k](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91340-k).
- Treuting Piper M., Rachel Wong, Daniel C. Tu, et Isabella Phan. 2012. « 21 - Special Senses: Eye ». In *Comparative Anatomy and Histology*, 395-418. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00021-4>.
- Tse Longping V., Sven Moller-Tank, et Aravind Asokan. 2015. « Strategies to circumvent humoral immunity to adeno-associated viral vectors ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 15 (6): 845-55. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1035645>.
- Tso M. O. 1982. « Pathology of Cystoid Macular Edema ». *Ophthalmology* 89 (8): 902-15. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(82\)34698-9](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(82)34698-9).
- « Update from the Seventy-Fourth World Health Assembly – 27 May 2021 ». s. d. Consulté le 1 septembre 2021. <https://www.who.int/news/item/27-05-2021-update-from-the-seventy-fourth-world-health-assembly-27-may-2021>.
- Uvéite - Bahram Bodaghi, Phuc Lehoang. 2017. <https://www.decitre.fr/livres/uveite-9782810101191.html>.
- Vandenberghe Luk H., Peter Bell, Albert M. Maguire, Cassia N. Cearley, Ru Xiao, Roberto Calcedo, Lili Wang, et al. 2011. « Dosage Thresholds for AAV2 and AAV8 Photoreceptor Gene Therapy in Monkey ». *Science Translational Medicine* 3 (88): 88ra54. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002103>.
- Vandenberghe Luk H., Peter Bell, Albert M. Maguire, Ru Xiao, Tim B. Hopkins, Rebecca Grant, Jean Bennett, et James M. Wilson. 2013. « AAV9 Targets Cone Photoreceptors in the Nonhuman Primate Retina ». *PloS One* 8 (1): e53463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053463>.
- Veleri Shobi, Csilla H. Lazar, Bo Chang, Paul A. Sieving, Eyal Banin, et Anand Swaroop. 2015. « Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models ». *Disease Models & Mechanisms* 8 (2): 109-29. <https://doi.org/10.1242/dmm.017913>.

- Vendomèle Julie, Safa Dehmani, Quentin Khebizi, Anne Galy, et Sylvain Fisson. 2018a. « Subretinal Injection of HY Peptides Induces Systemic Antigen-Specific Inhibition of Effector CD4+ and CD8+ T-Cell Responses ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00504>.
- Vendomèle Julie. 2018b. « Subretinal Injection of HY Peptides Induces Systemic Antigen-Specific Inhibition of Effector CD4+ and CD8+ T-Cell Responses ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00504>.
- Vendomèle Julie, Quentin Khebizi, et Sylvain Fisson. 2017a. « Cellular and Molecular Mechanisms of Anterior Chamber-Associated Immune Deviation (ACAID): What We Have Learned from Knockout Mice ». *Frontiers in Immunology* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01686>.
- Vendomèle Julie. 2017b. « Cellular and Molecular Mechanisms of Anterior Chamber-Associated Immune Deviation (ACAID): What We Have Learned from Knockout Mice ». *Frontiers in Immunology* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01686>.
- Verbakel Sanne K., Ramon A. C. van Huet, Camiel J. F. Boon, Anneke I. den Hollander, Rob W. J. Collin, Caroline C. W. Klaver, Carel B. Hoyng, Ronald Roepman, et B. Jeroen Klevering. 2018. « Non-Syndromic Retinitis Pigmentosa ». *Progress in Retinal and Eye Research* 66 (septembre): 157-86. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.03.005>.
- Verdera Helena Costa, Klaudia Kuranda, et Federico Mingozzi. 2020. « AAV Vector Immunogenicity in Humans: A Long Journey to Successful Gene Transfer ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 28 (3): 723-46. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.12.010>.
- Veske A., S. E. Nilsson, K. Narfström, et A. Gal. 1999. « Retinal Dystrophy of Swedish Briard/Briard-Beagle Dogs Is Due to a 4-Bp Deletion in RPE65 ». *Genomics* 57 (1): 57-61. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5754>.
- Vyas Jatin M., Annemarie G. Van der Veen, et Hidde L. Ploegh. 2008. « The Known Unknowns of Antigen Processing and Presentation ». *Nature Reviews Immunology* 8 (8): 607-18. <https://doi.org/10.1038/nri2368>.
- Wang L., O. Cao, B. Swalm, E. Dobrzynski, F. Mingozzi, et R. W. Herzog. 2005. « Major Role of Local Immune Responses in Antibody Formation to Factor IX in AAV Gene Transfer ». *Gene Therapy* 12 (19): 1453-64. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302539>.
- Wang Y., I. Goldschneider, D. Foss, D. Y. Wu, J. O'Rourke, et R. E. Cone. 1997. « Direct Thymic Involvement in Anterior Chamber-Associated Immune Deviation: Evidence for a Nondeletional Mechanism of Centrally Induced Tolerance to Extrathymic Antigens in Adult Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 158 (5): 2150-55.
- Weber Michel, Joseph Rabinowitz, Nathalie Provost, Hervé Conrath, Sébastien Folliot, Delphine Briot, Yan Chérel, et al. 2003. « Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 4 Mediates Unique and Exclusive Long-Term Transduction of Retinal Pigmented Epithelium in Rat, Dog, and Nonhuman Primate after Subretinal Delivery ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 7 (6): 774-81.
- Weiland James D., et Mark S. Humayun. 2014. « Retinal Prosthesis ». *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 61 (5): 1412-24. <https://doi.org/10.1109/TBME.2014.2314733>.
- Weleber Richard G., Mark E. Pennesi, David J. Wilson, Shalesh Kaushal, Laura R. Erker, Lauren Jensen, Maureen T. McBride, et al. 2016a. « Results at 2 Years after Gene Therapy for RPE65-Deficient Leber Congenital Amaurosis and Severe Early-Childhood-Onset Retinal Dystrophy ». *Ophthalmology* 123 (7): 1606-20. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2016.03.003>.
- Weleber Richard G. 2016b. « Results at 2 Years after Gene Therapy for RPE65-Deficient Leber Congenital Amaurosis and Severe Early-Childhood-Onset Retinal Dystrophy ». *Ophthalmology* 123 (7): 1606-20. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2016.03.003>.
- Weltgesundheitsorganisation, éd. 1997. *Strategies for the Prevention of Blindness in National Programmes: A Primary Health Care Approach*. 2nd ed. Geneva: World Health Organization.
- Wenkel H., et J. W. Streilein. 1998. « Analysis of immune deviation elicited by antigens injected into the subretinal space. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39 (10): 1823-34.

- Wilson Christopher J., Tim Fennell, Anne Bothmer, Morgan L. Maeder, Deepak Reyon, Cecilia Cotta-Ramusino, Cecilia A. Fernandez, et al. 2018. « Response to “Unexpected Mutations after CRISPR–Cas9 Editing in Vivo” ». *Nature Methods* 15 (4): 236-37. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4552>.
- « World Sight Day: 10 October ». s. d. Consulté le 1 septembre 2021. <https://www.who.int/news/item/10-10-2002-world-sight-day-10-october>.
- Wostyn Peter, Veva De Groot, Debby Van Dam, Kurt Audenaert, Peter Paul De Deyn, et Hanspeter Esriel Killer. 2016. « The Glymphatic System: A New Player in Ocular Diseases? Letters ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 57 (13): 5426-27. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20262>.
- Wu Te-Lang, Hua Li, Susan M. Faust, Emily Chi, Shangzhen Zhou, Fraser Wright, Katherine A. High, et Hildegund C. J. Ertl. 2014. « CD8+ T Cell Recognition of Epitopes within the Capsid of Adeno-Associated Virus 8-Based Gene Transfer Vectors Depends on Vectors' Genome ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 22 (1): 42-51. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.218>.
- Xiong Wenjun, David M. Wu, Yunlu Xue, Sean K. Wang, Michelle J. Chung, Xuke Ji, Parimal Rana, Sophia R. Zhao, Shuyi Mai, et Constance L. Cepko. 2019. « AAV Cis-Regulatory Sequences Are Correlated with Ocular Toxicity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (12): 5785-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821000116>.
- Xu Heping, Mei Chen, et John V. Forrester. 2009. « Para-Inflammation in the Aging Retina ». *Progress in Retinal and Eye Research* 28 (5): 348-68. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.06.001>.
- Xu Heping, Mei Chen, Eric J. Mayer, John V. Forrester, et Andrew D. Dick. 2007. « Turnover of Resident Retinal Microglia in the Normal Adult Mouse ». *Glia* 55 (11): 1189-98. <https://doi.org/10.1002/glia.20535>.
- Yang Shuo, Si-qi Ma, Xing Wan, Heng He, Han Pei, Min-jian Zhao, Chen Chen, et al. 2016. « Long-term outcomes of gene therapy for the treatment of Leber's hereditary optic neuropathy ». *EBioMedicine* 10 (août): 258-68. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.07.002>.
- Yin Lu, Kenneth Greenberg, Jennifer J. Hunter, Deniz Dalkara, Kathleen D. Kolstad, Benjamin D. Masella, Robert Wolfe, et al. 2011. « Intravitreal Injection of AAV2 Transduces Macaque Inner Retina ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (5): 2775-83. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6250>.
- Yuk Jae-Min, et Eun-Kyeong Jo. 2011. « Toll-like Receptors and Innate Immunity ». *Journal of Bacteriology and Virology* 41 (4): 225. <https://doi.org/10.4167/jbv.2011.41.4.225>.
- Zaiss A. K., et D. A. Muruve. 2008. « Immunity to Adeno-Associated Virus Vectors in Animals and Humans: A Continued Challenge ». *Gene Therapy* 15 (11): 808-16. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.54>.
- Zaiss Anne-Kathrin, Qiang Liu, Gloria P. Bowen, Norman C. W. Wong, Jeffrey S. Bartlett, et Daniel A. Muruve. 2002. « Differential Activation of Innate Immune Responses by Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors ». *Journal of Virology* 76 (9): 4580-90. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.9.4580-4590.2002>.
- Zhu Jiangao, Xiaopei Huang, et Yiping Yang. 2009. « The TLR9-MyD88 Pathway Is Critical for Adaptive Immune Responses to Adeno-Associated Virus Gene Therapy Vectors in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (8): 2388-98. <https://doi.org/10.1172/JCI37607>.

ANNEXE

Ocular gene therapy mediated by AAV vectors: an overview of immunosuppressive treatments and the immunomonitoring of patients involved in clinical trials

Julie Vendomèle, Gaëlle Chauveau, Deniz Dalkara, Anne Galy, Sylvain Fisson*

¹Université Paris-Saclay, Univ Evry, Inserm, Genethon, Integrare research unit UMR_S951, 91000, Evry-Courcouronnes, France.

²Genethon, 91000, Evry-Courcouronnes, France

³Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, F-75012 Paris, France

*Corresponding author: Sylvain Fisson. 1 bis rue de l'Internationale, Evry F-91002, France.

Phone: +33 662 089 334. Fax: +33 160 778 698. E-mail: sylvain.fisson@univ-evry.fr

Running title: Immune aspects in clinical trials of ocular gene therapy

Article type: Review

Abstract word count (max 200): 192

Word count (max 4000): 2107

Number of table: 2

Number of figures: 1

Number of references: 42

Keywords (max 10): Anterior chamber-associated immune deviation (ACAID); Eye; Ocular immune privilege; Subretinal-associated immune inhibition (SRAII); T-cells

Introduction

Since the 90's, ocular gene transfer mediated by adeno-associated virus (AAV)-derived vectors has been explored in animal models (Ali et al. 1996, 199; Leberherz et al. 2008b; Vandenberghe et al. 2011). Ten years ago, the first clinical trials in humans was initiated in an attempt to evaluate the safety of a subretinal injection of AAV2 to treat Leber's Congenital Amaurosis (LCA) due to a mutation in the RPE65 gene (Bainbridge et al. 2008; Hauswirth et al. 2008a; Maguire et al. 2008b). Nowadays, over 25 clinical trials are ongoing, for LCA and other pathologies such as Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON) and Age-related Macular Degeneration (AMD). Among them, twelve have published their results, in terms of efficiency and safety. Data are heterogenous among pathologies, and more interestingly, among clinical trials for the same pathology. Results seem to display a good safety profile along with an improvement of the vision in some patients (Ashtari et al. 2011; Bainbridge et al. 2015a; Cideciyan et al. 2009; Feuer et al. 2016; Guylène Le Meur et al. 2017; MacLaren et al. 2014; Weleber et al. 2016b; Yang et al. 2016) but some investigators think about increasing doses in order to improve the long-term efficiency of the treatment. However, immune responses can be induced toward the transgene product and/or the capsid in a dose-dependent manner in the context of AAV-mediated systemic or muscular gene transfer (Calcedo et al. 2017; Ferreira et al. 2014; Manno et al. 2006; Mendell et al. 2010; Mingozzi et al. 2007; Murphy et al. 2009). On an immune point-of-view, the eye has been described as an immune-privileged site for 100 years, with the characterization of Anterior Chamber-Associated Immune Deviation (ACAID) in animal models (Stein-Streilein et Streilein 2002; Vandomèle, Khebizi, et Fisson 2017b) and the investigation of peripheral immune responses induced by subretinal injections of model antigens (McPherson et al. 2011; Vandomèle et al. 2018b; Wenkel et Streilein 1998). Despite these mechanisms and the local secretion of pro-tolerogenic molecules such as TGF β , immunosuppressive treatments were used in AAV-mediated ocular gene therapy clinical trials to prevent potential immune responses. However, some patients developed immune responses toward the transgene product and/or the capsid and several ocular inflammations were reported. This raises several questions regarding the immune-privileged status of the eye, the role of the serotype, the dose, the volume, as well as the route of administration (subretinal vs intravitreal) and also the impact of the immunosuppressive treatment (molecule and posology). In this review, we aim at providing a detailed and global vision of immunosuppressive treatments and immunomonitoring of patients involved in clinical trials of AAV-mediated ocular gene therapy.

Results

State of the art of different therapeutic approaches to ocular AAV mediated gene therapy.

Up to date, the safety of AAV-mediated gene therapy has been evaluated for 4 ocular pathologies (Table 1). In 10% of LCA patients, the disease is due to a mutation in the RPE65 gene, which encodes a critical enzyme for the visual cycle (Simonelli et al. 2007). The first clinical trials of ocular gene therapy aimed at evaluating the safety and efficiency of AAV vectors (AAV2 or AAV4) encoding for the human version of RPE65 in patients. Choroideremia, caused by a mutation in the CHM gene, is also a target of AAV-mediated gene therapy, as well as LHON, due a mutation in the ND4 mitochondrial gene. AAV-mediated gene transfer can also treat age-related pathologies, especially AMD. Obviously, transgenes depend on the target pathology, but promoters vary among clinical trials, from ubiquitous promoters such as Chicken β Actin (CBA) to cell-specific promoters such as RPE65p (Table 1). AAV2 has been used in the majority of clinical trials, but AAV4 has also been tested and other serotypes such as AAV8 are currently being tested but results are not published yet. The injected doses range from 10^8 to 10^{12} vg, with a factor 100 between the lowest and highest dose for LCA and LHON and a factor 1000 for AMD (Table 2). These variations must be taken into account in immune-monitoring considering that higher AAV doses might bring more antigenic particles. Moreover, these doses are delivered in volumes ranging from 100 μ L to 1mL (Table 1). Injections are performed in altered eyes, with a frailty of the retinal structure and the subretinal route induces a retinal detachment (between photoreceptors and retinal pigment epithelium cells). Thus, the volume might also directly influence the immune responses in patients. Another factor to take into account is the route of administration, either subretinal or intravitreal. The route of injection, which influences the transduction pattern, is tightly dependent on the pathology and preclinical studies in non-human primates have shown that the intravitreal route is more immunogenic and more exposed to pre-existing immunity (Kotterman et al. 2015b; Li et al. 2008b). Finally, another major point of heterogeneity among clinical trials is the immunosuppressive treatment. Except for one clinical trial, they all use immunosuppressive molecules, either locally, orally or combined. Some are given before and after the injection, or after in function of the ocular inflammation (Table 1). All these parameters must be taken into account in the analysis of immune responses in patients. Actually,

immunosuppressive molecules might be beneficial or not as a slight inflammation is beneficial for the healing process.

Impact of specific factors to ocular gene therapy clinical trials on immuno-monitoring data.

To provide a global, integrated view of the different constituent parameters of clinical trials were used to perform a principal component analysis (Figure 1). Dimension 1 and dimension 2 distribute clinical trials along the X and the Y-axis, respectively, and account for almost 26,70 and 18,3% of the differences between clinical trials. In the figure 1A, is an Individual factor map and represent the distribution of each clinical trials in function of their parameters is studied. The majority of clinical trial seems to be homogeneously distributed except 6 clinical trials. Indeed, NCT01496040 and NCT 00643747 are clustered (surrounded in green), they are the only ones to use a specific promotor. Then NCT01024998, NCT01267422, NCT02161380, NCT02064569 are also clustered (surrounded in blue) because they used intravitreal injection in the treatment protocol. Moreover, among this 4 clinical trials, NCT02161380 and NCT02064569 are clustered, NCT02161380 is the only one to use a scAAV2 vector, and we can noticed the absence of immunosuppressive treatment. In the NCT02064569, the percentage of patient with an ocular inflammation is the highest, 86,7% of either 13/15 patient. In the figure 1B, the distribution of the different constituent parameters of clinical trials and principal read out are analyzed in PCA. The immunosuppressive treatment seems to be the most heterogeneous parameter between the various clinical trials. It is less correlated because of the great heterogeneity of the treatments in the protocols. Indeed, the route of administration (sub-conjunctival vs topical), the nature of the molecule, the posology and the combination of a local and an oral treatment, are variable. Moreover the anti-capsid humoral and cellular response are homogeneous, 20,6 % ($\pm 10,9$) of patient present an anti-capsid cellular response against 30,9% ($\pm 17,1$) for anti-capsid humoral response.

To monitor immune responses in patients, several read-outs were used (Table 2). Ophthalmologic examinations were performed in all clinical trials to assess the inflammation in the injected eye. They revealed inflammation in 23 patients (16,5%), which definitely highlights the inflammatory potential of AAV vectors injected in the eye. Moreover, antigen-specific immune responses were monitored using PBMCs. Eight clinical trials have used IFN γ ELISpot assay to check anti-AAV cellular immune response and have shown that 8 patients developed casid-specific T cell response at some point after the injection. Humoral response was also assessed by ELISA in the majority of clinical trials and revealed that anti-capsid antibodies

were induced in some patients (20/71), independently from the route of administration. Anti-transgene immune responses were monitored in only 5/12 clinical trials. Interestingly, some patients developed cellular anti-transgene T cells, revealed by IFN γ ELISpot assay and anti-transgene antibodies were detected in 2 patients by ELISA. Overall, it is important to notice that immune responses, either local or systemic, were detected in several patients despite immuno-suppressive treatments and regardless of the route of administration.

Discussion

In this review, we clearly highlight that immune responses in AAV-mediated ocular gene therapy occur and must be investigated. Immunosuppression and immune monitoring are highly heterogeneous and should be standardized among clinical trials to improve the care and follow-up of patients.

Immunosuppression in patients is highly variable in these clinical trials, in terms of molecule, route of administration and posology. However, a global question arises : what is the impact of this immunosuppression ? The eye has been described as an immune-privileged site, where pro-tolerogenic immune responses can be induced. By using immunosuppressive molecules, wouldn't it inhibit this pro-tolerogenic activity? Moreover, a small inflammation is important for the healing of a wound. In this context, a weak and transient inflammation after the injection could potentially be beneficial.

Immune monitoring of patients was performed through ophthalmologic non-invasive examinations and blood samples, which provide information on local inflammation and peripheral antigen-specific immune responses. Although obvious ethical concerns prevent further investigations, several questions remain unresolved. Are there local anti-transgene/anti-capsid specific immune responses? What about the induction of immune responses in peripheral lymphoid organs, such as the spleen which is very important in ACAID induction, or cervical draining lymph nodes? Moreover, read-outs that were used on PBMCs are not very sensitive. Actually, they do not allow to highlight the induction of a low-intensity immune response which could however be deleterious. Keeping in mind the complexity of assessing immune responses in patients, developing sensitive bio-markers that would provide a more precise idea of local and peripheral immune responses should become a priority. miRNA is a lead that has been explored in Duchenne Muscular Dystrophy (Coenen-Stass, Wood, et Roberts 2017; Hu et al. 2014) and that should be assessed in AAV-mediated ocular gene therapy. But serum read-out do not necessarily reflect immune responses that develop in secondary lymphoid organs. We can wonder if the analysis of blood is a reflection of local inflammation (ocular).

Read out should be normalized to have a better comprehension of the immune status of patients during clinical trials. The sensibility and the tissue used for the different read out have to be

optimized. The specificity against the transgene or the capsid have to be evaluated as the nonspecific response (for example caused by contaminants).

Our study raises the question of the immunosuppressive treatment utilization on the global immune responses (local and systemic) developed by the patient during and the treatment. In fact, the use of immunosuppressive molecule could hide immune response or inhibit the SRAII. The main question is, what is the impact of immunosuppressive treatment on pro-tolerogenic and regulated responses? This is also begs the question of the best way to administer immunosuppressive treatment in function of each case (the pathology and the patient). What would be the best dosage? The best route of administration? And the best molecule?

NCT01267422 is the only one clinical trial without immune response. None of the patients present an ocular inflammation or anti-capsid humoral response but the anti-capsid cellular and anti-transgene responses have not been explored.

The induction of an immune response is dependent of the type of disease (genetic or age related), the stage of the disease, the immune status of the patient and all the parameters of the protocol (the dosage, the injected volume, the route of administration, etc.).

Conclusion

Although the eye has a privileged immunological status and ocular gene therapy is a formidable therapeutic tool, it is not without consequences (not a harmless act). Indeed, it can have consequences at the local level on the eye and at the systemic level. In this study we found that in 16% of the cases patients had local inflammation (or ocular events). Then some patients showed anti-transgene and anti-capsid inflammatory responses correlated to the injected vector dose. These inflammatory responses were detected despite the use of immunosuppressive treatments, so this leaves us to wonder about a potential masking of more important inflammatory responses. In addition, other host-specific or host-independent factors need to be taken into account. Indeed, the host's genetics, age, nature and stage of the disease are essential. Secondly, host-independent factors such as the nature of the vector and its transgene, the dose, the volume injected and the route of administration can also have an influence. Finally, in view of the heterogeneity of the immunosuppressive treatments used, it seems obvious that a homogenisation of the treatments should be envisaged as well as a scrupulous documentation and a systematic immunological analysis of the patients before and after injection. This will allow a better prediction of the inflammatory responses associated with the treatment of patients and a better management.

Abbreviations

Anterior chamber-associated immune deviation (ACAID); regulatory T-cells (Tregs); retinal pigment epithelium (RPE); Subretinal-associated immune inhibition (SRAII);

Acknowledgments

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the University of Evry Val d'Essonne (UEVE), the Actions Thématiques Incitatives de Genopole (ATIGE), and the Fondation de France (Berthe Foissier) funds.

Conflict of interest statement

Authors have no conflict of interest to declare.

Author contribution statement

JV performed data analyses and wrote the article

GC contributed to data analyses

DD and AG gave critical view of the data analysis and provided corrections

SF supervised the data analyses and writing of the article

References

- Acland G. M., G. D. Aguirre, J. Ray, Q. Zhang, T. S. Aleman, A. V. Cideciyan, S. E. Pearce-Kelling, et al. 2001. « Gene Therapy Restores Vision in a Canine Model of Childhood Blindness ». *Nature Genetics* 28 (1): 92-95. <https://doi.org/10.1038/88327>.
- Acland Gregory M., Gustavo D. Aguirre, Jean Bennett, Tomas S. Aleman, Artur V. Cideciyan, Jeannette Bennicelli, Nadine S. Dejneka, et al. 2005. « Long-Term Restoration of Rod and Cone Vision by Single Dose rAAV-Mediated Gene Transfer to the Retina in a Canine Model of Childhood Blindness ». *Molecular Therapy* 12 (6): 1072-82. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.08.008>.
- Al Mellor, et Munn Dh. 2004. « IDO Expression by Dendritic Cells: Tolerance and Tryptophan Catabolism ». *Nature Reviews. Immunology* 4 (10). <https://doi.org/10.1038/nri1457>.
- Ali Robin R., Martin B. Reichel, Adrian J. Thrasher, Roland J. Levinsky, Christine Kinnon, Naheed Kanuga, David M. Hunt, et Shomi S. Bhattacharya. 1996. « Gene Transfer into the Mouse Retina Mediated by an Adeno-Associated Viral Vector ». *Human Molecular Genetics* 5 (5): 591-94. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.5.591>.
- Allocca Mariacarmela, Claudio Mussolino, Maria Garcia-Hoyos, Daniela Sanges, Carolina Iodice, Marco Petrillo, Luk H. Vandenberghe, et al. 2007. « Novel Adeno-Associated Virus Serotypes Efficiently Transduce Murine Photoreceptors ». *Journal of Virology* 81 (20): 11372-80. <https://doi.org/10.1128/JVI.01327-07>.
- Amado Defne, Federico Mingozzi, Daniel Hui, Jeannette L. Bennicelli, Zhangyong Wei, Yifeng Chen, Erin Bote, et al. 2010. « Safety and Efficacy of Subretinal Readministration of a Viral Vector in Large Animals to Treat Congenital Blindness ». *Science Translational Medicine* 2 (21): 21ra16. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000659>.
- Ambroziak Anna M., Jerzy Szaflik, Jacek P. Szaflik, Maciej Ambroziak, Jan Witkiewicz, et Piotr Skopiński. 2016. « Immunomodulation on the Ocular Surface: A Review ». *Central-European Journal of Immunology* 41 (2): 195-208. <https://doi.org/10.5114/ceji.2016.60995>.
- Ameline Baptiste. 2016. *Evaluation du transfert d'optogènes pour le traitement par thérapie génique d'un modèle canin de dystrophies rétiniennes héréditaires*. Nantes. <http://www.theses.fr/2016NANT1001>.
- Ashtari Manzar, Laura L. Cyckowski, Justin F. Monroe, Kathleen A. Marshall, Daniel C. Chung, Alberto Auricchio, Francesca Simonelli, et al. 2011. « The Human Visual Cortex Responds to Gene Therapy-Mediated Recovery of Retinal Function ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (6): 2160-68. <https://doi.org/10.1172/JCI57377>.
- Auricchio A., G. Kobinger, V. Anand, M. Hildinger, E. O'Connor, A. M. Maguire, J. M. Wilson, et J. Bennett. 2001. « Exchange of Surface Proteins Impacts on Viral Vector Cellular Specificity and Transduction Characteristics: The Retina as a Model ». *Human Molecular Genetics* 10 (26): 3075-81.
- Bainbridge James W. B., Alexander J. Smith, Susie S. Barker, Scott Robbie, Robert Henderson, Kamaljit Balaggan, Ananth Viswanathan, et al. 2008. « Effect of Gene Therapy on Visual Function in Leber's Congenital Amaurosis ». *The New England Journal of Medicine* 358 (21): 2231-39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802268>.
- Bainbridge James W.B., Manjit S. Mehat, Venki Sundaram, Scott J. Robbie, Susie E. Barker, Caterina Ripamonti, Anastasios Georgiadis, et al. 2015a. « Long-Term Effect of Gene Therapy on Leber's Congenital Amaurosis ». *New England Journal of Medicine* 372 (20): 1887-97. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414221>.
- Bainbridge James W.B. 2015b. « Long-Term Effect of Gene Therapy on Leber's Congenital Amaurosis ». *New England Journal of Medicine* 372 (20): 1887-97. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414221>.
- Barber Amanda C., Claire Hippert, Yanai Duran, Emma L. West, James W. B. Bainbridge, Katherine Warre-Cornish, Ulrich F. O. Luhmann, et al. 2013. « Repair of the Degenerate Retina by Photoreceptor Transplantation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (1): 354-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212677110>.

- Basner-Tschakarjan Etiena, et Federico Mingozzi. 2014. « Cell-Mediated Immunity to AAV Vectors, Evolving Concepts and Potential Solutions ». *Frontiers in Immunology* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00350>.
- Ben M'Barek Karim, Walter Habeler, Olivier Goureau, et Christelle Monville. 2018. « Traitement des dystrophies rétinienne affectant l'épithélium pigmentaire par ingénierie tissulaire fondée sur les cellules souches embryonnaires humaines ». *médecine/sciences* 34 (5): 383-86. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183405004>.
- Ben M'Barek Karim, Florian Regent, et Christelle Monville. 2015. « Use of human pluripotent stem cells to study and treat retinopathies ». *World Journal of Stem Cells* 7 (3): 596-604. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i3.596>.
- Bennett Jean, Jennifer Wellman, Kathleen A Marshall, Sarah McCague, Manzar Ashtari, Julie DiStefano-Pappas, Okan U Elci, et al. 2016. « Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial ». *The Lancet* 388 (10045): 661-72. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30371-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30371-3).
- Berson E. L., B. Rosner, M. A. Sandberg, K. C. Hayes, B. W. Nicholson, C. Weigel-DiFranco, et W. Willett. 1993. « A Randomized Trial of Vitamin A and Vitamin E Supplementation for Retinitis Pigmentosa ». *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)* 111 (6): 761-72. <https://doi.org/10.1001/archoph.1993.01090060049022>.
- Berson Eliot L., Bernard Rosner, Michael A. Sandberg, Carol Weigel-DiFranco, Ann Moser, Robert J. Brockhurst, K. C. Hayes, et al. 2004. « Clinical Trial of Docosahexaenoic Acid in Patients with Retinitis Pigmentosa Receiving Vitamin A Treatment ». *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)* 122 (9): 1297-1305. <https://doi.org/10.1001/archoph.122.9.1297>.
- Bessis Alain, Catherine Béchade, Delphine Bernard, et Anne Roumier. 2007. « Microglial Control of Neuronal Death and Synaptic Properties ». *Glia* 55 (3): 233-38. <https://doi.org/10.1002/glia.20459>.
- Bevan M. J. 1976. « Cross-Priming for a Secondary Cytotoxic Response to Minor H Antigens with H-2 Congenic Cells Which Do Not Cross-React in the Cytotoxic Assay ». *The Journal of Experimental Medicine* 143 (5): 1283-88. <https://doi.org/10.1084/jem.143.5.1283>.
- Botto Catherine, Marco Rucli, Müge Defne Tekinsoy, Juliette Pulman, José-Alain Sahel, et Deniz Dalkara. 2021. « Early and Late Stage Gene Therapy Interventions for Inherited Retinal Degenerations ». *Progress in Retinal and Eye Research*, mai, 100975. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100975>.
- Brantly Mark L., Jeffrey D. Chulay, Lili Wang, Christian Mueller, Margaret Humphries, L. Terry Spencer, Farshid Rouhani, et al. 2009. « Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (38): 16363-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904514106>.
- Breuer Debra K., Beverly M. Yashar, Elena Filippova, Suja Hiriyanna, Robert H. Lyons, Alan J. Mears, Bersabell Asaye, et al. 2002. « A Comprehensive Mutation Analysis of RP2 and RPGR in a North American Cohort of Families with X-Linked Retinitis Pigmentosa ». *American Journal of Human Genetics* 70 (6): 1545-54. <https://doi.org/10.1086/340848>.
- Broderick Cathryn, Robert M. Hoek, John V. Forrester, Janet Liversidge, Jonathon D. Sedgwick, et Andrew D. Dick. 2002. « Constitutive Retinal CD200 Expression Regulates Resident Microglia and Activation State of Inflammatory Cells during Experimental Autoimmune Uveoretinitis ». *The American Journal of Pathology* 161 (5): 1669-77. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64444-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64444-6).
- Buck Thilo, et Jan Wijnholds. 2020. « Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors (RAAV)-Vector Elements in Ocular Gene Therapy Clinical Trials and Transgene Expression and Bioactivity Assays ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (12): 4197. <https://doi.org/10.3390/ijms21124197>.
- Calcedo Roberto, Suryanarayan Somanathan, Qiuyue Qin, Michael R. Betts, Andrew J. Rech, Robert H. Vonderheide, Christian Mueller, Terence R. Flotte, et James M. Wilson. 2017. « Class I-

- Restricted T-Cell Responses to a Polymorphic Peptide in a Gene Therapy Clinical Trial for α -1-Antitrypsin Deficiency ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (7): 1655-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617726114>.
- Campa C., C. E. Gallenga, E. Bolletta, et P. Perri. 2017. « The Role of Gene Therapy in the Treatment of Retinal Diseases: A Review ». *Current Gene Therapy* 17 (3): 194-213. <https://doi.org/10.2174/1566523217666171116170040>.
- Caspi Rachel R. 2011. « Understanding Autoimmune Uveitis through Animal Models The Friedenwald Lecture ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (3): 1873. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6909>.
- Chaffiol Antoine, Romain Caplette, Céline Jaillard, Elena Brazhnikova, Mélissa Desrosiers, Elisabeth Dubus, Laëtitia Duhamel, et al. 2017. « A New Promoter Allows Optogenetic Vision Restoration with Enhanced Sensitivity in Macaque Retina ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (11): 2546-60. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.07.011>.
- Chan Nicole Shu-Wen, Soon-Phaik Chee, Laure Caspers, et Bahram Bodaghi. 2017. « Review for Disease of the Year: Clinic of Cytomegalovirus-Induced Anterior Uveitis ». *Ocular Immunology and Inflammation*, novembre, 1-9. <https://doi.org/10.1080/09273948.2017.1394471>.
- Chandler Laurel C., Michelle E. McClements, Imran H. Yusuf, Cristina Martinez-Fernandez de la Camara, Robert E. MacLaren, et Kanmin Xue. 2021. « Characterizing the Cellular Immune Response to Subretinal AAV Gene Therapy in the Murine Retina ». *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 22 (septembre): 52-65. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.05.011>.
- Chang B., N. L. Hawes, R. E. Hurd, M. T. Davisson, S. Nusinowitz, et J. R. Heckenlively. 2002. « Retinal Degeneration Mutants in the Mouse ». *Vision Research* 42 (4): 517-25. [https://doi.org/10.1016/s0042-6989\(01\)00146-8](https://doi.org/10.1016/s0042-6989(01)00146-8).
- Chapot Camille A., Thomas Euler, et Timm Schubert. 2017. « How Do Horizontal Cells “Talk” to Cone Photoreceptors? Different Levels of Complexity at the Cone-Horizontal Cell Synapse ». *The Journal of Physiology*, avril. <https://doi.org/10.1113/JP274177>.
- Charlesworth Carsten T., Joab Camarena, M. Kyle Cromer, Sriram Vaidyanathan, Rasmus O. Bak, Jason M. Carte, Jason Potter, Daniel P. Dever, et Matthew H. Porteus. 2018. « Priming Human Repopulating Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for Cas9/SgRNA Gene Targeting ». *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 12 (septembre): 89-104. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.04.017>.
- Chinnery Holly R., Paul G. McMenamin, et Samantha J. Dando. 2017. « Macrophage Physiology in the Eye ». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 469 (3-4): 501-15. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1947-5>.
- Cideciyan Artur V., William W. Hauswirth, Tomas S. Aleman, Shalesh Kaushal, Sharon B. Schwartz, Sanford L. Boye, Elizabeth A.M. Windsor, et al. 2009. « Human RPE65 Gene Therapy for Leber Congenital Amaurosis: Persistence of Early Visual Improvements and Safety at 1 Year ». *Human Gene Therapy* 20 (9): 999-1004. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.086>.
- Cideciyan Artur V., Samuel G. Jacobson, William A. Beltran, Alexander Sumaroka, Malgorzata Swider, Simone Iwabe, Alejandro J. Roman, et al. 2013. « Human Retinal Gene Therapy for Leber Congenital Amaurosis Shows Advancing Retinal Degeneration despite Enduring Visual Improvement ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (6): E517-25. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218933110>.
- Coca-Prados Miguel. 2014. « The Blood-Aqueous Barrier in Health and Disease ». *Journal of Glaucoma* 23 (8 Suppl 1): S36-38. <https://doi.org/10.1097/IJG.0000000000000107>.
- Coenen-Stass Anna M. L., Matthew J. A. Wood, et Thomas C. Roberts. 2017. « Biomarker Potential of Extracellular MiRNAs in Duchenne Muscular Dystrophy ». *Trends in Molecular Medicine* 23 (11): 989-1001. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.09.002>.
- Cone Robert E., Subhasis Chattopadhyay, Roshan Pais, Sourojit Bhowmick, Roshanak Sharafieh, Yen Lemire, et James O'Rourke. 2010. « The Induction of Circulating, ACAID-Inducing Monocytes

- Requires CCR2/CCL2-Dependent Migration of Circulating F4/80(+) Cells into the Anterior Chamber ». *Ophthalmology and Eye Diseases* 2: 57-68. <https://doi.org/10.4137/OED.S6113>.
- Cosette Jeremie, Rym Ben Abdelwahed, Sabrina Donnou-Triffault, Catherine Sautès-Fridman, Patrice Flaud, et Sylvain Fisson. 2016. « Bioluminescence-Based Tumor Quantification Method for Monitoring Tumor Progression and Treatment Effects in Mouse Lymphoma Models ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 113 (juillet). <https://doi.org/10.3791/53609>.
- Cunha-Vaz J. 1979. « The Blood-Ocular Barriers ». *Survey of Ophthalmology* 23 (5): 279-96.
- Dalkara Deniz, Leah C. Byrne, Ryan R. Klimczak, Meike Visel, Lu Yin, William H. Merigan, John G. Flannery, et David V. Schaffer. 2013. « In Vivo-Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous ». *Science Translational Medicine* 5 (189): 189ra76-189ra76. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005708>.
- Damani Mausam R., Lian Zhao, Aurora M. Fontainhas, Juan Amaral, Robert N. Fariss, et Wai T. Wong. 2011. « Age-Related Alterations in the Dynamic Behavior of Microglia ». *Aging Cell* 10 (2): 263-76. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00660.x>.
- Daya Shyam, et Kenneth I. Berns. 2008. « Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors ». *Clinical Microbiology Reviews* 21 (4): 583-93. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-08>.
- Denniston Alastair K., et Pearse A. Keane. 2015. « Paravascular Pathways in the Eye: Is There an “Ocular Glymphatic System”? » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56 (6): 3955-56. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17243>.
- Deyle David R, et David W Russell. 2009. « Adeno-associated virus vector integration ». *Current opinion in molecular therapeutics* 11 (4): 442-47.
- DiCarlo James E., Vinit B. Mahajan, et Stephen H. Tsang. 2018. « Gene Therapy and Genome Surgery in the Retina ». *The Journal of Clinical Investigation* 128 (6): 2177-88. <https://doi.org/10.1172/JCI120429>.
- D’Orazio T. J., et J. Y. Niederkorn. 1998. « A Novel Role for TGF-Beta and IL-10 in the Induction of Immune Privilege ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160 (5): 2089-98.
- Doshi Rishi R., Sophie J. Bakri, et Anne E. Fung. 2011. « Intravitreal Injection Technique ». *Seminars in Ophthalmology* 26 (3): 104-13. <https://doi.org/10.3109/08820538.2010.541318>.
- Duebel Jens, Katia Marazova, et José-Alain Sahel. 2015. « Optogenetics ». *Current Opinion in Ophthalmology* 26 (3): 226-32. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000140>.
- Duncan Jacque L., Eric A. Pierce, Amy M. Laster, Stephen P. Daiger, David G. Birch, John D. Ash, Alessandro Iannaccone, et al. 2018. « Inherited Retinal Degenerations: Current Landscape and Knowledge Gaps ». *Translational Vision Science & Technology* 7 (4): 6-6. <https://doi.org/10.1167/tvst.7.4.6>.
- Dupont Jean-Baptiste, Benoît Tournaire, Christophe Georger, Béatrice Marolleau, Laurence Jeanson-Leh, Mireille Ledevin, Pierre Lindenbaum, et al. 2015. « Short-Lived Recombinant Adeno-Associated Virus Transgene Expression in Dystrophic Muscle Is Associated with Oxidative Damage to Transgene mRNA ». *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 2: 15010. <https://doi.org/10.1038/mtm.2015.10>.
- Edwards Thomas L., Charles L. Cotttriall, Kanmin Xue, Matthew P. Simunovic, James D. Ramsden, Eberhart Zrenner, et Robert E. MacLaren. 2018. « Assessment of the Electronic Retinal Implant Alpha AMS in Restoring Vision to Blind Patients with End-Stage Retinitis Pigmentosa ». *Ophthalmology* 125 (3): 432-43. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.09.019>.
- Ernst Martijn P. T., Mike Broeders, Pablo Herrero-Hernandez, Esmee Oussoren, Ans T. van der Ploeg, et W. W. M. Pim Pijnappel. 2020. « Ready for Repair? Gene Editing Enters the Clinic for the Treatment of Human Disease ». *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 18 (septembre): 532-57. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.06.022>.
- Errera Marie-Hélène, Solène Coisy, Christine Fardeau, José-Alain Sahel, Sofiene Kallel, Mark Westcott, Bahram Bodaghi, et Michel Paques. 2014. « Retinal Vasculitis Imaging by Adaptive Optics ». *Ophthalmology* 121 (6): 1311-1312.e2. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.12.036>.
- Farsaii Mahnoosh, et Victoria P. Connaughton. 1995. « All Amacrine Cells ». In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, édité par Helga Kolb, Eduardo Fernandez, et

- Ralph Nelson. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11548/>.
- Ferreira Valerie, Jaap Twisk, Karin Kwikkers, Eleonora Aronica, Diane Brisson, Julie Methot, Harald Petry, et Daniel Gaudet. 2014. « Immune Responses to Intramuscular Administration of Alipogene Tiparvovec (AAV1-LPL(S447X)) in a Phase II Clinical Trial of Lipoprotein Lipase Deficiency Gene Therapy ». *Human Gene Therapy* 25 (3): 180-88. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.169>.
- Feuer William J., Joyce C. Schiffman, Janet L. Davis, Vittorio Porciatti, Phillip Gonzalez, Rajeshwari D. Koilkonda, Huijun Yuan, Anil Lalwani, Byron L. Lam, et John Guy. 2016. « Gene Therapy for Leber Hereditary Optic Neuropathy: Initial Results ». *Ophthalmology* 123 (3): 558-70. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2015.10.025>.
- Fisson Sylvain, et Julie Vandomèle. 2017. « Bases fondamentales immunologiques ». In *Uvéite*, 2nd éd. Elsevier-Masson.
- Gomes Marleide da Mota. 2019. « Franz Nissl (1860-1919), Noted Neuropsychiatrist and Neuropathologist, Staining the Neuron, but Not Limiting It ». *Dementia & Neuropsychologia* 13 (3): 352-55. <https://doi.org/10.1590/1980-57642018dn13-030014>.
- Grégoire Sylvie, Céline Terrada, Gaëlle H. Martin, Gwladys Fourcade, Audrey Baeyens, Gilles Marodon, Sylvain Fisson, et al. 2016. « Treatment of Uveitis by In Situ Administration of Ex Vivo-Activated Polyclonal Regulatory T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 196 (5): 2109-18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501723>.
- Gross David-Alexandre, Pascal Chappert, Marylene Leboeuf, Virginie Monteilhet, Laetitia Van Wittenberghe, Olivier Danos, et Jean Davoust. 2006. « Simple Conditioning with Monospecific CD4+CD25+ Regulatory T Cells for Bone Marrow Engraftment and Tolerance to Multiple Gene Products ». *Blood* 108 (6): 1841-48. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-011981>.
- Gu Hongjing, Yaqian Gao, Shanshan Zhou, Fang Sun, Zhongpeng Zhao, Keyu Wang, Lingna Zhao, et al. 2018. « Bivalent Vaccine Platform Based on ca Influenza Virus Vaccine Elicits Protective Immunity against Human Adenoviruses ». *Antiviral Research*, mars. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.02.018>.
- Guignier B., K. Bourahla, V. Bekaert, D. Brasse, D. Gaucher, C. Speeg-Schatz, et T. Bourcier. 2013. « [Scintigraphic study of the lymphatic drainage of the anterior chamber of the mouse eye and its pathophysiological implications] ». *Journal Francais D'ophtalmologie* 36 (10): 836-42. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2012.11.021>.
- Guo Haitao, Justin B Callaway, et Jenny P-Y Ting. 2015. « Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics ». *Nature Medicine* 21 (7): 677-87. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>.
- Hamon Annaïg, Jérôme E. Roger, Xian-Jie Yang, et Muriel Perron. 2016. « Müller Glial Cell-Dependent Regeneration of the Neural Retina: An Overview across Vertebrate Model Systems ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 245 (7): 727-38. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24375>.
- Hauswirth William W., Tomas S. Aleman, Shalesh Kaushal, Artur V. Cideciyan, Sharon B. Schwartz, Lili Wang, Thomas J. Conlon, et al. 2008a. « Treatment of Leber Congenital Amaurosis Due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results of a Phase I Trial ». *Human Gene Therapy* 19 (10): 979-90. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.107>.
- Hauswirth William W. 2008b. « Treatment of Leber Congenital Amaurosis Due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results of a Phase I Trial ». *Human Gene Therapy* 19 (10): 979-90. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.107>.
- Heath William R., et Francis R. Carbone. 2001. « Cross-Presentation in Viral Immunity and Self-Tolerance ». *Nature Reviews Immunology* 1 (2): 126-34. <https://doi.org/10.1038/35100512>.
- Herzog Roland W. 2017. « Complexity of Immune Responses to AAV Transgene Products – Example of Factor IX ». *Cellular Immunology*, mai. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.05.006>.

- Hoek R. M., S. R. Ruuls, C. A. Murphy, G. J. Wright, R. Goddard, S. M. Zurawski, B. Blom, et al. 2000. « Down-Regulation of the Macrophage Lineage through Interaction with OX2 (CD200) ». *Science (New York, N.Y.)* 290 (5497): 1768-71. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1768>.
- Hong Sujeong, Sangjun Park, et Je-Wook Yu. 2011. « Pyrin Domain (PYD)-containing Inflammasome in Innate Immunity ». *Journal of Bacteriology and Virology* 41 (3): 133-46. <https://doi.org/10.4167/jbv.2011.41.3.133>.
- Hu Jun, Min Kong, Yuanzhen Ye, Siqi Hong, Li Cheng, et Li Jiang. 2014. « Serum MiR-206 and Other Muscle-Specific MicroRNAs as Non-Invasive Biomarkers for Duchenne Muscular Dystrophy ». *Journal of Neurochemistry* 129 (5): 877-83. <https://doi.org/10.1111/jnc.12662>.
- Jacobson Samuel G., Gregory M. Acland, Gustavo D. Aguirre, Tomas S. Aleman, Sharon B. Schwartz, Artur V. Cideciyan, Caroline J. Zeiss, et al. 2006. « Safety of Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2-RPE65 Vector Delivered by Ocular Subretinal Injection ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 13 (6): 1074-84. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.03.005>.
- Jacobson Samuel G., Sanford L. Boye, Tomas S. Aleman, Thomas J. Conlon, Caroline J. Zeiss, Alejandro J. Roman, Artur V. Cideciyan, et al. 2006. « Safety in Nonhuman Primates of Ocular AAV2-RPE65, a Candidate Treatment for Blindness in Leber Congenital Amaurosis ». *Human Gene Therapy* 17 (8): 845-58. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.17.845>.
- Jacobson Samuel G., Artur V. Cideciyan, Alejandro J. Roman, Alexander Sumaroka, Sharon B. Schwartz, Elise Heon, et William W. Hauswirth. 2015a. « Improvement and Decline in Vision with Gene Therapy in Childhood Blindness ». *New England Journal of Medicine* 372 (20): 1920-26. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412965>.
- Jacobson 2015b. « Improvement and Decline in Vision with Gene Therapy in Childhood Blindness ». *New England Journal of Medicine* 372 (20): 1920-26. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412965>.
- Jiang L. Q., et J. W. Streilein. 1991. « Immune Privilege Extended to Allogeneic Tumor Cells in the Vitreous Cavity ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 32 (1): 224-28.
- Joussemet Béatrice, Brahim Belbellaa, Alexandra Mendes-Madeira, Thomas Bucher, Delphine Briot-Nivard, Laurence Dubreil, Marie-Anne Colle, Yan Cherel, Philippe Moullier, et Fabienne Rolling. 2011. « Neonatal Systemic Delivery of ScAAV9 in Rodents and Large Animals Results in Gene Transfer to RPE Cells in the Retina ». *Experimental Eye Research* 93 (4): 491-502. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.06.012>.
- Karlstetter Marcus, Stefanie Ebert, et Thomas Langmann. 2010. « Microglia in the Healthy and Degenerating Retina: Insights from Novel Mouse Models ». *Immunobiology* 215 (9-10): 685-91. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.010>.
- Kashiwakura Yuji, Kenji Tamayose, Kazuhisa Iwabuchi, Yukihiko Hirai, Takashi Shimada, Kunio Matsumoto, Toshikazu Nakamura, Masami Watanabe, Kazuo Oshimi, et Hiroyuki Daida. 2005. « Hepatocyte Growth Factor Receptor Is a Coreceptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Infection ». *Journal of Virology* 79 (1): 609-14. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.609-614.2005>.
- Kawai Taro, et Shizuo Akira. 2007. « Antiviral Signaling through Pattern Recognition Receptors ». *Journal of Biochemistry* 141 (2): 137-45. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm032>.
- Kettenmann Helmut, Uwe-Karsten Hanisch, Mami Noda, et Alexei Verkhratsky. 2011. « Physiology of Microglia ». *Physiological Reviews* 91 (2): 461-553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>.
- Kezuka T., J. Sakai, N. Usui, J. W. Streilein, et M. Usui. 2001. « Evidence for Antigen-Specific Immune Deviation in Patients with Acute Retinal Necrosis ». *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)* 119 (7): 1044-49. <https://doi.org/10.1001/archophth.119.7.1044>.
- Khabou Hanen, Chloé Cordeau, Laure Pacot, Sylvain Fisson, et Deniz Dalkara. 2018a. « Dosage Thresholds and Influence of Transgene Cassette in AAV-Related Toxicity ». *Human Gene Therapy*, août. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.144>.
- Khabou Hanen, 2018b. « Dosage Thresholds and Influence of Transgene Cassette in AAV-Related Toxicity ». *Human Gene Therapy*, août. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.144>.

- Khabou Hanen, et Deniz Dalkara. 2015. « La conception de vecteurs adaptés à la thérapie génique oculaire ». *médecine/sciences* 31 (5): 529-37. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153105015>.
- Khabou Hanen, Mélissa Desrosiers, Céline Winckler, Stéphane Fouquet, Gwenaëlle Auregan, Alexis-Pierre Bemelmans, José-Alain Sahel, et Deniz Dalkara. 2016. « Insight into the Mechanisms of Enhanced Retinal Transduction by the Engineered AAV2 Capsid Variant -7m8 ». *Biotechnology and Bioengineering* 113 (12): 2712-24. <https://doi.org/10.1002/bit.26031>.
- Khabou Hanen, Marcela Garita-Hernandez, Antoine Chaffiol, Sacha Reichman, Céline Jaillard, Elena Brazhnikova, Stéphane Bertin, et al. 2018. « Noninvasive Gene Delivery to Foveal Cones for Vision Restoration ». *JCI Insight* 3 (2): 96029. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96029>.
- Klimczak Ryan R., James T. Koerber, Deniz Dalkara, John G. Flannery, et David V. Schaffer. 2009. « A Novel Adeno-Associated Viral Variant for Efficient and Selective Intravitreal Transduction of Rat Müller Cells ». *PloS One* 4 (10): e7467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007467>.
- Kotterman M. A., L. Yin, J. M. Strazzeri, J. G. Flannery, W. H. Merigan, et D. V. Schaffer. 2015a. « Antibody Neutralization Poses a Barrier to Intravitreal Adeno-Associated Viral Vector Gene Delivery to Non-Human Primates ». *Gene Therapy* 22 (2): 116-26. <https://doi.org/10.1038/gt.2014.115>.
- Kotterman M. A., 2015b. « Antibody Neutralization Poses a Barrier to Intravitreal Adeno-Associated Viral Vector Gene Delivery to Non-Human Primates ». *Gene Therapy* 22 (2): 116-26. <https://doi.org/10.1038/gt.2014.115>.
- Kurniawan Emil D., John R. Roche, Sukhpal S. Sandhu, et Penelope J. Allen. 2017. « Predictors of Visual Outcome and the Role of Early Vitrectomy in Streptococcal Endophthalmitis ». *Clinical & Experimental Ophthalmology*, septembre. <https://doi.org/10.1111/ceo.13077>.
- Lamkanfi Mohamed, et Vishva M. Dixit. 2014. « Mechanisms and Functions of Inflammasomes ». *Cell* 157 (5): 1013-22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.007>.
- Le Meur G., K. Stieger, A. J. Smith, M. Weber, J. Y. Deschamps, D. Nivard, A. Mendes-Madeira, et al. 2007. « Restoration of Vision in RPE65-Deficient Briard Dogs Using an AAV Serotype 4 Vector That Specifically Targets the Retinal Pigmented Epithelium ». *Gene Therapy* 14 (4): 292-303. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302861>.
- Le Meur G., Pierre Lebranchu, Fanny Billaud, Oumeya Adjali, Sébastien Schmitt, Stéphane Béziau, Yann Péréon, et al. 2017. « Safety and Long-Term Efficacy of AAV4 Gene Therapy in Patients with RPE65 Leber Congenital Amaurosis ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, septembre. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.09.014>.
- Lebherz Corinna, Albert Maguire, Waixing Tang, Jean Bennett, et James M. Wilson. 2008a. « Novel AAV Serotypes for Improved Ocular Gene Transfer ». *The Journal of Gene Medicine* 10 (4): 375-82. <https://doi.org/10.1002/jgm.1126>.
- Lebherz Corinna, 2008b. « Novel AAV Serotypes for Improved Ocular Gene Transfer ». *The Journal of Gene Medicine* 10 (4): 375-82. <https://doi.org/10.1002/jgm.1126>.
- Leborgne Christian, Elena Barbon, Jeffrey M. Alexander, Hayley Hanby, Sandrine Delignat, Daniel M. Cohen, Fanny Collaud, et al. 2020. « IgG-Cleaving Endopeptidase Enables in Vivo Gene Therapy in the Presence of Anti-AAV Neutralizing Antibodies ». *Nature Medicine* 26 (7): 1096-1101. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0911-7>.
- Lee Sun Young, Shinichi Usui, Abu-Bakr Zafar, Brian C. Oveson, Young-Joon Jo, Lili Lu, Solmaz Masoudi, et Peter A. Campochiaro. 2011. « N-Acetylcysteine Promotes Long-Term Survival of Cones in a Model of Retinitis Pigmentosa ». *Journal of Cellular Physiology* 226 (7): 1843-49. <https://doi.org/10.1002/jcp.22508>.
- Léveillard Thierry, et José-Alain Sahel. 2010. « Rod-Derived Cone Viability Factor for Treating Blinding Diseases: From Clinic to Redox Signaling ». *Science Translational Medicine* 2 (26): 26ps16. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000866>.
- Leveziel N., C. Delcourt, J. Zerbib, H. Dollfus, J. Kaplan, P. Benlian, G. Coscas, E. H. Souied, et G. Soubrane. 2009. « [Epidemiology of age related macular degeneration] ». *Journal Français D'ophtalmologie* 32 (6): 440-51. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2009.04.009>.

- Li Qihong, Rehae Miller, Ping-Yang Han, Jijing Pang, Astra Dinculescu, Vince Chiodo, et William W. Hauswirth. 2008a. « Intraocular Route of AAV2 Vector Administration Defines Humoral Immune Response and Therapeutic Potential ». *Molecular Vision* 14: 1760.
- Li Qihong, 2008b. « Intraocular Route of AAV2 Vector Administration Defines Humoral Immune Response and Therapeutic Potential ». *Molecular Vision* 14: 1760.
- Liang Katharine J., Jung Eun Lee, Yunqing D. Wang, Wenxin Ma, Aurora M. Fontainhas, Robert N. Fariss, et Wai T. Wong. 2009. « Regulation of Dynamic Behavior of Retinal Microglia by CX3CR1 Signaling ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50 (9): 4444-51. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3357>.
- Liu Y. L., K. Wagner, N. Robinson, D. Sabatino, P. Margaritis, W. Xiao, et R. W. Herzog. 2003. « Optimized Production of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus in Roller Bottles ». *BioTechniques* 34 (1): 184-89.
- Liu Ying, Huiling Hu, Meixin Liang, Yunfan Xiong, Kang Li, Mengfei Chen, Zhigang Fan, et al. 2017. « Regulated Differentiation of WERI-Rb-1 Cells into Retinal Neuron-like Cells ». *International Journal of Molecular Medicine* 40 (4): 1172-84. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3102>.
- Liudahl Shannon M., et Lisa M. Coussens. 2018. « Chapter 8 - To Help or To Harm: Dynamic Roles of CD4+ T Helper Cells in Solid Tumor Microenvironments ». In *Immunology*, édité par M. A. Hayat, 97-116. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809819-6.00008-3>.
- MacLachlan Timothy K., Michael Lukason, Margaret Collins, Robert Munger, Elisabete Isenberger, Cindy Rogers, Shana Malatos, et al. 2011. « Preclinical Safety Evaluation of AAV2-SFLT01-a Gene Therapy for Age-Related Macular Degeneration ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (2): 326-34. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.258>.
- MacLaren Robert E. 2009. « An analysis of retinal gene therapy clinical trials: successful translation will depend on successful translation ». *Current opinion in molecular therapeutics* 11 (5): 540-46.
- MacLaren Robert E, Markus Groppe, Alun R Barnard, Charles L Cottrill, Tanya Tolmachova, Len Seymour, K Reed Clark, et al. 2014. « Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial ». *The Lancet* 383 (9923): 1129-37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62117-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62117-0).
- Maeda Akiko, Michiko Mandai, et Masayo Takahashi. 2019. « Gene and Induced Pluripotent Stem Cell Therapy for Retinal Diseases ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 20 (1): 201-16. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083118-015043>.
- Maeder Morgan L, et Charles A Gersbach. 2016. « Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy ». *Molecular Therapy* 24 (3): 430-46. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.10>.
- Maeder Morgan L., Michael Stefanidakis, Christopher J. Wilson, Reshica Baral, Luis Alberto Barrera, George S. Bounoutas, David Bumcrot, et al. 2019. « Development of a Gene-Editing Approach to Restore Vision Loss in Leber Congenital Amaurosis Type 10 ». *Nature Medicine* 25 (2): 229-33. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0327-9>.
- Maguire Albert M., Katherine A. High, Alberto Auricchio, J. Fraser Wright, Eric A. Pierce, Francesco Testa, Federico Mingozzi, et al. 2009. « Age-Dependent Effects of RPE65 Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis: A Phase 1 Dose-Escalation Trial ». *Lancet (London, England)* 374 (9701): 1597. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61836-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61836-5).
- Maguire Albert M., Francesca Simonelli, Eric A. Pierce, Edward N. Pugh, Jr, Federico Mingozzi, Jeannette Bennicelli, et al. 2008a. « Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis ». *The New England Journal of Medicine* 358 (21): 2240. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802315>.
- Maguire Albert M., 2008b. « Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis ». *The New England Journal of Medicine* 358 (21): 2240. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802315>.
- Manno Catherine S., Glenn F. Pierce, Valder R. Arruda, Bertil Glader, Margaret Ragni, John J. Rasko, John Rasko, et al. 2006. « Successful Transduction of Liver in Hemophilia by AAV-Factor IX and Limitations Imposed by the Host Immune Response ». *Nature Medicine* 12 (3): 342-47. <https://doi.org/10.1038/nm1358>.

- Martino Ashley T., et David M. Markusic. 2020. « Immune Response Mechanisms against AAV Vectors in Animal Models ». *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 17 (juin): 198-208. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.12.008>.
- Matonti F., S. Roux, D. Denis, S. Picaud, et F. Chavane. 2015. « Cécité et réhabilitation visuelle ». *Journal Français d'Ophthalmologie* 38 (2): 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2014.06.012>.
- McPherson Scott W., Neal D. Heuss, Ute Lehman, et Dale S. Gregerson. 2011. « Generation of Regulatory T Cells to Antigen Expressed in the Retina ». *Current Immunology Reviews* 7 (3): 344-49. <https://doi.org/10.2174/157339511796196584>.
- Mellor Andrew L., et David H. Munn. 2004. «IDO Expression by Dendritic Cells: Tolerance and Tryptophan Catabolism». *Nature Reviews Immunology* 4 (10): 762-74. <https://doi.org/10.1038/nri1457>.
- Mendell Jerry R., Katherine Campbell, Louise Rodino-Klapac, Zarife Sahenk, Chris Shilling, Sarah Lewis, Dawn Bowles, et al. 2010. «Dystrophin Immunity in Duchenne's Muscular Dystrophy ». *The New England Journal of Medicine* 363 (15): 1429-37. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1000228>.
- Miller Joan W., et Luk H. Vandenberghe. 2018. « Breaking and Sealing Barriers in Retinal Gene Therapy ». *Molecular Therapy* 26 (9): 2081-82. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.08.003>.
- Mingozzi Federico, et Katherine A. High. 2013. « Immune Responses to AAV Vectors: Overcoming Barriers to Successful Gene Therapy ». *Blood* 122 (1): 23-36. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-306647>.
- Mingozzi Federico, Marcela V. Maus, Daniel J. Hui, Denise E. Sabatino, Samuel L. Murphy, John E. J. Rasko, Margaret V. Ragni, et al. 2007. « CD8(+) T-Cell Responses to Adeno-Associated Virus Capsid in Humans ». *Nature Medicine* 13 (4): 419-22. <https://doi.org/10.1038/nm1549>.
- Mingozzi Federico, Janneke J. Meulenberg, Daniel J. Hui, Etiena Basner-Tschakarjan, Nicole C. Hasbrouck, Shyrie A. Edmonson, Natalie A. Hutnick, 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 (10): 2077-86. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-167510>.
- Mittrücker Hans-Willi, Alexander Visekruna, et Magdalena Huber. 2014. « Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8⁺ T Cells ». *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 62 (6): 449-58. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y>.
- Moore S., et S. Thanos. 1996. « The Concept of Microglia in Relation to Central Nervous System Disease and Regeneration ». *Progress in Neurobiology* 48 (4-5): 441-60. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)00051-8](https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)00051-8).
- Muhuri Manish, Yukiko Maeda, Hong Ma, Sanjay Ram, Katherine A. Fitzgerald, Phillip W. L. Tai, et Guangping Gao. 2021. « Overcoming Innate Immune Barriers That Impede AAV Gene Therapy Vectors ». *The Journal of Clinical Investigation* 131 (1). <https://doi.org/10.1172/JCI143780>.
- Murphy Samuel L., Hojun Li, Federico Mingozzi, Denise E. Sabatino, Daniel J. Hui, Shyrie A. Edmonson, et Katherine A. High. 2009. « Diverse IgG Subclass Responses to Adeno-Associated Virus Infection and Vector Administration ». *Journal of Medical Virology* 81 (1): 65-74. <https://doi.org/10.1002/jmv.21360>.
- Nakamura Takahiko, Ania Terajewicz, et Joan Stein-Streilein. 2005. « Mechanisms of Peripheral Tolerance Following Intracameral Inoculation Are Independent of IL-13 or STAT6 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (4): 2643-46. <https://doi.org/10.1167/iov.02-0595>.
- Nakao Shintaro, Ali Hafezi-Moghadam, et Tatsuro Ishibashi. 2012. « Lymphatics and Lymphangiogenesis in the Eye ». *Journal of Ophthalmology* 2012: 783163. <https://doi.org/10.1155/2012/783163>.
- Narfström Kristina, Ragnheidur Bragadóttir, T. Michael Redmond, P. Elizabeth Rakoczy, Theo van Veen, et Anitha Bruun. 2003. « Functional and Structural Evaluation after AAV.RPE65 Gene Transfer in the Canine Model of Leber's Congenital Amaurosis ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 533: 423-30.
- Nidetz Natalie F., Michael C. McGee, Longping V. Tse, Chengwen Li, Le Cong, Yunxing Li, et Weishan Huang. 2020. « Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Immune Responses:

- Understanding Barriers to Gene Delivery ». *Pharmacology & Therapeutics* 207 (mars): 107453. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107453>.
- Nieder Korn Jerry Y. 2007. « The Induction of Anterior Chamber-Associated Immune Deviation ». *Chemical Immunology and Allergy* 92: 27-35. <https://doi.org/10.1159/000099251>.
- Nieder Korn Jerry Y. 2009. « Immune Escape Mechanisms of Intraocular Tumors ». *Progress in retinal and eye research* 28 (5): 329-47. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.06.002>.
- Paglinawan Rey, Ursula Malipiero, Ralph Schlapbach, Karl Frei, Walter Reith, et Adriano Fontana. 2003. « TGFbeta Directs Gene Expression of Activated Microglia to an Anti-Inflammatory Phenotype Strongly Focusing on Chemokine Genes and Cell Migratory Genes ». *Glia* 44 (3): 219-31. <https://doi.org/10.1002/glia.10286>.
- Pearson R. A., A. C. Barber, M. Rizzi, C. Hippert, T. Xue, E. L. West, Y. Duran, et al. 2012. « Restoration of Vision after Transplantation of Photoreceptors ». *Nature* 485 (7396): 99-103. <https://doi.org/10.1038/nature10997>.
- Perez V. L., A. M. Saeed, Y. Tan, M. Urbiet, et F. Cruz-Guilloty. 2013. « The eye: A window to the soul of the immune system ». *Journal of Autoimmunity*, Abul Abbas: An epitome of scholarship, 45 (septembre): 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.06.011>.
- Petit Lolita, Elsa Lh riteau, Michel Weber, Guylène Le Meur, Jack-Yves Deschamps, Nathalie Provost, Alexandra Mendes-Madeira, et al. 2012. « Restoration of Vision in the Pde6 -Deficient Dog, a Large Animal Model of Rod-Cone Dystrophy ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (11): 2019-30. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.134>.
- Peyman Gholam A., Eleonora M. Lad, et Darius M. Moshfeghi. 2009. « INTRAVITREAL INJECTION OF THERAPEUTIC AGENTS ». *RETINA* 29 (7): 875-912. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e3181a94f01>.
- Planul Arthur, et Deniz Dalkara. 2017. « Vectors and Gene Delivery to the Retina ». *Annual review of vision science* 3 (septembre): 121-40. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-102016-061413>.
- Provis Jan M. 2001. « Development of the Primate Retinal Vasculature ». *Progress in Retinal and Eye Research* 20 (6): 799-821. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(01\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(01)00012-X).
- Rabinowit Joseph, Ying Kai Chan, et Richard Jude Samulski. 2019. « Adeno-Associated Virus (AAV) versus Immune Response ». *Viruses* 11 (2): 102. <https://doi.org/10.3390/v11020102>.
- Ramachandran Pavitra S., Vivian Lee, Zhangyong Wei, Ji Yun Song, Giulia Casal, Therese Cronin, Keirnan Willett, et al. 2016a. « Evaluation of Dose and Safety of AAV7m8 and AAV8BP2 in the Non-Human Primate Retina ». *Human Gene Therapy*, octobre. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.111>.
- Ramachandran Pavitra S. 2016b. « Evaluation of Dose and Safety of AAV7m8 and AAV8BP2 in the Non-Human Primate Retina ». *Human Gene Therapy*, octobre. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.111>.
- Rizzolo Lawrence J., Shaomin Peng, Yan Luo, et Wei Xiao. 2011. « Integration of Tight Junctions and Claudins with the Barrier Functions of the Retinal Pigment Epithelium ». *Progress in Retinal and Eye Research* 30 (5): 296-323. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.06.002>.
- Rogers Geoffrey L., Ashley T. Martino, Irene Zolotukhin, Hildegund C. J. Ertl, et Roland W. Herzog. 2014. « Role of the Vector Genome and Underlying Factor IX Mutation in Immune Responses to AAV Gene Therapy for Hemophilia B ». *Journal of Translational Medicine* 12 (janvier): 25. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-25>.
- Rogers Geoffrey L., Masataka Suzuki, Irene Zolotukhin, David M. Markusic, Laurence M. Morel, Brendan Lee, Hildegund C. J. Ertl, et Roland W. Herzog. 2015. « Unique Roles of TLR9- and MyD88-Dependent and -Independent Pathways in Adaptive Immune Responses to AAV-Mediated Gene Transfer ». *Journal of Innate Immunity* 7 (3): 302-14. <https://doi.org/10.1159/000369273>.
- Ronzitti Giuseppe, David-Alexandre Gross, et Federico Mingozzi. 2020. « Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors ». *Frontiers in Immunology* 11 (avril): 670. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00670>.
- Sahel José Alain, et Deniz Dalkara. 2019. « Gene Therapy for Retinal Dystrophy ». *Nature Medicine* 25 (2): 198-99. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0346-1>.

- Sahel José-Alain, Elise Boulanger-Scemama, Chloé Pagot, Angelo Arleo, Francesco Galluppi, Joseph N. Martel, Simona Degli Esposti, et al. 2021. « Partial Recovery of Visual Function in a Blind Patient after Optogenetic Therapy ». *Nature Medicine* 27 (7): 1223-29. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01351-4>.
- Santallier, Martine, Pêchereau Jocelyne, et Pêchereau, Alain. 2008. « Anatomie pour les écoles d'Orthoptie, v1.0 ». A & J Pêchereau.
- Santos Ana M., Ruth Calvente, Mohamed Tassi, Maria-Carmen Carrasco, David Martín-Oliva, José L. Marín-Teva, Julio Navascués, et Miguel A. Cuadros. 2008. « Embryonic and Postnatal Development of Microglial Cells in the Mouse Retina ». *Journal of Comparative Neurology* 506 (2): 224-39. <https://doi.org/10.1002/cne.21538>.
- Schafer Dorothy P., Emily K. Lehrman, Amanda G. Kautzman, Ryuta Koyama, Alan R. Mardinly, Ryo Yamasaki, Richard M. Ransohoff, Michael E. Greenberg, Ben A. Barres, et Beth Stevens. 2012. « Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner ». *Neuron* 74 (4): 691-705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>.
- Schimmel Andrew M., Linu Abraham, Douglas Cox, Abdoulaye Sene, Courtney Kraus, Dru S. Dace, Nuran Ercal, et Rajendra S. Apte. 2011. « N-Acetylcysteine Amide (NACA) Prevents Retinal Degeneration by up-Regulating Reduced Glutathione Production and Reversing Lipid Peroxidation ». *The American Journal of Pathology* 178 (5): 2032-43. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.01.036>.
- Schwartz Steven D., Carl D. Regillo, Byron L. Lam, Dean Elliott, Philip J. Rosenfeld, Ninel Z. Gregori, Jean-Pierre Hubschman, et al. 2015. « Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium in Patients with Age-Related Macular Degeneration and Stargardt's Macular Dystrophy: Follow-up of Two Open-Label Phase 1/2 Studies ». *Lancet (London, England)* 385 (9967): 509-16. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61376-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3).
- Simon Cardillia-Joe, José-Alain Sahel, Jens Duebel, Stefan Herlitze, et Deniz Dalkara. 2020. « Opsins for Vision Restoration ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 527 (2): 325-30. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.117>.
- Simonelli Francesca, Albert M. Maguire, Francesco Testa, Eric A. Pierce, Federico Mingozzi, Jeannette L. Bennicelli, Settimio Rossi, et al. 2010. « Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis Is Safe and Effective through 1.5 Years after Vector Administration ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (3): 643-50. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.277>.
- Simonelli Francesca, Carmela Ziviello, Francesco Testa, Settimio Rossi, Elisa Fazzi, Paolo Emilio Bianchi, Maurizio Fossarello, et al. 2007. « Clinical and Molecular Genetics of Leber's Congenital Amaurosis: A Multicenter Study of Italian Patients ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (9): 4284-90. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0068>.
- Spadoni Ilaria, Giulia Fornasa, et Maria Rescigno. 2017. « Organ-Specific Protection Mediated by Cooperation between Vascular and Epithelial Barriers ». *Nature Reviews Immunology* 17 (12): 761-73. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.100>.
- Sparrow J. R., G. P. Matthews, T. Iwamoto, R. Ross, A. Gershbein, et S. Chang. 1993. « Retinal Tolerance to Intravitreal Perfluoroethylcyclohexane Liquid in the Rabbit ». *Retina (Philadelphia, Pa.)* 13 (1): 56-62.
- Srivastava Arun. 2016. « In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors ». *Current Opinion in Virology, Virus-vector interactions / Viral gene therapy, vector host-interactions*, 21 (décembre): 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.08.003>.
- St. Paul Michael, et Pamela S. Ohashi. 2020. « The Roles of CD8+ T Cell Subsets in Antitumor Immunity ». *Trends in Cell Biology* 30 (9): 695-704. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.003>.
- Stein-Streilein Joan. 2013. « Mechanisms of Immune Privilege in the Posterior Eye ». *International Reviews of Immunology* 32 (1): 42-56. <https://doi.org/10.3109/08830185.2012.740535>.
- Stein-Streilein Joan, et J. Wayne Streilein. 2002. « Anterior Chamber Associated Immune Deviation (ACAID): Regulation, Biological Relevance, and Implications for Therapy ». *International Reviews of Immunology* 21 (2-3): 123-52.

- Stieger Knut, Elsa Lh riteau, Elsa Lh ariteau, Phillip Moullier, et Fabienne Rolling. 2009. « AAV-Mediated Gene Therapy for Retinal Disorders in Large Animal Models ». *ILAR Journal* 50 (2): 206-24.
- Streilein J. W. 1987. « Immune Regulation and the Eye: A Dangerous Compromise ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1 (3): 199-208.
- Streilein J. W. 1995a. « Immunological Non-Responsiveness and Acquisition of Tolerance in Relation to Immune Privilege in the Eye ». *Eye (London, England)* 9 (Pt 2): 236-40. <https://doi.org/10.1038/eye.1995.46>.
- Streilein J. W. 1995b. « Ocular Immune Privilege in the Immunosuppressive Intraocular Microenvironment ». *Ocular Immunology and Inflammation* 3 (2): 139-44. <https://doi.org/10.3109/09273949509085042>.
- Streilein J. W., et J. Y. Niederkorn. 1981. « Induction of Anterior Chamber-Associated Immune Deviation Requires an Intact, Functional Spleen ». *The Journal of Experimental Medicine* 153 (5): 1058-67.
- Sun H., R. Liang, B. Yang, Y. Zhou, M. Liu, F. Fang, J. Ding, Y. Fan, et G. Hu. 2016. « Aquaporin-4 Mediates Communication between Astrocyte and Microglia: Implications of Neuroinflammation in Experimental Parkinson's Disease ». *Neuroscience* 317 (mars): 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.003>.
- Tatour Yasmin, et Tamar Ben-Yosef. 2020. « Syndromic Inherited Retinal Diseases: Genetic, Clinical and Diagnostic Aspects ». *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 10 (10): E779. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10100779>.
- Taylor Andrew W., Pascale Alard, David G. Yee, et J. Wayne Streilein. 1997. « Aqueous humor induces transforming growth factor-  (TGF- )-producing regulatory T-cells ». *Current Eye Research* 16 (9): 900-908. <https://doi.org/10.1076/ceyr.16.9.900.5043>.
- Taylor Sarah, Claudia J. Calder, Julie Albon, Jonathan T. Erichsen, Micheal E. Boulton, et James E. Morgan. 2011. « Involvement of the CD200 Receptor Complex in Microglia Activation in Experimental Glaucoma ». *Experimental Eye Research* 92 (5): 338-43. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.01.012>.
- Thanos S. 1992. « Sick Photoreceptors Attract Activated Microglia from the Ganglion Cell Layer: A Model to Study the Inflammatory Cascades in Rats with Inherited Retinal Dystrophy ». *Brain Research* 588 (1): 21-28. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91340-k](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91340-k).
- Treuting Piper M., Rachel Wong, Daniel C. Tu, et Isabella Phan. 2012. « 21 - Special Senses: Eye ». In *Comparative Anatomy and Histology*, 395-418. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00021-4>.
- Tse Longping V., Sven Moller-Tank, et Aravind Asokan. 2015. « Strategies to circumvent humoral immunity to adeno-associated viral vectors ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 15 (6): 845-55. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1035645>.
- Tso M. O. 1982. « Pathology of Cystoid Macular Edema ». *Ophthalmology* 89 (8): 902-15. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(82\)34698-9](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(82)34698-9).
- « Update from the Seventy-Fourth World Health Assembly – 27 May 2021 ». s. d. Consulté le 1 septembre 2021. <https://www.who.int/news/item/27-05-2021-update-from-the-seventy-fourth-world-health-assembly-27-may-2021>.
- Uvéite - Bahram Bodaghi, Phuc Lehoang. 2017. <https://www.decitre.fr/livres/uveite-9782810101191.html>.
- Vandenberghe Luk H., Peter Bell, Albert M. Maguire, Cassia N. Cearley, Ru Xiao, Roberto Calcedo, Lili Wang, et al. 2011. « Dosage Thresholds for AAV2 and AAV8 Photoreceptor Gene Therapy in Monkey ». *Science Translational Medicine* 3 (88): 88ra54. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002103>.
- Vandenberghe Luk H., Peter Bell, Albert M. Maguire, Ru Xiao, Tim B. Hopkins, Rebecca Grant, Jean Bennett, et James M. Wilson. 2013. « AAV9 Targets Cone Photoreceptors in the Nonhuman Primate Retina ». *PloS One* 8 (1): e53463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053463>.

- Veleri Shobi, Csilla H. Lazar, Bo Chang, Paul A. Sieving, Eyal Banin, et Anand Swaroop. 2015. « Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models ». *Disease Models & Mechanisms* 8 (2): 109-29. <https://doi.org/10.1242/dmm.017913>.
- Vendomèle Julie, Safa Dehmani, Quentin Khebizi, Anne Galy, et Sylvain Fisson. 2018a. « Subretinal Injection of HY Peptides Induces Systemic Antigen-Specific Inhibition of Effector CD4⁺ and CD8⁺ T-Cell Responses ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00504>.
- Vendomèle Julie 2018b. « Subretinal Injection of HY Peptides Induces Systemic Antigen-Specific Inhibition of Effector CD4⁺ and CD8⁺ T-Cell Responses ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00504>.
- Vendomèle Julie, Quentin Khebizi, et Sylvain Fisson. 2017a. « Cellular and Molecular Mechanisms of Anterior Chamber-Associated Immune Deviation (ACAID): What We Have Learned from Knockout Mice ». *Frontiers in Immunology* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01686>.
- Vendomèle Julie 2017b. « Cellular and Molecular Mechanisms of Anterior Chamber-Associated Immune Deviation (ACAID): What We Have Learned from Knockout Mice ». *Frontiers in Immunology* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01686>.
- Verbakel Sanne K., Ramon A. C. van Huet, Camiel J. F. Boon, Anneke I. den Hollander, Rob W. J. Collin, Caroline C. W. Klaver, Carel B. Hoyng, Ronald Roepman, et B. Jeroen Klevering. 2018. « Non-Syndromic Retinitis Pigmentosa ». *Progress in Retinal and Eye Research* 66 (septembre): 157-86. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.03.005>.
- Verdera Helena Costa, Klaudia Kuranda, et Federico Mingozzi. 2020. « AAV Vector Immunogenicity in Humans: A Long Journey to Successful Gene Transfer ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 28 (3): 723-46. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.12.010>.
- Veske A., S. E. Nilsson, K. Narfström, et A. Gal. 1999. « Retinal Dystrophy of Swedish Briard/Briard-Beagle Dogs Is Due to a 4-Bp Deletion in RPE65 ». *Genomics* 57 (1): 57-61. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5754>.
- Vyas Jatin M., Annemarie G. Van der Veen, et Hidde L. Ploegh. 2008. « The Known Unknowns of Antigen Processing and Presentation ». *Nature Reviews Immunology* 8 (8): 607-18. <https://doi.org/10.1038/nri2368>.
- Wang L., O. Cao, B. Swalm, E. Dobrzynski, F. Mingozzi, et R. W. Herzog. 2005. « Major Role of Local Immune Responses in Antibody Formation to Factor IX in AAV Gene Transfer ». *Gene Therapy* 12 (19): 1453-64. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302539>.
- Wang Y., I. Goldschneider, D. Foss, D. Y. Wu, J. O'Rourke, et R. E. Cone. 1997. « Direct Thymic Involvement in Anterior Chamber-Associated Immune Deviation: Evidence for a Nondeletional Mechanism of Centrally Induced Tolerance to Extrathymic Antigens in Adult Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 158 (5): 2150-55.
- Weber Michel, Joseph Rabinowitz, Nathalie Provost, Hervé Conrath, Sébastien Folliot, Delphine Briot, Yan Chérel, et al. 2003. « Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 4 Mediates Unique and Exclusive Long-Term Transduction of Retinal Pigmented Epithelium in Rat, Dog, and Nonhuman Primate after Subretinal Delivery ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 7 (6): 774-81.
- Weiland James D., et Mark S. Humayun. 2014. « Retinal Prosthesis ». *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 61 (5): 1412-24. <https://doi.org/10.1109/TBME.2014.2314733>.
- Weleber Richard G., Mark E. Pennesi, David J. Wilson, Shalesh Kaushal, Laura R. Erker, Lauren Jensen, Maureen T. McBride, et al. 2016a. « Results at 2 Years after Gene Therapy for RPE65-Deficient Leber Congenital Amaurosis and Severe Early-Childhood-Onset Retinal Dystrophy ». *Ophthalmology* 123 (7): 1606-20. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2016.03.003>.
- Weleber Richard G. 2016b. « Results at 2 Years after Gene Therapy for RPE65-Deficient Leber Congenital Amaurosis and Severe Early-Childhood-Onset Retinal Dystrophy ». *Ophthalmology* 123 (7): 1606-20. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2016.03.003>.
- Weltgesundheitsorganisation, éd. 1997. *Strategies for the Prevention of Blindness in National Programmes: A Primary Health Care Approach*. 2nd ed. Geneva: World Health Organization.

- Wenkel H., et J. W. Streilein. 1998. « Analysis of immune deviation elicited by antigens injected into the subretinal space. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39 (10): 1823-34.
- Wilson Christopher J., Tim Fennell, Anne Bothmer, Morgan L. Maeder, Deepak Reyon, Cecilia Cotta-Ramusino, Cecilia A. Fernandez, et al. 2018. « Response to “Unexpected Mutations after CRISPR–Cas9 Editing in Vivo” ». *Nature Methods* 15 (4): 236-37. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4552>.
- « World Sight Day: 10 October ». s. d. Consulté le 1 septembre 2021. <https://www.who.int/news/item/10-10-2002-world-sight-day-10-october>.
- Wostyn Peter, Veva De Groot, Debby Van Dam, Kurt Audenaert, Peter Paul De Deyn, et Hanspeter Esriel Killer. 2016. « The Glymphatic System: A New Player in Ocular Diseases? Letters ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 57 (13): 5426-27. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20262>.
- Wu Te-Lang, Hua Li, Susan M. Faust, Emily Chi, Shangzhen Zhou, Fraser Wright, Katherine A. High, et Hildegund C. J. Ertl. 2014. « CD8+ T Cell Recognition of Epitopes within the Capsid of Adeno-Associated Virus 8-Based Gene Transfer Vectors Depends on Vectors' Genome ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 22 (1): 42-51. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.218>.
- Xiong Wenjun, David M. Wu, Yunlu Xue, Sean K. Wang, Michelle J. Chung, Xuke Ji, Parimal Rana, Sophia R. Zhao, Shuyi Mai, et Constance L. Cepko. 2019. « AAV Cis-Regulatory Sequences Are Correlated with Ocular Toxicity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (12): 5785-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821000116>.
- Xu Heping, Mei Chen, et John V. Forrester. 2009. « Para-Inflammation in the Aging Retina ». *Progress in Retinal and Eye Research* 28 (5): 348-68. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.06.001>.
- Xu Heping, Mei Chen, Eric J. Mayer, John V. Forrester, et Andrew D. Dick. 2007. « Turnover of Resident Retinal Microglia in the Normal Adult Mouse ». *Glia* 55 (11): 1189-98. <https://doi.org/10.1002/glia.20535>.
- Yang Shuo, Si-qi Ma, Xing Wan, Heng He, Han Pei, Min-jian Zhao, Chen Chen, et al. 2016. « Long-term outcomes of gene therapy for the treatment of Leber's hereditary optic neuropathy ». *EBioMedicine* 10 (août): 258-68. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.07.002>.
- Yin Lu, Kenneth Greenberg, Jennifer J. Hunter, Deniz Dalkara, Kathleen D. Kolstad, Benjamin D. Masella, Robert Wolfe, et al. 2011. « Intravitreal Injection of AAV2 Transduces Macaque Inner Retina ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (5): 2775-83. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6250>.
- Yuk Jae-Min, et Eun-Kyeong Jo. 2011. « Toll-like Receptors and Innate Immunity ». *Journal of Bacteriology and Virology* 41 (4): 225. <https://doi.org/10.4167/jbv.2011.41.4.225>.
- Zaiss A. K., et D. A. Muruve. 2008. « Immunity to Adeno-Associated Virus Vectors in Animals and Humans: A Continued Challenge ». *Gene Therapy* 15 (11): 808-16. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.54>.
- Zaiss Anne-Kathrin, Qiang Liu, Gloria P. Bowen, Norman C. W. Wong, Jeffrey S. Bartlett, et Daniel A. Muruve. 2002. « Differential Activation of Innate Immune Responses by Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors ». *Journal of Virology* 76 (9): 4580-90. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.9.4580-4590.2002>.
- Zhu Jiangao, Xiaopei Huang, et Yiping Yang. 2009. « The TLR9-MyD88 Pathway Is Critical for Adaptive Immune Responses to Adeno-Associated Virus Gene Therapy Vectors in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (8): 2388-98. <https://doi.org/10.1172/JCI37607>.

Legends

Table 1. Characteristics for each clinical trial. The table gathers detailed parameters for the intraocular injection modalities, immuno-suppressive treatment, immuno-monitoring read outs, and disease names. AAV2: Adeno-associated virus; AMD: Age-related macular degeneration; CBA: Chicken beta actin; CBA/CBSB: Chicken beta actin; CHM: Choroideremia; CMV: Cytomegalovirus; ELISpot: Enzyme-linked immunospot; hCHM: human Choroideremia (Rab escort protein 1) gene; hRPE65: human Retinal pigmented epithelium 65 gene; hRPE65p: human Retinal pigmented epithelium 65 promotor; hRPE65v2: human Retinal pigmented epithelium 65 promotor version 2; IVT: Intra-vitreous; LCA: Leber's congenital amaurosis; LFM: Laser flare meter; LHON: Leber hereditary optic neuropathy; ND: Not determined; ND4: NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit 4 gene; P1ND4v2: ?; scAAV2: ?; sFLT-01: ?; sFLT-1: ?; SR: Sub-retinal; vg: Vector genome

Table 2. Classification of the main parameters for the different clinical trials. AAV2: Adeno-associated virus; AMD: Age-related macular degeneration; CHM: Choroideremia; hCHM: human Choroideremia (Rab escort protein 1) gene; hRPE65: human Retinal pigmented epithelium 65 gene; hRPE65v2: human Retinal pigmented epithelium 65 promotor version 2; LCA: Leber's congenital amaurosis; LFM: Laser flare meter; LHON: Leber hereditary optic neuropathy; ND4: NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit 4 gene; P1ND4v2: ?; scAAV2: ?; sFLT-01: ?; sFLT-1: ?; vg: Vector genome

Figure 1: Principal component analysis of clinical trials and immunosuppressive parameters. (A) Individual factor map (B) Analysis by variables. ANTI-H-CAP: Anti-capsid humoral response; ANTI-C-CAP: Anti-capsid cellular response (by ELISpot); IS: Immunosuppression; OI: Ocular inflammation; PATHO: Pathology; PR: Promotor; SITE: Site of injection; ST: Serotype. The four numbers (*i.e.* 1380) corresponding to the last 4 numbers of NCT (*i.e.* 1380 for NCT02161380).

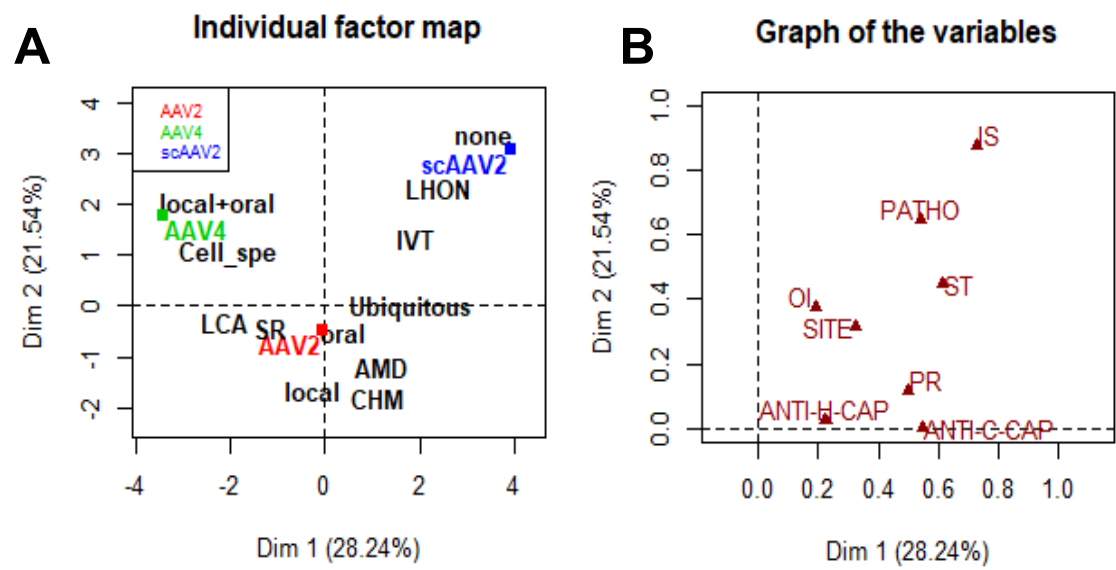
Table 1

Pathology	Clinical trial number	Site of injection	Vector					Local			Oral		Ocular inflammation	Immuno-monitoring				References	
			Serotype	Promoter	Transgene	Volume (μL)	Dose (vg)	Molecule	Posology		Molecule	Posology		Anti-capsid		Anti-transgene			
									Administration	Timing (days)				Cellular		Humoral	Cellular		Humoral
														ELISpot	Proliferation				
LCA	NCT00643747	SR	AAV2	hRPE65p	hRPE65	1000	1E+11 ; 1E+12	Betamethasone	subconjunctival	Day of injection	Prednisolone	1 week before injection (0.5mg/kg/day) + 2 months post-injection (starting at 1mg/kg/day and progressively decreasing)	3/12	0/12	ND	3/12	ND	0/12	(Bainbridge et al., 2008); (Bainbridge et al., 2015)
LCA	NCT00481546	SR	AAV2	CBA/CB ^{ab}	hRPE65	150 ; 200 ; 225 ; 300 ; 450	5.96E10	Steroids	subconjunctival + topical	Day of injection + 20 days post-injection	-	-	0/14	1/14	2/14	ND	ND	ND	(Hauswirth et al., 2008) ; (Cideciyan et al., 2009) ; (Jacobson et al., 2012)
LCA	NCT00516477	SR	AAV2	CBA	hRPE65v2	150 ; 300	1.5E+10 ; 4.8E+10 ; 1.5E+11	-	-	-	Prednisolone	3 days before injection (1mg/kg/day) + 7 days post-injection (starting at 0.5mg/kg/day and progressively decreasing)	0/12	0/12	ND	7/10	1/12	1/12	(Maguire et al., 2008) ; (Maguire et al., 2009) ; (Simonelli et al., 2010) ; (Mellillo et al., 2012)
LCA	NCT01208389 (re-administration of NCT00516477)	SR	AAV2	CBA	hRPE65v2	300	1.5E11	-	-	-	Prednisolone	3 days before injection (1mg/kg/day) + 7 days post-injection (starting at 0.5mg/kg/day and progressively decreasing)	1/11	2/11	ND	2/11	2/11	1/11	(Bennett et al., 2012a) ; (Bennett et al., 2016)
LCA	NCT01496040	SR	AAV4	hRPE65p	hRPE65	200 ; 300 ; 330 ; 530 ; 700 ; 770 ; 800	1.22E+10 ; 1.83E+10 ; 2.01E+10 ; 3.23E+10 ; 4.27E+10 ; 4.7E+10 ; 4.8E+10	Dexamethasone-tobramycin	topical	3 times / day during 1 month post-injection	Prednisolone	1 week before injection (0.5mg/kg/day) + 1 month post-injection (starting at 1mg/kg/day and progressively decreasing)	3/9 (subclinical by LFM)	1/9	ND	3/9	1/9	ND	(Le Meur et al., 2017)
AMD	NCT01024998	IVT	AAV2	CBA	sFLT-01	100	2E+8 ; 2E+9; 6E+9 ; 2E+10	Corticosteroids	topical	In 1 patient with intraocular inflammation	-	-	1/19	ND*	ND	ND	ND	ND	(Heier et al., 2017) Personal communication
AMD	NCT01494805 (Phase 1)	SR	AAV2	CMV	sFLT-1	100	1E+10 ; 1E+11	Prednisolone	topical	4 times/day during 3 days post-injection	-	-	0/6	2/6	ND	1/6	ND	ND	(Rakoczy et al., 2015) ; (Constable et al., 2017)
AMD	NCT01494805 (Phase 2a)	SR	AAV2	CMV	sFLT-1	100	1,00E+11	Prednisolone	topical	4 times/day during 3 days post-injection	-	-	2/21	0/21	ND	9 seronegative before -> 3/9 seropositive after	ND	ND	(Constable et al., 2016)
LHON	NCT01267422	IVT	AAV2	CMV	ND4	50	5E+9 ; 1E+10	-	-	-	Prednisolone	1 week before injection (0.5mg/kg/day) + 2 months post-injection (starting at 1mg/kg/day and progressively decreasing)	0/9	ND	ND	0/9	ND	ND	(Yang et al., 2016a) ; (Wan et al., 2016)
LHON	NCT02161380	IVT	scAAV2	Ubiquitous	PIND4v2	200	5E+9 ; 2.46E+10	-	-	-	-	-	0/5	ND	ND	1/5	ND	ND	(Feuer et al., 2016)
LHON	NCT02064569	IVT	AAV2	CMV	ND4	180	9E9 ; 3E10 ; 9E10 ; 1.8E11	Fluorometholone	topical	Adapted for each patient	Prednisone	Adapted for each patient	13/15	ND	ND	ND	ND	ND	(Vignal et al., 2018) Personal communication
								Dexamethasone											
CHM	NCT01461213	SR	AAV2	CBA	hCHM	100	0.6E+10 ; 1E+10	-	-	-	Prednisolone	2 days before injection (1mg/kg/day) + 10 days post-injection	0/6	2/6	ND	ND	2/6	ND	(MacLaren et al., 2014)

Table 2

		References
Disease	LCA (RPE65 mutation)	NCT00481546 ; NCT00643747 ; NCT00516477 ; NCT01208389 ; NCT01496040
	Choroideremia (CHM mutation)	NCT01461213
	AMD (Non genetic factor)	NCT01024998 ; NCT01494805 (Phase I, II)
	LHON (ND4 mutation)	NCT02161380 ; NCT01267422 ; NCT02064569
Transgene	hRPE65	NCT00481546 ; NCT00643747 ; NCT01496040
	hRPE65v2	NCT00516477 ; NCT01208389
	hCHM	NCT01461213
	sFLT-01	NCT01024998
	sFLT-1	NCT01494805 (Phase I, II)
	P1ND4v2	NCT02161380
	ND4	NCT01267422 ; NCT02064569
Vector	Type of vector	rAAV2/2
		rAAV2/4
	Administration	Subretinal
		Intravitreal
	Injected dose (vg)	10e8
		10e9
		10e10
		10e11
		10e12
		<100
	Volume (μL)	100 - 300
		301 - 600
		> 600
Immunosuppressive treatment	Immunosuppressive molecule	None
		Betamethasone
		Dexamethasone
		Corticosteroids or steroids
		Fluorometholone
		Prednisone
		Prednisolone
	Route of administration	Nothing
		Oral
		Topical
		Oral + topical
		Subconjunctival

Figure 1



Abbreviations

AAV2: Adeno-associated virus;

AMD: Age-related macular degeneration;

ANTI-C-CAP: Anti-capsid cellular response (by ELISpot)

ANTI-H-CAP: Anti-capsid humoral response

CBA/CBSB: Chicken beta actin;

CBA: Chicken beta actin;

CHM: Choroideremia;

CMV: Cytomegalovirus

ELISpot: Enzyme-linked immunospot

hCHM: human Choroideremia (Rab escort protein 1) gene

hRPE65: human Retinal pigmented epithelium 65 gene

hRPE65p: human Retinal pigmented epithelium 65 promotor

hRPE65v2: human Retinal pigmented epithelium 65 promotor version 2

IS: Immunosuppression

IVT: Intra-vitreous

LCA: Leber's congenital amaurosis

LFM: Laser flare meter

LHON: Leber hereditary optic neuropathy

ND4: NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit 4 gene

OI: Ocular inflammation

P1ND4v2:

PATHO: Pathology

PR: Promotor

scAAV2:

sFLT-01:

sFLT-1:

SITE: Site of injection

SR: Sub-retinal

ST: Serotype

TextND: Not determined

vg: Vector genome

Titre : Etude des mécanismes inflammatoires et de stratégies immuno-modulatrices après transfert de gène intraoculaire

Mots clés : Virus adéno-associé (AAV) ; Injection sous-rétinienne ; Inflammation ; Lymphocytes T ; Immuno-modulation (SRAII) ; ACAID.

Résumé : L'injection sous-rétinienne de vecteurs de thérapie génique du virus adéno-associé (AAV) peut traiter avec succès plusieurs maladies rétinienne héréditaires. Cependant, certains patients présentent des manifestations inflammatoires malgré l'utilisation d'agents immunosuppresseurs non spécifiques. L'œil est connu pour être un site immunoprivilégié, mais des réponses immunitaires anti-capside et anti-transgène ont été rapportées chez certains patients, contribuant peut-être à la perte des cellules transduites. Cela nous a incité à évaluer, dans des modèles murins de type sauvage et de pathologie oculaire, si le transfert sous-rétinien de gènes par AAV entraîne une immunisation contre le transgène. Pour mieux comprendre comment les réactions immunitaires se développent dans l'espace sous-rétinien suite la thérapie génique par AAV et peuvent être contrôlées, nous utilisons des souris et un système antigénique HY mâle bien défini. Nous avons précédemment rapporté que l'injection d'un transfert de gène sous-rétinien médié par le vecteur AAV8 déclenche une réponse systémique des cellules T anti-transgène. Nous avons également rapporté qu'un antigène introduit dans l'espace sous-rétinien peut fournir une immunosuppression systémique spécifique de l'antigène, appelée inhibition immunitaire associée à la zone sous-rétinienne (SRAII). Ici, nous avons caractérisé les réponses immunitaires systémiques après une injection sous-rétinienne de vecteur rAAV8 ou la co-injection de rAAV8 avec les peptides HY (produit du transgène) dans les modèles murins C57Bl/6J et rd10. Le transgène exprime l'antigène mâle HY qui contient des épitopes de cellules T restreintes par le CMH de classe I et de classe II, qui sont immuno-dominants chez les souris femelles H-2b. Après être immunisées au jour 14 (HY :CFA), les réponses immunitaires analysées au jour 21 ont révélé que : (i) l'injection sous-rétinienne d'AAV8-PGK-GFP-HY déclenche des réponses systémiques Th1/Tc1 anti-transgène primaires et mémoires chez les deux modèles de souris, et (ii) la co-injection simultanée d'AAV8 et de peptides HY a inhibé les réponses primaires et mémoires spécifiques des cellules T CD8+ et CD4+ contre HY dans les deux modèles de souris. Le phénomène SRAII semble être un puissant mécanisme immuno-modulateur spécifique de l'antigène dans le cadre de la thérapie génique oculaire. Puisque nous avons confirmé ces résultats dans le contexte physiopathologique de rd10, la co-injection du produit du transgène et du vecteur thérapeutique peut être considérée comme une nouvelle stratégie immuno-modulatrice pour contrôler les réactions inflammatoires dans le contexte de la thérapie génique oculaire.

Title : Study of inflammatory mechanisms and immunomodulatory strategies after intraocular gene transfer

Keywords : Adeno-associated virus (AAV) ; Subretinal injection ; Inflammation ; T-cells ; Immunomodulation (SRAII) ; ACAID.

Abstract : Subretinal injection of adeno-associated virus (AAV) gene therapy vectors can successfully treat several inherited retinal diseases. However, some patients display inflammatory events despite the use of non-specific immunosuppressive agents. The eye is known as an immune-privileged site but anti-capsid and anti-transgene immune responses have been reported in some patients, possibly contributing to the loss of transduced cells. This prompted us to evaluate in wild type and ocular pathophysiological murine models whether subretinal rAAV gene transfer leads to an anti-transgene immunization. To better understand how immune reactions to AAV gene therapy occur in the ocular compartment and can be controlled, we are using mice and a well-defined HY male antigenic system. We previously reported that the injection of AAV8 vector-mediated subretinal gene transfer triggers a systemic anti-transgene T-cell response. We also related that an antigen introduced into the subretinal space can provide a systemic antigen-specific immunosuppression referred to as subretinal-associated immune inhibition (SRAII). Here, we characterized the systemic immune responses following a co-injection of rAAV2/8 and HY peptides subretinal gene transfer in two mice models. The transgene expresses the HY male antigen which contains MHC class I and class II-restricted T-cell epitopes, that are immuno-dominant in H-2^b female mice. At day 14, mice were challenged (HY:CFA), and the immune responses analyzed at day 21 revealed that: (i) subretinal injection of rAAV8-PGK-GFP-HY trigger systemic primary and memory anti-transgene Th1/Tc1 responses in both mice models, and (ii) the simultaneous co-injection of rAAV8-PGK-GFP-HY vector and of HY peptides inhibited both CD8⁺ and CD4⁺ T-cell specific primary and memory responses against HY in both mice models. SRAII phenomenon seems to be a powerful antigen-specific immunomodulatory mechanism in retinal gene delivery. Since we have confirmed these results in the rd10 pathophysiological context, co-injection of the transgene product and the therapeutic vector may be considered as a new immunomodulatory strategy to control inflammatory reactions in the context of ocular gene therapy.