

## Thèse de Doctorat

Valentin LE GUEN

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

**École doctorale :** *Ecole Doctorale Biologie Santé*

**Discipline :** *Biologie, Médecine, Santé*

**Spécialité :** *Immunologie*

**Unité de recherche :** *INSERM UMR 1064, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie*

**Soutenue le** 11/07/2016

**Thèse N° :** 06

# Induction de la tolérance allogénique par transfert de gène dans le foie

## JURY

Rapporteurs : **Federico MINGOZZI**, Directeur de Recherche, Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)  
**Christian LEGUERN**, Professeur, Sorbonne-Universités, UPMC Paris

Examineurs : **Nathalie LABARRIERE**, Directrice de Recherche, Université de Nantes  
**Jean-Pierre COUTY**, Maître de conférences, Université de Paris Diderot (Paris VII)

Directeur de Thèse : **Sophie CONCHON**, Chargée de Recherche, Université de Nantes



## Remerciements :

*Au moment de présenter ma thèse, je tiens à remercier les membres du jury, pour avoir accepté de mettre à contribution leur expertise pour évaluer, juger et discuter de ce travail :*

*Le Pr Christian LeGuern et le Dr Federico Mingozi, en leur qualité de rapporteurs,  
Le Dr Nathalie Labarrière et le Dr Jean-Pierre Couty, en leur qualité d'examineurs.*

*Je tiens aussi à remercier très sincèrement le Docteur Sophie Conchon, qui a dirigé ma thèse au cours de ces 4 années (et demies). J'ai apprécié nos discussions, ton implication constante et ton enthousiasme. Ils m'ont permis d'avoir continuellement envie d'expliquer et de comprendre ce qui parfois était difficile à comprendre.*

*En grand merci aussi à Jean-paul Judor, à Vanessa Gauttier et à Françoise Boeffard qui ont apporté leur soutien technique, intellectuel et moral. Vous avez rendu ce travail plus qu'agréable. Je crois qu'on peut dire qu'on s'est bien marré ! Merci à Charlotte et à nouveau à Vanessa pour avoir libéré un peu de votre temps pour relire et corriger l'ensemble de ce manuscrit.*

*Merci aussi à mes différents voisins de bureau, Marion, PJ, Lyssia, Nicolas, Lola, Janina, avec qui ont pu avoir de nombreuses discussions scientifiques mais pas seulement ... Vive le sport, vive la Bretagne, vive les discussions en tout genre, vive les « ça me casse la tête ».*

*C'est sans doute grâce à vous que ces années passées à Nantes ont été aussi sympas, merci aux copains de promo (Allan, Olivier), d'escalade, de hand, de musique, de Bretagne et partout ailleurs... parce qu'il y a une vie avant le travail et que vous en faites complètement partie !*

*Merci à l'ensemble des membres du laboratoire, aux doctorants, aux techniciens animaliers, merci aussi au Docteur Sophie Brouard qui m'a accueillie dans son équipe et au Docteur Ignacio Anegón, directeur du Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie.*

***Je voudrais dédier ce travail :***

*A ma maman, à mon petit frère, pour tout l'amour que vous savez transmettre,*

*A Emilie, ma belle, qui a toujours cru en moi et avec qui la vie est une réelle aventure,*

*A mon père, éternellement présent dans mon cœur,*

# Tables des Matières

<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>6</b>
<b>Liste des figures et des tableaux.....</b>	<b>8</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>9</b>
<i>Partie 1 : La transplantation et ses problématiques .....</i>	<i>10</i>
I- Généralités sur la transplantation .....	10
II- Le rejet immun du greffon .....	11
1- En clinique.....	11
2- L'immunité innée dans les phases précoces du rejet de greffe.....	12
3- L'allorecognition et l'activation des lymphocytes T alloréactifs .....	13
a- Les alloantigènes impliqués dans le rejet de greffe.....	13
b- La reconnaissance directe .....	16
c- La reconnaissance indirecte .....	19
d- La reconnaissance semi-directe .....	19
4- Les signaux de costimulation.....	20
5- La différenciation des lymphocytes T oriente la réaction de rejet.....	21
6- L'importance de la réponse humorale dans le rejet de greffe.....	22
III- Les traitements immunosuppresseurs .....	23
1- Les principaux traitements utilisés en transplantation .....	23
2- Problèmes associés à la prise de traitements immunosuppresseurs.....	25
<i>Partie 2 : Les mécanismes de la tolérance .....</i>	<i>26</i>
I- Définitions de la tolérance.....	26
II- La tolérance centrale.....	28
III- La tolérance périphérique .....	29
1- La délétion clonale .....	29
2- L'ignorance et la ségrégation antigénique .....	30
3- La tolérisation des lymphocytes T.....	30
a- Les principaux récepteurs inhibiteurs responsables de la tolérisation des L <sub>T</sub> .....	31
b- L'anergie et la tolérance adaptative.....	31
4- L'épuisement cellulaire.....	32
a- Preuves expérimentales et caractérisation.....	32
b- L'engagement constant du TCR et l'inhibition de PD-1 participent à l'induction et au maintien de l'épuisement .....	33
c- D'autres facteurs favorisent le développement de l'épuisement .....	35
d- L'épuisement comme état de différenciation du L <sub>T</sub> .....	35
e- L'anergie et l'épuisement : deux états distincts de dysfonction des L <sub>T</sub> .....	36
5- La déviation immune .....	36
IV- Les L <sub>Treg</sub> suppriment les réactions immunes en périphérie .....	37
1- Les L <sub>T</sub> CD4 <sup>+</sup> régulateurs .....	37
2- Les L <sub>T</sub> CD8 <sup>+</sup> régulateurs .....	39
a- Définition .....	39
b- Les mécanismes de suppression des L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> .....	42
c- Les L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> en transplantation.....	43
V- Les lymphocytes T effecteurs et anergiques participent au maintien de la tolérance .....	44
VI- La tolérance en transplantation.....	45
1- La tolérance opérationnelle.....	45

2-	L'induction de la tolérance à la greffe : nouvelles stratégies et problématiques .....	46
a-	Induire un chimérisme.....	46
b-	Thérapies cellulaires basées sur l'utilisation de L <sub>Treg</sub> .....	47
c-	Orientation de la présentation antigénique : utilisation de CPAs tolérogènes.....	47
d-	Les problèmes de la thérapie cellulaire en transplantation .....	48
<b>Partie 3 : Le foie, haut lieu de la tolérance immunologique.....</b>		<b>49</b>
I-	Généralités et anatomie du foie .....	49
II-	Le foie vu comme un organe lymphoïde impliqué dans la tolérance immunologique .....	51
1-	Une multitude de réactions immunitaires siègent dans le foie.....	51
2-	Immunité innée dans le foie .....	52
3-	Présentation de l'antigène dans le foie.....	53
a-	Les cellules dendritiques.....	54
b-	Les cellules de Kupffer.....	54
c-	Les cellules non spécialisées dans la présentation de l'antigène .....	55
4-	L'activation des lymphocytes T dans le foie contribue à leur tolérisation .....	56
a-	L'architecture hépatique facilite l'activation des lymphocytes T <i>in situ</i> .....	56
b-	Preuves expérimentales de l'activation des L <sub>T</sub> CD8 <sup>+</sup> dans le foie.....	57
c-	L'épuisement des L <sub>T</sub> CD8 <sup>+</sup> contribue au développement de pathologies hépatiques.....	59
d-	Facteurs cellulaires et moléculaires favorisant l'épuisement dans le foie .....	60
e-	Les L <sub>T</sub> CD4 <sup>+</sup> activés dans le foie acquièrent un profil régulateur.....	62
III-	Le foie, une cible importante en thérapie génique .....	63
1-	Le traitement des maladies héréditaires : une réussite clinique.....	66
2-	Restaurer la tolérance dans les maladies autoimmunes .....	67
3-	Limiter la réponse allogénique en transplantation .....	68
4-	Les modèles expérimentaux de transfert de gène dans le foie contribuent à la compréhension des mécanismes d'induction de la tolérance dans le foie.....	69
<b>Partie 4 : Synthèse du projet.....</b>		<b>71</b>
<b>Résultats .....</b>		<b>73</b>
<i>Article</i> : Alloantigen gene transfer to hepatocytes promotes tolerance to pancreatic islet graft by inducing CD8+ regulatory T cells .....		75
<b>Discussion .....</b>		<b>108</b>
I-	L'expression d'alloantigènes dans le foie est une stratégie qui induit la tolérance en transplantation chez la souris.....	109
1-	La tolérance allogénique a été observée dans différents modèles de greffe .....	109
2-	L'absence de DSA comme facteur facilitant la survie des greffons ? .....	110
3-	La tolérance induite est spécifique, systématique et pourrait être « infectieuse » .....	112
II-	Les L <sub>T</sub> CD8 <sup>+</sup> hépatiques spécifiques de H-2K <sup>d</sup> : épuisés ou régulateurs ? .....	114
1-	Les L <sub>T</sub> CD8 <sup>+</sup> spécifiques de H-2K <sup>d</sup> sont régulateurs .....	114
2-	Caractérisation des L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> spécifiques de H-2K <sup>d</sup> .....	116
3-	Les L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> spécifiques de H-2K <sup>d</sup> , proches voisins des L <sub>T</sub> CD8 <sup>+</sup> épuisés ? .....	118
III-	Importance de l'expression de H-2K <sup>d</sup> à la membrane des hépatocytes dans l'induction des L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> .....	120
IV-	Du développement préclinique à l'utilisation chez l'homme .....	122
<b>Bibliographie .....</b>		<b>124</b>

## Liste des abréviations

AAV :	Adeno Associated Virus (ou Virus Adéno Associé)
Ad :	Adénovirus
ADCC :	Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ou Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps)
Alb :	Albumine
ASM :	Acide sphingomyélinase
BCR :	B Cell Receptor (ou Récepteur des Cellules B)
CD :	Clusters of Differentiation (ou Clusters de Différenciation)
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
ConA :	Concanavaline A
CPA :	Cellule Présentatrice de l'Antigène
CSH :	Cellules Souche Hématopoïétique
CTL :	Cytotoxic T Lymphocyte (ou Lymphocyte T Cytotoxique)
CTLA-4 :	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
DAMP :	Damage-Associated Molecular Pattern molecules (motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires)
DC :	Dendritic Cell (ou Cellules Dendritiques)
DSA :	Donor Specific Antibody (ou Anticorps Spécifiques du Donneur)
EAE :	Experimental autoimmune encephalomyelitis (ou Encéphalomyélite autoimmune expérimentale)
FIX :	Facteur IX de coagulation
GAA :	Acid Alpha-Glucosidase (ou Acide Alpha-Glucosidase)
GFP :	Green Fluorescent Protein (ou protéine de fluorescence verte)
GITR :	Glucocorticoid-Induced TNFR family Related gene
GvHD :	Graft versus Host Disease (ou réaction du greffon contre l'hôte)
hAAT :	Alpha 1-Antitrypsine humaine
HBV :	Hepatitis B Virus (ou Virus de l'hépatite B)
HCV :	Hepatitis C Virus (ou Virus de l'hépatite C)
HSC :	Hepatic Stellate Cell (ou cellules étoilées du foie)
ICOS :	Inducible T-cell COStimulator
IDO :	Indoléamine 2,3-Dioxygénase
IFN :	Interferon
IL :	Interleukine

ITIM :	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif (ou motif d'inhibition de l'immunorécepteur dépendant de la tyrosine)
ITR :	Inverted Terminal Repeat Sequences (ou séquences terminales répétées inverse)
ITSM :	Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif
KC :	Kupffer Cell (ou Cellules de Kupffer)
L <sub>B</sub> :	Lymphocyte B
LCMV:	Lymphocytic Choriomeningitis Virus (ou virus de la chorioméningite lymphocytaire)
LSEC :	Liver Sinusoidal Endothelial Cell (ou cellules endothéliale des sinusoides hépatiques)
LPS :	Lipopolysaccharide
L <sub>T</sub> :	Lymphocyte T
L <sub>TH</sub> :	Lymphocyte T Helper
L <sub>TFH</sub> :	Lymphocyte T Follicular Helper
MBP :	Myelin Basic Protein (ou protéine basique de la myéline)
MDSC :	Myeloid-Derived Suppressor Cell (ou cellule myéloïde suppressive)
Met :	Metallothionéine
MSC :	Mesenchymal Stem Cell (pour cellules souches mésenchymateuses)
mTTR :	methyl Transthyréine
NK :	Natural Killer cell
NKT :	Natural Killer T cell
NLR :	Nod-Like Receptor
OLS :	Organe Lymphoïde Secondaire
OVA :	Ovalbumine
PAMP :	Pathogen Associated Molecular Pattern (ou motifs moléculaires associés aux pathogènes)
PD-1 :	Programmed Death-1
PRR :	Pattern Recognition Receptor (ou récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires)
STZ :	Streptozotocine
TCR :	T Cell Receptor (ou récepteur des cellules T)
TGFβ :	Transforming Growth Factor β (ou facteur de croissance transformant β)
TIM :	T-cell immunoglobulin and Mucin domain
TLR :	Toll-Like Receptor
TNF :	Tumour Necrosis Factor (ou facteur de nécrose tumorale)
TRAIL :	Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine

# Liste des figures et tableaux

## Figures

Figure 1	Les voies de reconnaissance des alloantigènes en transplantation.....	16
Figure 2	Représentation schématique des deux hypothèses de l'allorecognition .....	18
Figure 3	Schéma résumant les mécanismes d'action des principaux traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation.....	24
Figure 4	Les définitions de la tolérance .....	27
Figure 5	Les mécanismes de tolérisation des lymphocytes T .....	30
Figure 6	Synthèse schématique des facteurs cellulaires et moléculaires participant à l'épuisement du $L_T$ .....	33
Figure 7	Les principaux mécanismes de suppression des $L_{Treg} CD4^+$ .....	38
Figure 8	Les principaux mécanismes de suppression des $L_{Treg} CD8^+$ .....	42
Figure 9	La microanatomie du foie.....	49
Figure 10	Représentation schématique de la microanatomie du foie et la localisation des principales cellules présentant les antigènes hépatocellulaire .....	54
Figure 11	L'activation des lymphocytes T dans le foie .....	57
Figure 12	Le blocage de PD-1/PD-L1 restaure la réponse humorale.....	111
Figure 13	Les $L_T CD8^+$ hépatiques spécifiques de H-2K <sup>d</sup> expriment plus faiblement le complexe TCR-CD3.....	114
Figure 14	La déplétion des $L_T CD8^+$ empêche le développement de la survie à long terme .....	115
Figure 15	Les $L_{Treg} CD8^+$ transférés sont localisés dans le foie et détectés dans la zone de greffe .....	116
Figure 16	L'hépatite aiguë induite par la ConA ne cause pas la perte d'expression de H-2K <sup>d</sup> dans le foie .....	117
Figure 17	Les $L_{Treg} CD8^+$ prolifèrent en présence de CPAs H-2K <sup>d+</sup> .....	119
Figure 18	L'injection d'AAV H-2K <sup>d</sup> soluble entraîne une réponse spécifique de H-2K <sup>d</sup> .....	121
Figure 19	Le blocage de H-2K <sup>d</sup> à la membrane des CPAs à l'aide d'un anticorps inhibe la sécrétion d'IL-10 par les $L_T CD8^+$ hépatiques .....	122

## Tableaux

Tableau 1	Complexe H-2 de la souris.....	14
Tableau 2	Complexe HLA humain .....	14
Tableau 3	Les différentes souches de souris utilisées en laboratoire et leur haplotype H-2 .....	15
Tableau 4	Les différentes sous populations de $L_{TH}$ impliquées dans le rejet de greffe .....	22
Tableau 5	Les différentes populations de $L_{Treg} CD8^+$ décrites chez la souris et le rat.....	40
Tableau 6	Les différentes populations de $L_{Treg} CD8^+$ décrites chez le singe et l'homme .....	41
Tableau 7	Ratios des animaux développant un hépatome, en fonction du type de cellules tumorales injectées ou de l'expression hépatique de H-2K <sup>d</sup> .....	120

## Encarts

Encart 1	Système H-2 : haplotypes et modèles de greffe.....	15
Encart 2	Les vecteurs AAV .....	64

# Introduction

# INTRODUCTION

## Partie 1 : La transplantation et ses problématiques

La transplantation est une avancée thérapeutique majeure du XX<sup>ème</sup> siècle. Elle permet le remplacement d'organes présentant des dysfonctions importantes par un greffon fonctionnel provenant d'un autre individu. Après une brève introduction apportant des généralités sur la transplantation, cette partie aura pour objectif de définir les mécanismes de rejet immuns en focalisant particulièrement sur l'allorecognition des molécules de complexe majeur d'histocompatibilité par le système immunitaire du receveur. J'y décrirai aussi les traitements actuellement utilisés pour retarder le rejet de la greffe, en évoquant les différents problèmes que provoque l'administration de ces traitements au long terme.

### I- Généralités sur la transplantation (d'après Cinqualbre, 2004)

« La greffe est la grande aventure médicale du XX<sup>ème</sup> siècle » (René Küss, 1913-2006, pionnier de la transplantation rénale, lauréat du prix Medawar en 2002), il suffit d'ailleurs de constater que 6 Prix Nobel ont été décernés à des praticiens chirurgiens et chercheurs en transplantation, une discipline considérée depuis les années 1990 comme thérapeutique.

Il faudra près d'un siècle et le développement à la fois des techniques chirurgicales, mais aussi des traitements médicamenteux favorisant l'acceptation de la greffe, pour que la transplantation soit perçue comme une méthode thérapeutique reconnue. La découverte de traitements comme la ciclosporine, augmentant le taux de succès de la greffe approchant les 75-80% à 5 ans, a radicalement transformé le paysage. La greffe est devenue un traitement efficace des affections chroniques en phase terminale et elle permet d'atteindre des niveaux de succès thérapeutiques qu'aucun traitement palliatif d'ordre médical ou chirurgical ne peut atteindre. Elle est désormais considérée comme le seul traitement permettant de pallier à la dégénérescence chronique, d'origine infectieuse, maligne ou physiopathologique d'organes solides tels que le rein, le cœur, le foie, les intestins, le pancréas ou le thymus. La transplantation permet aussi de reconstituer des tissus lésés tels que la cornée, la peau et les valves cardiaques, ou à l'échelle cellulaire, le remplacement de cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse. Il existe différents types de transplantation définis par l'origine du greffon. L'autogreffe est la transplantation d'un tissu provenant de la même personne, alors que lors d'une allogreffe le greffon provient d'un donneur de la même espèce mais génétiquement différent. La xélogreffe est une transplantation inter-espèce. Elle est

pratiquée par exemple, lors du remplacement de valves cardiaques humaines par de nouvelles d'origine porcine. L'allogreffe est la transplantation la plus pratiquée dans le monde. Les organes transplantés proviennent de donneurs consentants vivants ou de dons après la mort. L'amélioration des techniques chirurgicales et des traitements limitant le rejet de greffe ont conjointement permis l'augmentation du nombre de patients en vie avec un greffon fonctionnel. Le nombre d'interventions réalisées dans le monde augmente peu à cause de la faible disponibilité en organe à greffer : en 2013, près de 118 000 greffes ont été reportées dans le monde, ce qui couvre moins de 10% des besoins la même année (Rapport « Organ Donation and Transplantation Activities 2013 », par The Global Observatory on Donation and Transplantation - GODT).

## II- Le rejet immun du greffon

### 1- En clinique (d'après Cinqualbre, 2004)

Le problème majeur en transplantation est le rejet du greffon par le système immunitaire du receveur. Ce sont les différences génétiques existant entre le donneur et le receveur, particulièrement au niveau de certains locus comme ceux du système de Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) qui sont responsables du rejet immun. En clinique, le rejet se manifeste de différentes façons, définies principalement par le délai entre la greffe et les premiers signes, généralement liés à des dysfonctions de l'organe transplanté, indiquant un épisode de rejet du greffon. Lorsque les réactions de rejet apparaissent dans les 24 heures qui suivent la transplantation, le rejet est qualifié d'hyper-aigu. L'organe ou le tissu greffé est rejeté rapidement, avant sa revascularisation. Ces réactions rapides sont dues à la présence d'anticorps spécifiques des antigènes du donneur dans le sérum du receveur avant la transplantation. De tels anticorps préexistent lorsque le système immunitaire du receveur a déjà rencontré les antigènes du donneur. C'est par exemple le cas de patients ayant reçu plusieurs transfusions sanguines répétées, d'individus qui ont déjà reçu une première greffe ou encore des femmes après des grossesses répétées et exposées aux alloantigènes paternels exprimés par le fœtus. Les complexes anticorps antigènes formés activent le système du complément et entraînent l'infiltration massive et intense de neutrophiles. Le greffon dégénère rapidement à cause des réactions inflammatoires, de la forte cytotoxicité et de la formation de caillots empêchant sa revascularisation. L'étude des antécédents du patient et la recherche systématique d'anticorps anti-donneur préexistants permettent maintenant d'éviter ce type de rejet.

Le rejet aigu apparaît plus tardivement et généralement en l'absence de tout traitement immunosuppresseurs. C'est une forme de rejet à médiation cellulaire, impliquant le développement d'une réponse adaptative spécifique des antigènes du donneur. Les premiers épisodes de rejet aigu apparaissent en moyenne une dizaine de jours après la transplantation. Histologiquement, ils sont caractérisés par une forte infiltration de macrophages et de lymphocytes T ( $L_T$ ) au niveau du ou des sites de destruction et de nécrose tissulaire. Le rejet aigu est contrôlé par la prise de traitements immunosuppresseurs, inhibant de façon non spécifique la réponse immunitaire du receveur. Ces traitements permettent de prolonger la survie des greffons à plusieurs années.

Le rejet chronique apparaît des mois voire des années après la transplantation. Il est caractérisé par la dégénérescence progressive du greffon : fibrose interstitielle, occlusions artérielles dues à la fibrose des muscles lisses et atrophie tubulaire dans le cas de la greffe rénale. Bien que les origines soient encore mal comprises, le rejet chronique pourrait résulter de phénomènes immunologiques (phases multiples et continues de rejets aigus) et non immunologiques (toxicité des traitements immunosuppresseurs). Les manifestations de rejet chronique sont souvent difficiles à maîtriser avec les traitements immunosuppresseurs. Le rejet chronique est désormais la cause principale de perte du greffon (Pascual et al., 2002).

Les formes aiguës et chroniques de rejet sont associées à des réponses immunes à forte médiation cellulaire. Les réactions immunitaires conduisant au rejet du greffon se définissent en deux phases :

- (1) une phase de sensibilisation où les cellules spécifiques des antigènes du greffon prolifèrent après activation par les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles (ou CPA) au niveau des organes lymphoïdes secondaires (OLS)
- (2) une phase effectrice durant laquelle les cellules spécifiques infiltreront massivement les tissus du greffon et libèrent de fortes quantités de molécules cytotoxiques, causant de forts dommages tissulaires.

Les réactions provoquées par des anticorps engendrent aussi une forte cytotoxicité, en induisant des phénomènes de lyse cellulaire dépendante du complément ou des phénomènes de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

## 2- L'immunité innée dans les phases précoces du rejet de greffe

Les mécanismes immuns conduisant à la perte du greffon sont complexes et séquentiels. Les phases effectrices du rejet nécessitent le recrutement de cellules du système immunitaire adaptatif au niveau du greffon. C'est l'inflammation causée par l'activation du sys-

tème immunitaire innée en réponse à de signaux de danger qui permet la perméabilisation nécessaire à l'infiltration du parenchyme. L'initiation du rejet dépend donc en premier lieu de l'acte de transplantation. La procédure chirurgicale, du prélèvement de l'organe du donneur à son implantation chez le receveur, est responsable de dommages tissulaires et cause une ischémie-reperfusion générant un stress cellulaire important (Wood and Goto, 2012). L'expression génique et protéique des cellules du greffon est altérée : elles produisent des signaux de danger et des motifs moléculaires associés aux dommages tissulaires (DAMPs pour Damage Associated Molecular Pattern). Ces signaux sont reconnus par des récepteurs PRRs (pour Pattern Recognition Receptor) d'une grande variété et présents à la surface, à l'intérieur ou sécrétés par les cellules de l'immunité innée. L'engagement des PRR induit la production de médiateurs inflammatoires : cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF, INF I) et chimiokines (molécules chimio-attractives). La présence de ces médiateurs modifie les propriétés de l'endothélium causant l'expression de molécules d'adhésion comme les p-selectines, et l'augmentation de sa perméabilité (Larsen et al., 1990). De telles modifications favorisent l'infiltration tissulaire par les leucocytes du receveur et la migration des CPAs (principalement les cellules dendritiques - DCs) du donneur vers les OLS du receveur. Ces phases précoces sont largement non spécifiques des antigènes du greffon et entraînent rarement seules le rejet de l'allogreffe.

### 3- L'allorecognition et l'activation des lymphocytes T alloréactifs

#### a- Les alloantigènes impliqués dans le rejet de greffe

Le développement de la réponse adaptative spécifique des antigènes du donneur est primordial dans le rejet de greffe. L'absence de  $L_T$  chez une souris greffée provoque l'incapacité de son système immunitaire à rejeter le greffon (Pietra et al., 2000). En clinique, les traitements de déplétion des  $L_T$  ont aussi montré leur efficacité : ils permettent de limiter les épisodes de rejet aigu et ils améliorent la survie d'un greffon (First et al., 1989). En transplantation, les lymphocytes T ou B ( $L_B$ ) du receveur reconnaissent les antigènes du donneur, appelés alloantigènes : ce sont par définition des antigènes du non soi mais appartenant à la même espèce que le receveur. Les différences alléliques qui existent entre le donneur et le receveur, en particulier de certains gènes, sont à l'origine de la reconnaissance allogénique. Les antigènes exprimés à la surface des érythrocytes et des cellules endothéliales, responsables de la classification du système ABO et bien connus du grand public, sont fortement reconnus par le système immunitaire (Starzl et al., 1987). Les antigènes mineurs d'histocompatibilité présentent un polymorphisme interindividuel et ils peuvent aussi être reconnus et impliqués dans le rejet en transplantation (Dierselhuis and Goulmy, 2009).

La reconnaissance des molécules de CMH (Complexe Majeur d’Histocompatibilité), qui présentent un très fort polymorphisme génétique, a été particulièrement étudiée pour leur prédominance dans le rejet immun de l’allogreffe (Informations complémentaires en Encart 1). En clinique, plus il y a de différences entre les molécules de CMH du donneur et du receveur, plus le rejet est précoce (Held et al., 1994). Il existe des centaines d’allèles de molécules de CMH différents identifiés dans la population humaine. Les CMH représentent une famille importante de molécules dont font partis :

- les CMH de classe I, exprimés par l’ensemble des cellules nucléées et subdivisés en trois loci chez l’homme
- les CMH de classe II, exprimés principalement par les CPAs et aussi subdivisés en 3 loci chez l’homme et
- les CMH dits non classiques

Un individu peut exprimer au maximum 6 molécules de CMH I (3 allèles provenant de la mère et 3 du père) mais de nombreuses molécules de CMH II différentes (dû à la présence de plusieurs gènes des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  chez l’homme et la combinaison des différentes chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du père et de la mère). Les molécules de CMH sont impliquées dans la présentation d’antigènes sous forme de dérivés peptidiques aux  $L_T$  par interaction avec leur récepteur TCR (ou T Cell Receptor). Les  $L_T$   $CD8^+$  sont restreints à la présentation de peptides antigéniques d’origine endogène par les CMH I alors que les  $L_T$   $CD4^+$  sont restreints à la présentation de peptides antigéniques exogènes, ou endogènes par présentation croisée, par les CMH II.

**Tableau 1 :** Complexe H-2 de la souris

Complexe Classe du CMH	H-2						
	I		II		III		I
Région	K	IA	IE	S		D	
Produit des gènes	H-2K	IA $\alpha\beta$	IE $\alpha\beta$	Protéines C'	TNF- $\alpha$ TNF- $\beta$	H-2D	H-2L*

\* N'est pas présent dans tous les haplotypes

**Tableau 2 :** Complexe HLA humain

Complexe Classe du CMH	HLA							
	II			III		I		
Région	DP	DQ	DR	C4, C2, BF		B	C	A
Produit des gènes	DP $\alpha\beta$	DQ $\alpha\beta$	DR $\alpha\beta$	Protéines C'	TNF- $\alpha$ TNF- $\beta$	HLA-B	HLA-C	HLA-A

## Encart n°1 : Système H-2 : haplotypes et modèles de greffe

Le système de Complexe Majeur d'Histocompatibilité a été découvert à l'aide de modèles de transplantations de tumeurs et de tissus normaux entre lignées de souris hautement consanguines et leurs différents hybrides de première ou seconde génération. Ce sont d'abord les travaux de Loeb, confirmés par ceux de Cloudman (1932), Prehn et Main (1958) qui ont démontré l'existence d'un déterminisme génétique pour les phénomènes de transplantation, appelés « gène d'histocompatibilité » ou « gènes H » (Snell, 1976). Ces travaux ont permis d'établir les lois de la transplantation, définissant la notion d'histocompatibilité (Snell, 1976). Gorer en 1936 met en évidence des antigènes érythrocytaires chez la souris. Parmi eux, l'antigène II a une influence particulière sur des greffes de tissus tumoraux. Cet antigène est sous contrôle d'un seul gène autosomal dominant appelé à ce moment gène d'histocompatibilité 2 ou H-2 (Gorer, 1948).

L'apport des études génétiques a permis de mettre en évidence différents gènes d'histocompatibilité, dans ce qui est devenu le système H-2, avec historiquement la découverte des gènes K et D (Shreffler, 1974), puis progressivement des gènes H-2L (complétant la liste des CMH I) et ceux de classe II H-2IA et H-2IE. Il existe plusieurs systèmes d'histocompatibilité pouvant entraîner le rejet de greffe, cependant le système H-2 est le système majeur d'histocompatibilité car il induit un rejet rapide des transplants incompatibles.

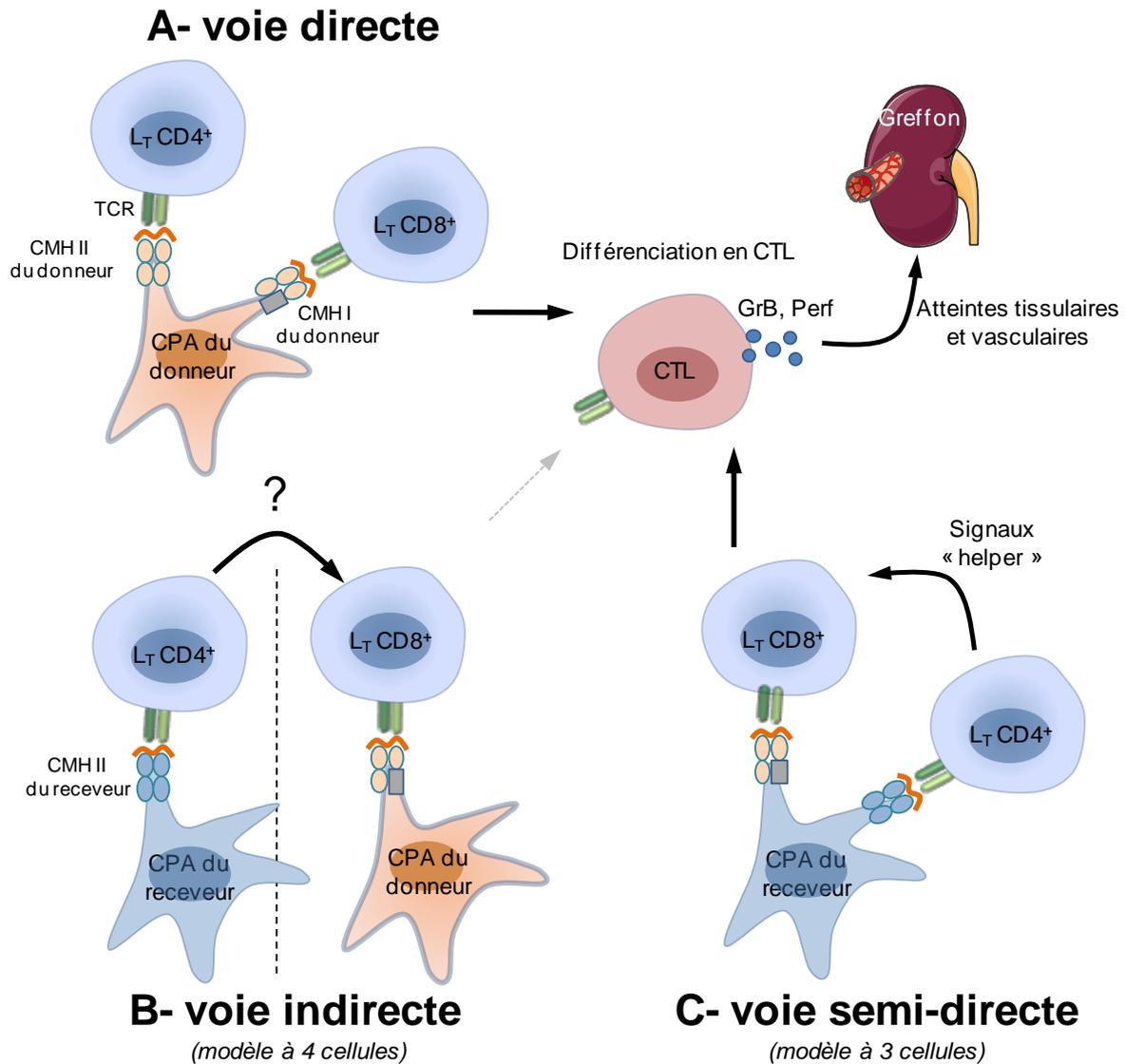
**Tableau 3** : Les différentes souches de souris utilisées en laboratoire et leur haplotype H-2

Lignée prototype	Autres lignées avec le même haplotype	Haplotype	Allèles H-2				
			K	IA	IE	S	D
<b>CBA</b>	AKR, <b>C3H</b> , B10.BR, C57BR	k	k	k	k	k	k
<b>DBA/2</b>	<b>BALB/c</b> , NZB, SEA, YBR	d	d	d	d	d	d
<b>C57BL/10</b>	<b>C57BL/6</b> , C57L, C3H.SW, LP1 129	b	b	b	b	b	b

Les souris hautement consanguines sont homozygotes pour les locus H-2. Certaines souches de souris consanguines ont été désignées comme souches prototypes. L'haplotype de ces souches de références est désigné par un exposant, par exemple H-2<sup>b</sup>, H-2<sup>d</sup>, H-2<sup>k</sup>. Différentes souches de souris consanguines peuvent partager le locus H-2 en commun (par exemple, les souris CBA et C3H sont H-2<sup>k</sup>). Le développement de plusieurs souches de souris consanguines d'haplotypes différents est un réel apport dans le développement de modèles de transplantation. La souris C57BL/6 d'haplotype H-2<sup>b</sup> rejette classiquement une greffe de peau provenant d'une souris Balb/c d'haplotype H-2<sup>d</sup> car l'ensemble des molécules du système d'histocompatibilité H-2 exprimées sont différentes. L'utilisation de souches de souris d'haplotypes H-2 différents peut par exemple permettre de tester la spécificité d'un traitement d'induction de la tolérance : un traitement permet d'induire une tolérance à une greffe d'une souris donneuse Balb/c (d'haplotype H-2<sup>d</sup>) chez la souris receveuse C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>). En revanche une greffe d'une tierce partie C3H (H-2<sup>k</sup>) est rejetée.

## b- Reconnaissance directe

L'alloreconnaissance est la reconnaissance d'un alloantigène par le TCR d'un  $L_T$  et passe par des interactions TCR-CMH-peptide non conventionnelles. Il existe en effet plusieurs voies de reconnaissance d'une molécule de CMH allogénique : la voie directe, indirecte et la voie semi-directe décrite plus récemment (Figure 1).



**Figure 1 :** Les voies de reconnaissance des alloantigènes en transplantation. La génération des CTLs reconnaissant les alloantigènes directement nécessite des signaux apportés par les  $L_{TH}$  activés et situés à proximité. (A) Les CPAs du donneur peuvent activer conjointement les  $L_T CD4^+$  et  $CD8^+$  après reconnaissance directe des CMH I et II. (B) Le système à 4 cellules implique CPAs du donneur, du receveur,  $L_T CD4^+$  et  $L_T CD8^+$ . Il ne permet pas la transmission efficace du signal entre les  $L_T CD4^+$  reconnaissant indirectement les alloantigènes du donneur et les  $L_T CD8^+$ . (c) Au contraire, la présentation d'alloantigènes du donneur directement aux  $L_T CD8^+$  et  $L_T CD4^+$  par une CPA du receveur (ou modèle à trois cellules) permet la génération efficace de CTLs (d'après Sivaganesh JI 2013)

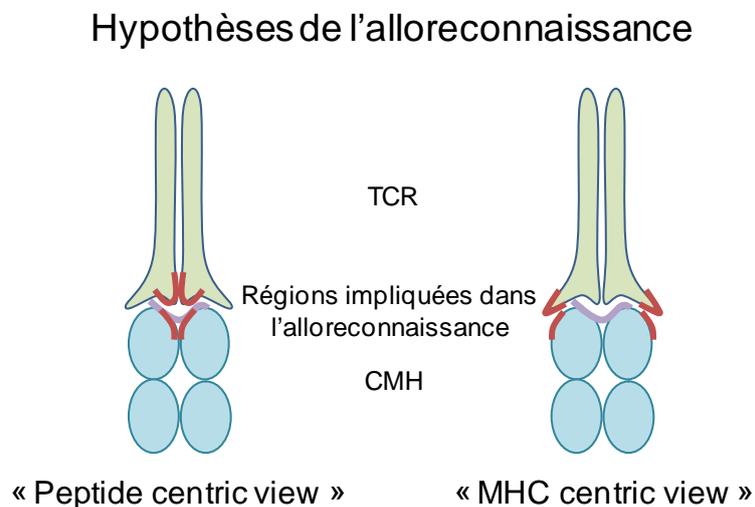
La voie directe de reconnaissance du CMH par le L<sub>T</sub> est propre à la transplantation, et participe pleinement à l'allorecognition lors du rejet. Elle est caractérisée par la reconnaissance des molécules intactes de CMH I et II du donneur par les L<sub>T</sub> du receveur. Les L<sub>T</sub> alloréactifs sont généralement activés par les CPAs du donneur après leur migration dans les OLS. Après activation, les L<sub>T</sub> cytotoxiques (CTLs) alloréactifs du receveur ciblent, par exemple, l'endothélium de l'organe transplanté. Les cellules endothéliales sont majoritairement d'origine du donneur et expriment en conséquent uniquement les CMH I du donneur. L'implication de la reconnaissance directe de CMH II dans le rejet a été démontrée expérimentalement. Dans un modèle de greffe orthotopique de cœur allogénique chez une souris déficiente en L<sub>T</sub>, le transfert adoptif de L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> de même origine que la souris receveuse au moment de la greffe entraîne le rejet. Il est évité si le cœur provient d'une souris n'exprimant pas de CMH II. En revanche, si c'est la souris receveuse qui n'exprime pas de CMH II, le cœur est tout de même rejeté, prouvant que le rejet de greffe est dû à la reconnaissance des molécules de CMH II intactes de la souris donneuse (Pietra et al., 2000).

La rapidité de l'alloréaction est en grande partie liée à la forte fréquence de L<sub>T</sub> potentiellement alloréactifs, 100 à 1000 fois plus fréquents que les L<sub>T</sub> spécifiques d'un complexe CMH du soi-peptide du non soi (soit une fréquence d'apparition de 1/1000<sup>ème</sup> à 1/10000<sup>ème</sup>) (Lindahl and Wilson, 1977; Suchin et al., 2001). Les différentes raisons pouvant expliquer la fréquence élevée de L<sub>T</sub> allospécifiques sont : (1) la réactivité croisée avec la reconnaissance de complexe CMH du soi-peptide ; (2) les TCRs allospécifiques ont la capacité de recruter de multiples ligands et notamment différents peptides présentés sur les mêmes CMHs, de façon hautement spécifique ; (3) l'absence de sélection négative des L<sub>T</sub> non rencontrés lors du développement thymique (Felix and Allen, 2007; Felix et al., 2007).

Les bases moléculaires de l'alloréaction ont été très étudiées. De façon conventionnelle, le TCR reconnaît le complexe CMH du soi-peptide du non soi, ce qui permet la transduction d'un signal activateur au L<sub>T</sub>. Dans l'allorecognition directe, c'est un complexe CMH du non soi-peptide endogène qui est reconnu mais des preuves expérimentales suggèrent une forte polyspécificité des interactions entre TCR et complexes CMH-peptide (Felix and Allen, 2007). Pour expliquer l'alloréactivité directe deux hypothèses ont été proposées : la réponse dépend de l'interaction du TCR avec le CMH allogénique (« MHC centric view ») ou de la reconnaissance du peptide présenté par ce CMH (« peptide centric view »). Les arguments apportés pour défendre l'importance de l'interaction avec le CMH allogénique dépendent du fait que les CMH allogéniques ne sont pas rencontrés durant le développement thymique, ce qui favorise l'émergence fréquente de TCR allospécifiques en périphérie. Au contraire, l'importance de la reconnaissance du peptide présenté par le CMH allogénique suggère la

possibilité d'identifier un peptide endogène présenté d'une façon différente que dans sa conformation classique sur un CMH du soi.

Au niveau moléculaire, les interactions entre CMH allogénique et TCR dépendent principalement de la zone de polymorphisme entre les CMH du donneur et ceux du receveur. Expérimentalement, le polymorphisme des résidus constituant les hélices  $\alpha$  du CMH, zone d'ancrage du TCR au CMH, influencent directement l'allorecognition, et indépendamment de la reconnaissance de peptides endogènes (Grande and Bevan, 1992). Cependant, le polymorphisme de la chambre peptidique engendre une différence de conformation du peptide présenté, qui peut alors être reconnu par le TCR du receveur (Chattopadhyay et al., 1994) (Figure 2).



**Figure 2** : Représentation schématique des 2 hypothèses de l'allorecognition. L'alloréactivité dépend en premier lieu de la reconnaissance du peptide présenté ou du CMH allogénique. Dans le modèle « Peptide centric view », le polymorphisme de la chambre peptidique (en rouge) du CMH du donneur favorise la reconnaissance de peptides endogènes. Dans le modèle « MHC centric view », c'est le polymorphisme au niveau de la zone de fixation du TCR sur le CMH qui favorise l'allorecognition (d'après (Felix and Allen, 2007)).

Pour définir quel était le principal déterminant dans l'alloréactivité, Morris et collaborateurs (Morris et al., 2011) ont comparé les séquences de TCR alloréactifs ou non alloréactifs chez la souris. Ils ont observé des variations de la région CDR3 responsable de la reconnaissance du peptide par le TCR. La présentation de peptides mimotopes par différents CMH allogéniques bien distincts permet l'activation comparable de  $L_T$  alloréactifs et de manière dose dépendante. Ces résultats suggèrent que la reconnaissance d'un peptide endogène au dépend de la capacité à interagir avec un CMH allogénique est le principal déterminant de l'alloréactivité (Morris et al., 2011).

### c- La reconnaissance indirecte

La voie indirecte de reconnaissance d'alloantigène est comparable à la voie conventionnelle de présentation d'un antigène. Il s'agit de la reconnaissance de peptides principalement dérivés des CMH allogéniques et présentés par les CPAs de façon restreinte aux CMH du soi. Cette forme d'allorecognition devient majoritaire après diminution ou disparition des CPAs du donneur et elle est généralement associée à un rejet plus tardif voire chronique. Des observations cliniques ont montré que la fréquence des  $L_T CD4^+$  avec une alloréactivité indirecte augmentait chez des patients en rejet chronique.

Expérimentalement, Auchincloss et collaborateurs (Auchincloss et al., 1993) ont démontré l'importance de la voie indirecte dans le rejet dans un modèle de greffe de peau d'une souris n'exprimant pas de CMH II chez une souris déficiente en  $L_T CD8^+$  et n'exprimant pas de CMH I. Dans ce modèle, les rejets observés ne peuvent être dus qu'à la présentation de peptides issus de CMH I exprimés par la peau du donneur, restreints aux CMH II exprimés par les CPAs du receveur et présentés aux  $L_T CD4^+$ . Plus récemment, une étude menée par le groupe de Bucy (Honjo et al., 2004) a démontré que le transfert adoptif de  $L_T CD4^+$  possédant un TCR transgénique avec une allospécificité indirecte pour un peptide du CMH I murin H-2K<sup>d</sup> chez des souris C57Bl/6 (H-2b) lymphopénique entraînait le rejet de greffes de cœur de donneuses C57Bl/6 transgénique exprimant H-2K<sup>d</sup>, mais pas celui d'une greffe tierce partie.

La présentation indirecte de l'antigène est associée à la circulation dans le greffon de CPAs du receveur, qui internalisent les antigènes solubles et les corps apoptotiques puis présentent les peptides allogéniques exogènes sur leur CMH II ou CMH I par présentation croisée au niveau des OLSs. La reconnaissance indirecte est plutôt associée à la différenciation des  $L_T CD4^+$  en  $L_{TH}$ . La contribution de cette voie dans le rejet par les  $L_T CD8^+$  est moins décrite.

### d- La reconnaissance semi-directe

En allorecognition, la voie semi-directe implique la présentation par trogocytose (transfert inter-cellulaire) de molécules entières intactes de CMH I du donneur par les CPAs du receveur circulant dans le greffon (André et al., 2004; Théry et al., 2002). Par conséquent, elle permet l'activation de  $L_{TH}$  alloréactifs par présentation indirecte, à proximité de  $L_T CD8^+$  à alloréactivité directe, ce qui est important dans l'émergence de CTLs capables de développer des réponses contre les allogreffes vascularisées (ou seule la reconnaissance directe des CTLs est pertinente) (Lee et al., 1994).

L'importance de la voie semi-directe dans la réponse allogénique a été démontrée expérimentalement chez la souris. Le transfert adoptif de DCs ayant acquis *in vitro* des molécules de CMH I allogéniques permet le développement d'une réponse des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> spécifique caractérisée par leur capacité à sécréter de l'IFN $\gamma$  *in vitro* après restimulation en présence de CPAs allogéniques irradiées. La réponse est significativement diminuée si les DCs n'expriment pas de molécules de CMH II, concordant avec l'absence de L<sub>TH</sub> à proximité des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> activés (Sivaganesh et al., 2013) (Figure 1).

#### 4- Les signaux de costimulation

Le signal délivré par l'engagement du TCR (signal 1) n'est pas suffisant pour activer pleinement les L<sub>T</sub>. Leur activation nécessite des signaux supplémentaires, appelés signaux de costimulation et délivrés lors de la présentation de l'antigène aux L<sub>T</sub> par les CPAs. Une grande variété de molécules est impliquée dans la costimulation. Certaines, que je détaillerai davantage, ont été particulièrement étudiées en immunologie de la transplantation (et sont actuellement des cibles thérapeutiques). Elles peuvent être classées en fonction des signaux délivrés (favorisant ou inhibant l'activation des L<sub>T</sub>) ou en fonction de leur structure. Les molécules de costimulation sont réparties en trois familles structurales :

- la famille des molécules B7, intégrées à la superfamille des immunoglobulines dont font partie les molécules CD28, CTLA-4 (pour Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4) et PD-1 (Program Death-1)
- la famille des Tumor Necrosis Factor (R pour Récepteur) TNF/TNFR dont font partie les molécules CD40/CD40L, CD137 (4-1BB/4-1BBL), OX40/OX40L et GITR (pour Glucocorticoid-Induced TNFR family Related gene)/GITRL.
- La famille des molécules TIM (T cell Ig and Mucin domain) dont les plus décrites sont TIM-1, TIM-2 et TIM-3

La molécule CD28, exprimée constitutivement par les L<sub>T</sub>, est engagée rapidement lors de la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR. Son interaction avec les ligands CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2) exprimés par les CPAs, est importante dans l'activation des cellules naïves à la fois chez l'homme et la souris. L'engagement de CD28 induit un signal favorisant la survie, la prolifération et la production de cytokines telles que l'IL-2 et l'IFN $\gamma$ . Le signal induit aussi la surexpression des molécules CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2) et CD40L.

L'expression dans un second temps de CD40L par le L<sub>T</sub> favorise le développement de la réponse. L'interaction de CD40L avec son récepteur CD40 exprimé à la surface des CPAs, délivre un signal positif entraînant l'augmentation de l'expression des molécules de la famille

B7 (CD80 et CD86), des molécules de CMH et donc la présentation de l'antigène ainsi que de la production de cytokines. La maturation des DCs par exemple, amplifie l'activation des  $L_T$ . Leur participation dans les phases précoces de l'activation et la maturation des lymphocytes font des interactions CD28/CD80-86 et CD40/CD40L de bonnes cibles thérapeutiques en médecine de la transplantation.

La formation de synapses immunologiques, interfaces entre  $L_T$  et CPAs où sont concentrés les complexes TCR-CMH-peptides et les molécules de costimulation, est facilitée par la présence de molécules d'adhésion (LFA-1/ICAM par exemple). Ces interfaces favorisent la transduction efficace de signaux permettant le recrutement et la phosphorylation/déphosphorylation de molécules et l'activation de facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B ou AP-1. Ils entraînent l'expression de gènes impliqués dans l'entrée en cycle cellulaire ou la production de cytokines nécessaire à la prolifération (comme l'IL-2) et de leurs récepteurs (signal 3). L'expansion clonale des  $L_T$  activés est initiée.

#### 5- La différenciation des lymphocytes T oriente la réaction de rejet

La différenciation des  $L_T$  activés est influencée par le statut immunitaire du receveur au moment de la transplantation, le degré de dommages tissulaires liés à l'ischémie-reperfusion, le degré d'incompatibilité dans l'expression de molécules de CMH entre donneur et receveur et le régime d'immunosuppression prescrit au receveur pour prévenir le rejet aigu du greffon (Wood and Goto, 2012). Ces facteurs impactent sur le niveau de chimiokines et de cytokines produites au moment de la greffe, mais aussi sur la capacité de migration des leucocytes du donneur vers les OLSs du receveur. Ils favorisent aussi le recrutement de leucocytes modulant le microenvironnement au niveau de l'organe transplanté.

L'ensemble des signaux perçus par les  $L_T$  activés permettent d'induire leur différenciation et leur maturation en cellules effectrices productrices de cytokines ( $L_{TH}$ ) ou hautement cytotoxiques (CTLs). C'est particulièrement l'orientation des  $L_T$   $CD4^+$  différenciés qui détermine la nature de la réponse adaptative. Les principaux sous types décrits dans le rejet de greffe sont les TH1 et TH2 mais de nombreux autres sous types de  $L_{TH}$  (TH17, TH19, TFH et iTreg) peuvent participer à la réponse (Tableau 4). Après activation et en présence de signaux « helper », les  $L_T$   $CD8^+$  alloréactifs se différencient en cellules cytotoxiques capables d'infiltrer le parenchyme du greffon. Les CTLs produisent de larges quantités de molécules cytotoxiques telles que les granzymes et les perforines et induisent l'apoptose des cellules allogéniques en sur-exprimant FasL (Wood and Goto, 2012).

**Tableau 4** : Les différentes sous populations de L<sub>TH</sub> impliquées dans le rejet de greffe

Sous-type cellulaire	Principales cytokines sécrétées	Principal FT* exprimé	Principales implications dans le rejet	Ref
<b>TH1</b>	IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$	T-bet	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plutôt dans les phases de rejet aigu</li> <li>- Prolifération et différenciation des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> spécifiques d'alloantigènes en CTL</li> <li>- Toxicité envers l'allogreffe (voie Fas/FasL)</li> <li>- Favorise la production d'anticorps spécifiques du donneur (DSA)</li> <li>- Impliqué dans les réactions d'hypersensibilité en activant les macrophages</li> </ul>	1,2
<b>TH2</b>	IL-4, IL-5, IL-13, IL-10	GATA-3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plutôt dans les phases chroniques de rejet</li> <li>- Activation d'éosinophiles au sein du greffon</li> <li>- Peut retarder le rejet de greffe (IL-4 et IL-10)</li> </ul>	1,3
<b>TH17</b>	IL-6, IL-17, IL-21, IL-22	ROR $\gamma$ T	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Retrouvé dans des biopsies de patient en cours de rejet</li> <li>- Plutôt dans les phases chroniques de rejet</li> </ul>	1
<b>TFH</b>	IL-4, IL-21	Bcl-6	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fortement impliqué dans la production de DSA</li> <li>- Associé avec la présence d'immunoglobulines dans des biopsies de reins transplantés</li> </ul>	4,5

\* : Facteur de Transcription

1 : (Liu et al., 2013)

2 : (Jiang et al., 2004)

3 : (Waaga et al., 2001)

4 : (Conlon et al., 2012)

5 : (de Graav et al., 2015)

## 6- L'importance de la réponse humorale dans le rejet de greffe

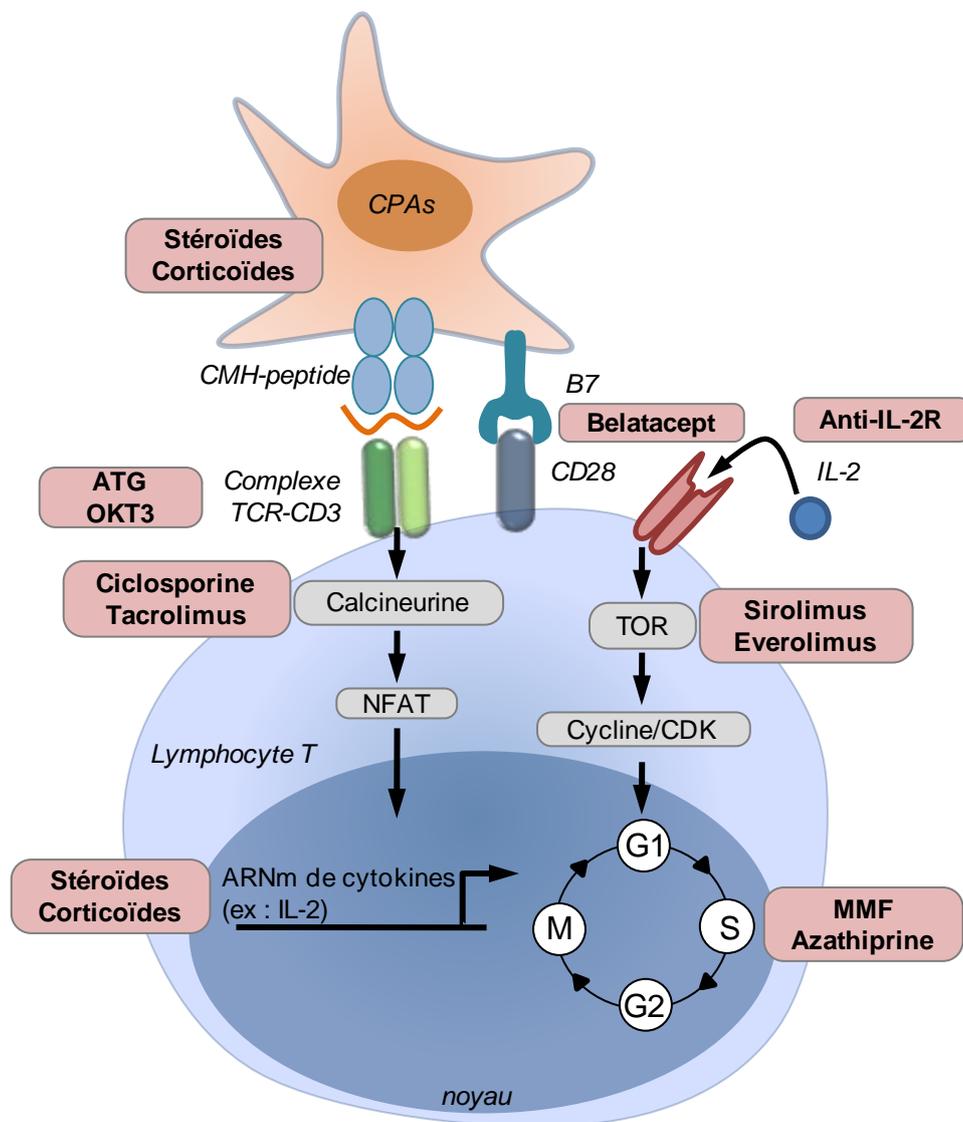
La présence d'anticorps spécifiques d'antigènes du donneur contribue grandement au rejet de l'organe transplanté. En plus des molécules de CMH allogéniques, les anticorps reconnaissent des épitopes présents à la surface des cellules endothéliales, des antigènes du groupe sanguin mais aussi des auto-antigènes (Win and Pettigrew, 2010). Le développement de la réponse humorale peut intervenir quelques jours après la transplantation mais les anticorps spécifiques du donneur (ou DSA pour Donor Specific Antibodies) peuvent contribuer à la perte plus tardive du greffon (Terasaki and Cai, 2008). Les mécanismes de rejet dus aux anticorps peuvent être soit dépendants du complément, soit liés à la reconnaissance de complexe anticorps-cellules cibles principalement par les macrophages et les cellules NK et via l'expression de récepteurs à la région Fc des anticorps et causant l'ADCC.

### III- Les traitements immunosuppresseurs

#### 1- Les principaux traitements utilisés en transplantation (d'après Cinqualbre, 2004)

La compréhension des mécanismes de rejet a permis de développer un panel de traitements visant à contrôler et supprimer les réponses immunitaires conduisant à la perte du greffon. Les traitements actuels ont une très forte efficacité pour contrôler les épisodes de rejet aigu, mais ils sont très peu efficaces pour prévenir le rejet chronique du greffon. Actuellement, il existe deux grandes familles d'immunosuppresseurs utilisées en clinique : les agents pharmacologiques et les agents biologiques. Les traitements immunosuppresseurs limitant le plus significativement le rejet du greffon sont ceux inhibant directement ou indirectement l'activation des  $L_T$ . Ces agents inhibent (Figure 3) :

- la synthèse d'ADN (inhibiteur de synthèse des purines), en limitant l'incorporation des bases puriques et pyrimidiques. Ils s'opposent à la division cellulaire et sont donc qualifiés d'antiprolifératifs (exemples : Azathioprine, Acide mycophénolique)
- la synthèse de cytokine et la fonction cellulaire. Les Corticoïdes par exemple, en plus de leurs propriétés anti-inflammatoires, sont connus pour inhiber la production d'IL-1 et d'IL-6. Les anticalcineurines (Ciclosporine, Tacrolimus) agissent plus spécifiquement sur l'inhibition de la transcription de gènes de cytokines. Les inhibiteurs de la m-TOR (Sirolimus, Everolimus) agissent sur la progression du cycle cellulaire induite par l'IL-2.
- la présentation de l'antigène : les corticoïdes limitent l'immunogénicité du greffon par baisse de l'expression des antigènes d'histocompatibilité.
- l'expression de molécules d'adhésion
- certaines voies de signalisation et d'activation des  $L_T$



**Figure 3** : Schéma résumant les mécanismes d'action des principaux traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation (d'après Kobashigawa and Patel, 2006)

Les premiers agents d'origine biologique développés ont un champ d'action thérapeutique élargi. Les sérums anti-lymphocytaires polyclonaux puis l'injection d'OKT3 (spécifique du CD3), développé grâce à l'émergence des techniques de production d'anticorps monoclonaux, permet la déplétion rapide des  $L_T$  dans le sang périphérique. Elle inhibe aussi de façon transitoire l'expression à la membrane du CD3, et donc la transmission de signal généré par la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le complexe TCR-CD3. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les récepteurs à l'IL-2 (Basiliximab et Daclizumab) permet de cibler uniquement les  $L_T$  activés. L'utilisation de ces produits diminue significativement l'incidence des rejets aigus en association avec d'autres immunosuppresseurs en transplantation rénale.

De nombreux travaux visent à développer des agents bloquant les signaux de costimulation. Les principales stratégies visent à bloquer les interactions de la voie B7-CD28 et CD40-CD40L. Bluestone et collaborateurs ont démontré que le blocage de la voie B7-CD28

à l'aide d'une protéine de fusion, constituée de la partie extracellulaire de CTLA-4 et de la région constante de la chaîne lourde de l'IgG1 (Belatacept), induit l'anergie des  $L_T$   $CD4^+$  et favorise l'induction de la tolérance dans un modèle de greffe d'îlots pancréatiques humains chez la souris (Lenschow et al., 1992). En clinique, l'utilisation de Belatacept permet d'améliorer la survie de greffes de rein en combinaison avec un régime immunosuppresseur (Vincenti et al., 2010). L'utilisation d'un anticorps humanisé monovalent antagoniste de CD28 (FR104, Effimune) permet de limiter spécifiquement l'activation, la prolifération et la production de cytokines par les  $L_T$  et prévient leur maturation en  $L_T$  effecteurs. Contrairement au Belatacept, il permet de préserver la fonction des  $L_{Treg}$  par des mécanismes dépendants de CTLA-4 (Poirier et al., 2015).

## 2- Problèmes associés à la prise de traitements immunosuppresseurs

Bien qu'une immunosuppression lourde augmente la survie du greffon, elle accentue le risque de cancers et d'infections (Marcén, 2009). Ces pathologies résultent de l'immunosuppression et de la réduction de l'immunosurveillance du système immunitaire. L'incidence d'apparition de cancers est 3 à 5 fois plus élevée chez des patients transplantés que dans la population générale. Les cancers les plus fréquents sont les cancers de la peau (Euvrard et al., 2012), les lymphomes ou les désordres lymphoprolifératifs et autres tumeurs associées aux infections virales chroniques (Marcén, 2009). Les infections des voies urinaires et respiratoires et les infections virales sont aussi des complications fréquentes observées chez des patients transplantés. Les plus répandues sont les infections opportunistes aux Cytomegalovirus (CMV) et au virus de l'Epstein-Barr (EBV) (Fishman, 2007). Les risques de développer des pathologies cardiovasculaires sont accrus par la prise de traitements immunosuppresseurs. Les effets néphrotoxiques ou métaboliques de certains agents sont aussi à relever. Les corticoïdes par exemple, provoquent de nombreux effets secondaires (hypertension artérielle, diabète aigu, ostéoporose, troubles psychiques) tout comme les inhibiteurs de la calcineurine connus pour leur forte toxicité : néphrotoxicité, hypertension artérielle, neurotoxicité, hépatotoxicité (Cinqualbre, 2004).

## Partie 2 : Les mécanismes de la tolérance

En transplantation mais aussi dans le traitement des pathologies autoimmunes, le développement de stratégies d'induction de la tolérance spécifique de l'antigène pourrait pallier à la prise de traitements immunosuppresseurs actuels, supprimant non spécifiquement les réponses immunitaires. C'est en se basant principalement sur les cas spontanés de tolérance, que ce soit aux auto-antigènes, aux antigènes oraux ou dérivés de nos flores commensales et aux alloantigènes que les mécanismes de tolérance ont été peu à peu mis en évidence. Cette partie a pour objectif de définir puis de comprendre ces différents mécanismes. Elle aura aussi pour but de voir comment la compréhension de ces différentes voies d'induction de la tolérance ont été mises à contribution dans des buts thérapeutiques. Je m'intéresserai particulièrement aux phénomènes de tolérance impliquant les  $L_T$ .

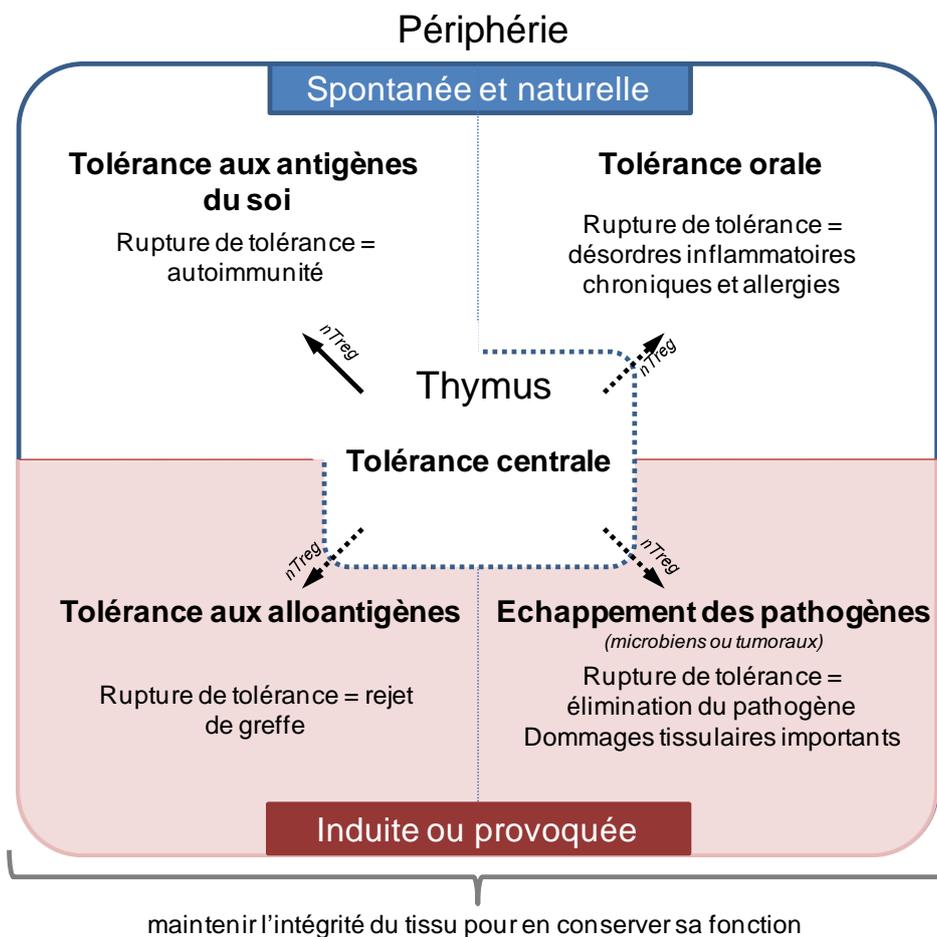
### I- Définitions de la tolérance

La tolérance en immunologie est un phénomène observé en premier lieu pour les antigènes du soi. Le système immunitaire adaptatif des vertébrés a évolué de façon à reconnaître des structures moléculaires exprimées par des pathogènes afin de les éliminer rapidement, puis d'acquérir une mémoire immunitaire permettant de conserver cette réponse au cours de la vie. Cette capacité est due à la génération aléatoire et continue de récepteurs TCR et BCR (pour B Cell Receptor) par des processus de réarrangements géniques appelés recombinaisons V(D)J. La conséquence inévitable de ce processus aléatoire est la génération de récepteurs capables de reconnaître des structures moléculaires exprimées à la surface de nos propres cellules. Les cellules spécifiques des antigènes du soi sont dites auto-réactives. Des processus de tolérance aux antigènes du soi ont émergé au cours de l'évolution pour contrôler et éviter les réactions d'autoimmunité

En 1945, R.D. Owen publie des données montrant que des bovins jumeaux dizygotes possèdent à la fois des globules rouges identifiés comme génétiquement les leurs mais aussi d'autres globules rouges provenant de leur jumeau. Ce phénomène, lié à la circulation sanguine commune entre les fœtus lors de la gestation, est dû à l'échange de précurseurs hématopoïétiques entre les jumeaux. Il s'agit de la première description d'un état de tolérance envers des antigènes d'origine génétique différente, ou antigène du non soi. Les expériences plus célèbres de Billingham, Brent et Medawar publiées en 1953 (Billingham et al., 2010) ont marqué un point d'orgue dans la découverte de la tolérance immunologique au non soi. En inoculant des souris *in utero* avec une suspension constituée de splénocytes d'une souche différente, ils ont induit l'acceptation de greffes de peau provenant de cette

même souche chez des souris inoculées âgées de 6 à 8 semaines. Dans ce modèle, la tolérance est induite par la présentation d'alloantigènes à un système immunitaire immature. En 1964, Medawar a alors défini la tolérance immunologique comme un état d'indifférence ou de non réponse envers une substance qui provoque normalement une réponse immunologique. Depuis la définition de la tolérance immunologique appliquée en transplantation (ou tolérance opérationnelle) s'est affinée et prend en compte les critères suivants (Ashton-Chess et al., 2007; Orlando et al., 2010) :

- L'organe greffé est fonctionnel sans signe de lésion histologique.
- L'hôte est immunocompétent et capable de répondre à des agents pathogènes.
- La tolérance persiste en absence de traitement immunosuppresseur (depuis au moins 1 an).
- Elle est spécifique des alloantigènes du donneur, et favorise l'acceptation d'une seconde greffe d'un même donneur et le rejet d'un tiers.



**Figure 4 :** Les définitions de la tolérance. La tolérance aux antigènes du soi implique des processus de régulation centraux et périphériques. En périphérie, des mécanismes de régulation de la réponse immune permettent l'induction spontanément de la tolérance orale. En transplantation ou dans un contexte pathologique, des phénomènes de régulation permettent de préserver les allo-greffes et favorisent l'échappement des pathogènes. Dans tous ces contextes, la régulation permet de limiter les dommages tissulaires.

La tolérance aux antigènes du soi et du non soi est définie par une non réponse immunitaire : ces antigènes sont alors qualifiés de tolérogènes. La tolérisation est le processus conduisant à la tolérance immunologique et dépend de nombreuses voies de la régulation de la réponse immune. Le fait qu'un antigène soit immunogène ou tolérogène dépend en premier lieu de sa présentation au système immunitaire. A mon sens, le statut immunologique d'un individu présentant des atteintes pathologiques chroniques est proche de la tolérance immunologique. Les processus d'échappement de certains agents pathogènes ou tumoraux, et les mécanismes de régulation de la réponse immunitaire favorisent le développement d'un état de non réponse immunologique (ou de dysfonction). En conséquent, le pathogène n'est pas éliminé (est-il toléré ?) et l'organe infecté par le pathogène n'est plus sujet à une inflammation constante conduisant à des dommages tissulaires parfois importants et pouvant contribuer à des dysfonctions.

Les maladies autoimmunes résultent d'une déficience du système immunitaire et d'une rupture de tolérance aux antigènes du soi. En transplantation, l'objectif majeur est d'aboutir à un état de tolérance aux alloantigènes exprimés à la surface du greffon. Il existe un certain nombre de similitudes dans la tolérisation des antigènes du soi et du non soi. C'est en étudiant les facteurs qui influencent le développement de la réponse immunitaire entre immunité et tolérance que les mécanismes de tolérance sont peu à peu mis en évidence.

## II- La tolérance centrale

Les mécanismes de tolérance aux antigènes du soi visent à éliminer ou rendre les lymphocytes auto-réactifs incompetents. Ils se déclinent en deux voies de régulation : centrale et périphérique. La tolérance centrale permet la sélection précoce, dans le thymus, des cellules auto-réactives. Une affinité trop importante avec un antigène du soi conduit à la délétion par sélection négative. L'élimination d'une grande partie des thymocytes auto-réactifs est facilitée par l'expression du facteur de transcription AIRE par les cellules thymiques. AIRE régule la présentation des antigènes du soi et des tissus périphériques par les cellules épithéliales médullaires. Les clones T avec une affinité intermédiaire reçoivent des signaux nécessaires à leur différenciation en  $L_{Treg}$  naturels (nTreg), un troisième mécanisme thymique primordial dans le maintien de la tolérance en périphérie. En périphérie, ces nTreg peuvent être stimulés par des complexes CMH II-peptides du soi et exercer des mécanismes suppresseurs visant à réguler la réponse immunitaire et supprimer l'activation anormale de  $L_T$  auto-réactifs ayant échappé à la sélection négative thymique (Hogquist et al., 2005). Par analogie, les précurseurs des  $L_B$  avec un BCR réagissant de façon trop affine avec les antigènes environnementaux sont rapidement éliminés dans la moelle osseuse. Une seconde alternative pos-

sible, propre aux  $L_B$  auto-réactifs, consiste en une modification de leurs récepteurs par un processus appelé «receptor editing» (Pelanda and Torres, 2012).

### III- La tolérance périphérique

La tolérance centrale est le mécanisme dominant protégeant des réponses aux antigènes du soi. Une partie des cellules auto-réactives échappent tout de même à la régulation thymique, principalement car la totalité des antigènes ne sont pas exprimés et présentés dans le thymus. D'autres mécanismes permettent d'éliminer ou de contrôler les  $L_T$  potentiellement auto-réactifs : la délétion clonale, l'ignorance, l'anergie ou la tolérance adaptative, l'épuisement et la suppression ou la différenciation en  $L_{Treg}$ . L'anergie et l'épuisement sont des états de dysfonction des  $L_T$  qui après activation sont incapables de développer une réponse effectrice. Je dédierai principalement cette partie aux états de dysfonction des  $L_T$  en périphérie et à la suppression de la réponse immunitaire par les  $L_{Treg}$   $CD8^+$ .

#### 1- La délétion clonale

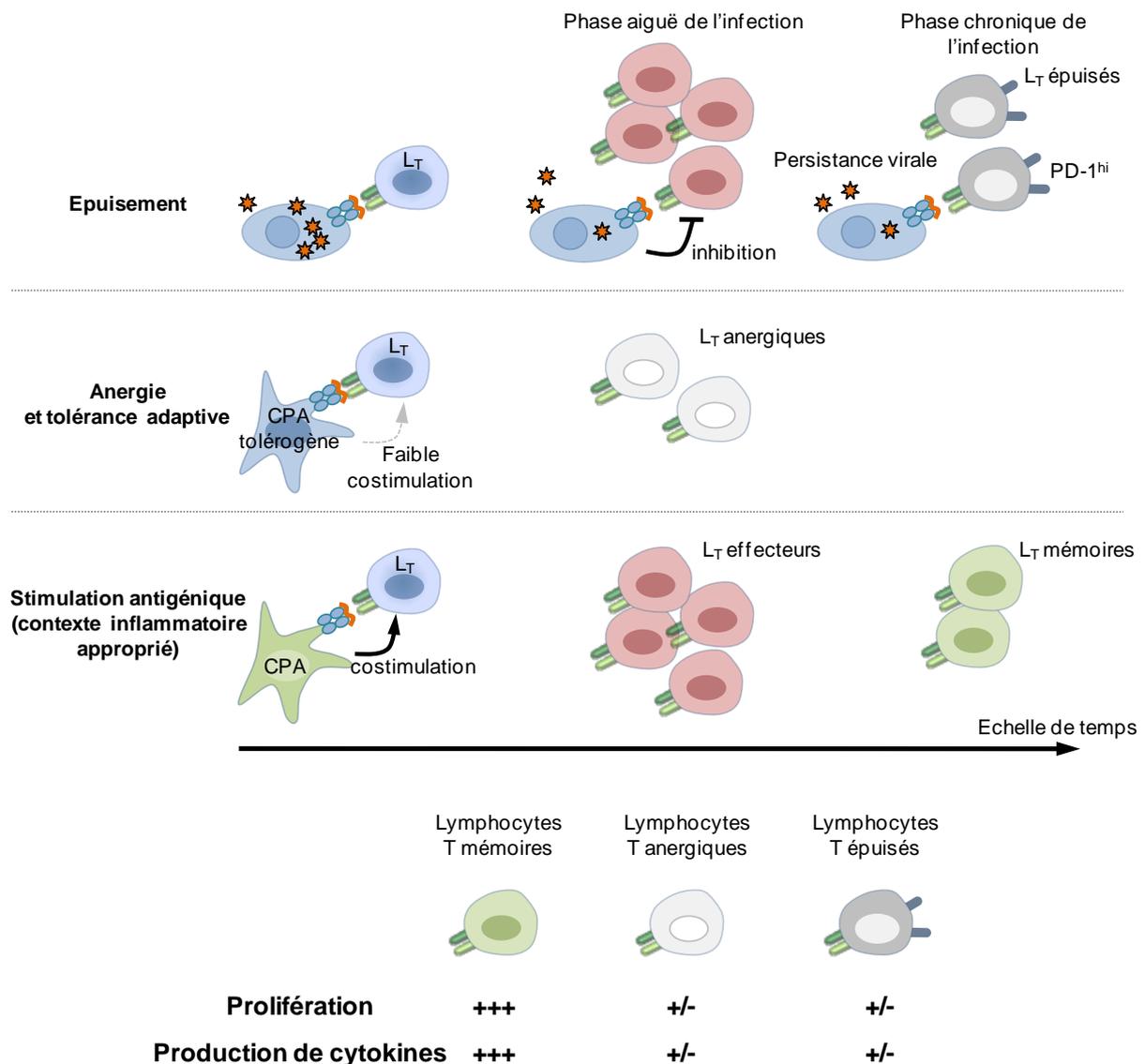
La délétion clonale permet l'élimination des  $L_T$  auto-réactifs mais aussi des  $L_T$  activés en réponse à un antigène étranger lors des phases de contraction de la réponse immune. Les clones T auto-réactifs sont éliminés suite à une activation incomplète, due à l'absence de signaux de costimulations ou de cytokines favorisant la prolifération et la survie cellulaire (Goodnow et al., 2005). La délétion clonale des  $L_T$   $CD4^+$  et  $CD8^+$  auto-réactifs est un mécanisme permanent et irrévocable, important dans le maintien de la tolérance périphérique. Suite à une réponse immunitaire et une phase d'expansion de  $L_T$ , l'excès de clones T activés est éliminé. Ce phénomène de mort par négligence permet de contrôler l'homéostasie et il est dû à la perte ou à l'absence de signaux activateurs suffisants (perte de l'antigène, absence de signaux de costimulation, absence d'IL-2). D'autres facteurs peuvent induire la mort cellulaire comme l'engagement des récepteurs de mort Fas, TRAIL-R (Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand) et TNF-R, exprimés par les cellules activées (Goodnow et al., 2005). L'activation régulière des  $L_T$  par de faibles doses d'antigènes ou au contraire par de très fortes doses peut aussi contribuer à la délétion clonale en augmentant la sensibilité des  $L_T$  à l'entrée en apoptose, par exemple, par diminution de l'expression de facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-2 (Alexander-Miller et al., 1998).

#### 2- L'ignorance et la ségrégation antigénique

En conditions physiologiques, certains antigènes ne sont jamais présentés aux  $L_T$  et ils sont dit séquestrés. C'est le cas, par exemple, des antigènes présents dans les sites considérés comme étant immunologiquement privilégiés, c'est-à-dire pauvres en cellules immuni-

taires comme le cerveau, l'œil, la thyroïde, le pancréas et les testicules. La séquestration est un moyen efficace pour éviter l'auto-réactivité. Des L<sub>T</sub> auto-réactifs peuvent « ignorer » certains antigènes exprimés, parce qu'ils ne les rencontrent pas et ils ne développent donc pas de réponses effectrices ni tolérogènes. Lorsque les barrières les séparant sont rompues (inoculation de l'antigène, traumatismes, dommages tissulaires), ces antigènes sont considérés comme étrangers, ce qui provoque une forte réponse immunitaire, conduisant potentiellement à l'autoimmunité (Parish and Heath, 2008).

### 3- La tolérisation des lymphocytes T



**Figure 5 :** Les mécanismes de tolérisation des lymphocytes T. Dans un contexte inflammatoire approprié, l'activation des L<sub>T</sub> par les CPAs permet la génération de L<sub>T</sub> effecteurs puis de L<sub>T</sub> mémoires conservant des capacités de réponses efficaces (prolifération et production de cytokines). L'absence de costimulation est un facteur déterminant dans l'induction de l'anergie ou de la tolérance adaptative. La persistance de hauts niveaux antigéniques favorise le développement de l'épuisement. Dans ces deux cas, les capacités à proliférer et sécréter des cytokines sont faibles.

#### a- Les principaux récepteurs inhibiteurs responsables de la tolérisation des L<sub>T</sub>

La tolérisation des L<sub>T</sub> est un processus englobant les divers états de dysfonction et d'inhibition des réponses effectrices. Certains états comme l'anergie, la tolérance adaptative et l'épuisement sont bien décrits (Figure 5). L'engagement de certains récepteurs inhibiteurs contribue ponctuellement à diminuer l'intensité de la réponse immune. CTLA-4 et PD-1 sont fortement impliqués dans la tolérisation des L<sub>T</sub>.

CTLA-4 est une molécule inhibitrice qui influence négativement l'activation des L<sub>T</sub>. C'est un membre de la famille des récepteurs CD28. Tout comme son homologue activateur, CTLA-4 interagit avec les molécules CD80 et CD86 exprimées à la surface des CPA, avec une affinité 20 à 50 fois plus forte. L'expression de CTLA-4 est augmentée sur les cellules activées, permettant un contrôle de la réponse immunitaire. L'engagement de CTLA-4 avec CD86 par exemple, provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Le blocage de CTLA-4 à l'aide d'anticorps *in vivo* prévient du développement de la tolérance T en périphérie (Perez et al., 1997).

PD-1 est une autre molécule inhibitrice très fortement impliquée en autoimmunité et dans la tolérance des L<sub>T</sub>. L'expression de PD-1 est induite par les L<sub>T</sub> activés et son engagement limite leur activation et le développement de leurs fonctions effectrices. Les ligands principaux de PD-1 sont PD-L1 (ou B7-H1), exprimé par une grande variété de types cellulaires d'origines hématopoïétiques ou parenchymateuses, et PD-L2 (ou B7-DC) exprimé uniquement à la surface des DCs et des macrophages. Un défaut d'expression de PD-1 ou de son principal ligand PD-L1 est responsable du développement de symptômes autoimmuns exacerbés dans un modèle murin de la sclérose en plaque, l'EAE (pour Experimental autoimmune encephalomyelitis) (Latchman et al., 2004) ou de modèles de diabète spontanés (souris NOD pour Non-obese diabetic) (Sharpe et al., 2007) chez la souris. Les L<sub>T</sub> activés sans contrôle via l'interaction PD-1/PD-L1 ont une hyperactivité pour la prolifération, la production de cytokines et de granzymes (Martin-Orozco et al., 2006). PD-1 est aussi primordial dans le maintien de la tolérance au soi, en inhibant l'activation lors de l'engagement du TCR de L<sub>T</sub> auto-réactifs.

#### b- L'anergie et la tolérance adaptative

L'anergie décrite initialement *in vitro* et la tolérance adaptative, état équivalent décrit *in vivo*, sont des mécanismes primordiaux dans le maintien de la tolérance en périphérie. Il s'agit d'états de non réponse à un stimulus antigénique. *In vitro*, les L<sub>T</sub> anergiques perdent leur capacité à produire des facteurs de croissance tel que l'IL-2 et à proliférer en réponse à un antigène. L'anergie est provoquée par la stimulation seule du TCR, de façon plus ou moins transitoire, voire répétée, en l'absence d'infection ou d'adjuvant (Kalekar et al., 2016). Ceci

limite l'expression de molécules de costimulation. Le manque d'interaction entre CD80 et CD86 avec CD28, exprimé à la surface des  $L_T$ , est particulièrement décrit (Jenkins and Schwartz, 1987; Quill and Schwartz, 1987) (Figure 5). Les cellules anergiques survivent durant des périodes relativement longues et elles restent réfractaires à d'autres stimulations, même en présence de signaux de costimulation apportés ultérieurement.

La tolérance adaptative est liée à la dysfonction des  $L_T$  associée à une costimulation sub-optimale ou à l'absence de signaux inflammatoires lors de la reconnaissance du complexe CMH-peptide (Choi and Schwartz, 2007) (Figure 5). Le microenvironnement local participe à l'induction de la tolérance adaptative : faibles concentrations d'IL-2, d'acides aminés ou de glucose et présence d'adénosine (Chappert and Schwartz, 2010). La présence de  $L_{Treg}$  facilite le développement de la tolérance adaptative. Différents modèles expérimentaux ont démontré que le transfert adoptif de  $L_T$   $CD4^+$  auto-réactifs chez la souris en l'absence de  $L_{Treg}$   $FoxP3^+$  n'aboutissait pas au développement de l'anergie mais au contraire, induisait la différenciation en  $L_T$  effecteurs mémoires causant de sévères pathologies autoimmunes (Knoechel et al., 2005; Martinez et al., 2005; Vanasek et al., 2006). L'engagement de certains récepteurs inhibiteurs affecte aussi indirectement le développement de la tolérance adaptative en modulant les capacités de présentation de l'antigène et de costimulation des CPAs (Onishi et al., 2008).

#### 4- L'épuisement cellulaire

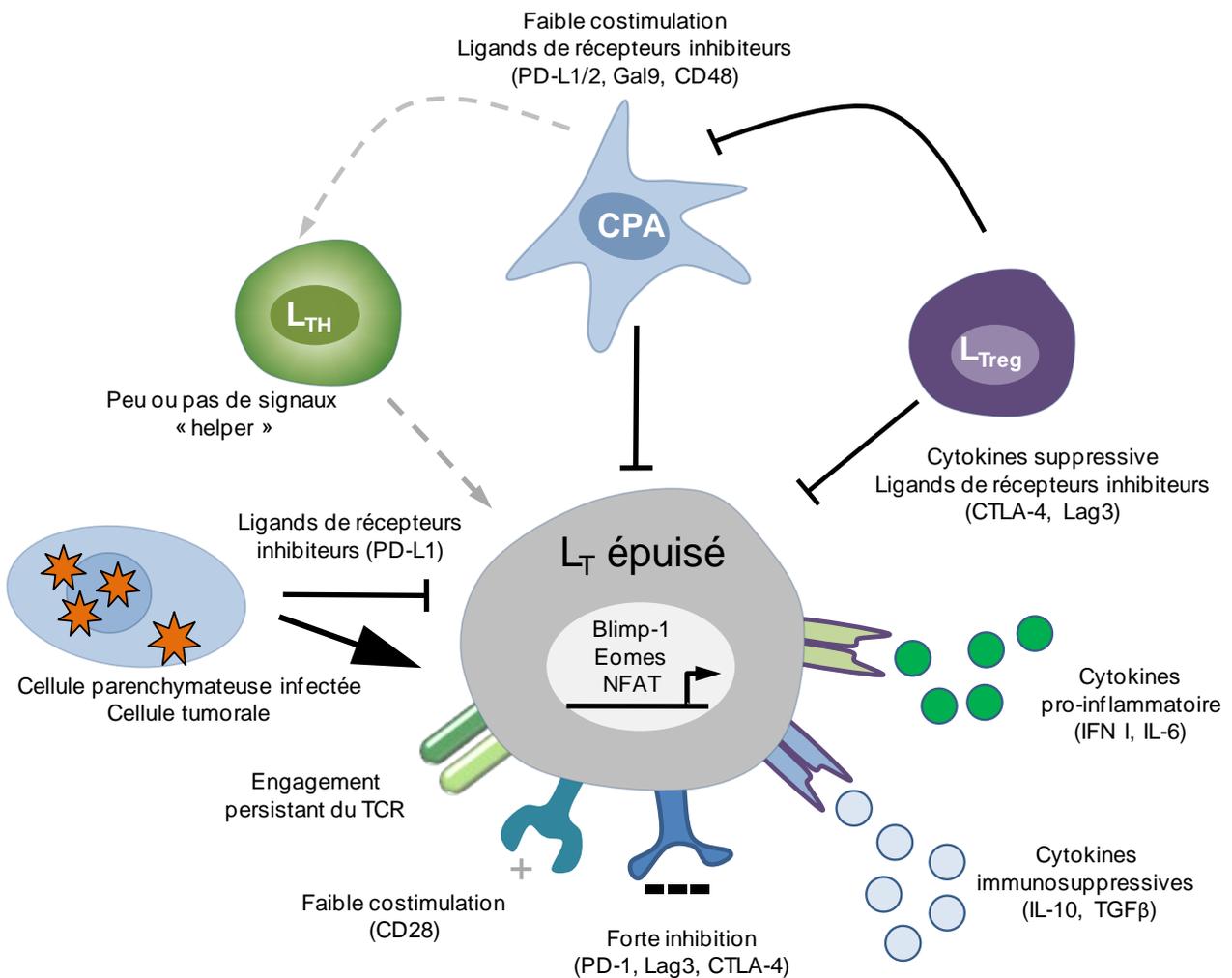
##### a- Preuves expérimentales et caractérisation

« L'épuisement » des  $L_T$  (ou « exhaustion » en anglais) est un état de persistance des  $L_T$  spécifiques d'antigènes possédant des fonctions effectrices largement diminuées et qui apparaît généralement lors d'infections chroniques et de cancers. L'épuisement des  $L_T$  a d'abord été décrit dans des modèles d'infections chroniques virales chez la souris comme au LCMV (pour Lymphocytic Choriomeningitis Virus) (Gallimore et al., 1998; Zajac et al., 1998) puis dans d'autres modèles expérimentaux d'infections. Ce phénomène a aussi été observé chez l'homme durant des infections au VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Day et al., 2006; Trautmann et al., 2006), aux hépatites chroniques virales HCV (Virus de l'Hépatite C) (Golden-Mason et al., 2007) et HBV (Reignat et al., 2002; Urbani et al., 2002) et lors de cancers (Mumprecht et al., 2009).

Les cellules épuisées ne sont pas inertes et elles conservent des fonctions qui limitent la progression de la maladie à défaut de l'éliminer. La chronicité de ces pathologies engendre une forte persistance antigénique, qui perturbe la différenciation des  $L_T$  en cellules mémoires, et qui altère progressivement leur phénotype et leurs fonctions. Contrairement aux cellules

mémoires fonctionnelles, les cellules épuisées ont un faible potentiel prolifératif. Elles sécrètent de faibles niveaux de cytokines (IL-2, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ), expriment de hauts niveaux de molécules inhibitrices (PD-1, Lag3, 2B4, Tim3, CTLA-4), et restent dépendantes de l'antigène pour leur survie (Shin and Wherry, 2007; Wherry and Kurachi, 2015) (Figure 5). Après une infection aiguë, les cellules mémoires persistent au long terme en l'absence d'antigène via un renouvellement homéostatique constant dépendant de l'IL-7 et de l'IL-15. Les cellules épuisées répondent faiblement à ces cytokines car elles expriment de faibles niveaux de CD122 (chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL-2 et à l'IL-15) et de CD127 (chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7). L'engagement constant du TCR apporte un signal suffisant au maintien au long terme des cellules épuisées (Shin and Wherry, 2007).

b- L'engagement constant du TCR et l'inhibition de PD-1 participent à l'induction et au maintien de l'épuisement



**Figure 6 :** Synthèse schématique des facteurs cellulaires et moléculaires participant à l'épuisement du  $L_T$

Le niveau de stimulation antigénique est le premier événement déterminant dans le développement des cellules épuisées (Figure 6). Des cellules activées lors d'infections à une « souche chronique » de LCMV, mais isolées rapidement après la stimulation, se différencient en cellules mémoires fonctionnelles alors qu'elles deviennent épuisées si elles restent exposées à l'antigène 2 à 4 semaines consécutives (Angelosanto et al., 2012; Brooks et al., 2006). L'engagement du TCR apporte des signaux impliqués dans le contrôle de la réponse effectrice en augmentant l'expression des récepteurs inhibiteurs décrits précédemment. Ces récepteurs sont exprimés généralement de façon transitoire lors de l'activation des  $L_T$ . En présence de leurs ligands, ils transmettent des signaux contrôlant les fonctions effectrices des  $L_T$ .

PD-1 est le marqueur principal des cellules épuisées. L'activation en continu des  $L_T$  spécifiques provoque des altérations épigénétiques dans le locus *pdcd1*, conduisant à une forte expression de PD-1 à la membrane (Youngblood et al., 2011). L'inhibition par le récepteur PD-1 et ses ligands est considérée comme majeure dans la perte de fonction des  $L_T$  épuisés (Figure 6). Le blocage de cette interaction *in vivo* et lors d'infections chroniques au LCMV restaure les capacités cytotoxiques des  $L_T$   $CD8^+$  spécifiques du virus conduisant à une diminution de la charge virale (Barber et al., 2006). L'inhibition est due à la phosphorylation de domaines ITIM (pour Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) et ITSM (pour Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif) du domaine cytoplasmique de PD-1, ce qui permet de moduler soit directement ou soit via le recrutement de la tyrosine phosphatase SHP-2, les molécules de transmission des signaux associées aux TCR/CD3 et aux molécules de costimulation dont CD28 (Wherry and Kurachi, 2015). L'engagement de PD-1 modifie le métabolisme du glucose, l'activité cellulaire et régule le cycle cellulaire (Parry et al., 2005; Riley, 2009). En revanche, PD-1 ne semble pas être impliqué dans l'induction de l'épuisement des  $L_T$ . Des  $L_T$   $CD8^+$ , spécifiques du LCMV (clone P14) et invalidés pour l'expression de PD-1, transférés chez des souris naïves, développent un phénotype de cellules épuisées comparable à des cellules P14 pouvant exprimer PD-1 (expression de récepteurs inhibiteurs, faible sécrétion cytokinique) 2 mois après infection (Odorizzi et al., 2015). PD-1 est responsable de la stabilité de l'épuisement des  $L_T$ . En effet, bien que PD-1 soit important dans le contrôle de la prolifération des  $L_T$   $CD8^+$  stimulés lors de la phase aiguë de l'infection, son absence est associée à une plus forte entrée en apoptose des  $L_T$  épuisés lors de la phase de contraction de l'inflammation.

D'autres récepteurs inhibiteurs co-régulent l'épuisement des  $L_T$  (Figure 6) et expérimentalement le blocage simultané de PD-1 et Lag-3 (Blackburn et al., 2009), ou de PD-1 et CTLA-4 (Nakamoto et al., 2009), ou de PD-1 et Tim3 (Jin et al., 2010) permettent de restaurer plus efficacement les fonctions effectrices des  $L_T$  spécifiques. L'engagement de ces di-

vers récepteurs inhibiteurs implique différentes voies de modulation des signaux intracellulaires ce qui explique cette magnitude dans les réponses observées après blocage.

#### c- D'autres facteurs favorisent le développement de l'épuisement

Certains médiateurs solubles participent à l'induction de l'épuisement cellulaire. Les cytokines immunosuppressives tels que le TGF $\beta$  et l'IL-10 ont été particulièrement étudiées (Figure 6). Le blocage de l'interaction de l'IL-10 avec son récepteur améliore le contrôle des infections virales en restaurant les fonctions des L<sub>T</sub> (Brooks et al., 2006; Ejrnaes et al., 2006). En revanche l'inhibition du signal délivré par le TGF $\beta$  lors d'infection chez la souris n'a pas montré de réels bénéfices pour bloquer l'épuisement des L<sub>T</sub> (Garidou et al., 2012). De façon plus surprenante, des cytokines pro-inflammatoires et notamment les IFN de type I impactent aussi le développement de dysfonctions des L<sub>T</sub> (Figure 6). Lors d'infections chroniques, le blocage de l'activité de l'IFN $\alpha$  et  $\beta$  prévient l'épuisement des L<sub>T</sub>. (Teijaro et al., 2013). Les mécanismes sont encore non élucidés mais les IFN I induisent par exemple l'expression de signaux immuno-régulateurs par les CPAs (expression de PD-L1, sécrétion d'IL-10,IDO – Indoleamine 2,3 Dioxygénase) (Ivashkiv and Donlin, 2014).

L'absence de L<sub>TH</sub> contribue au développement de l'épuisement et à la persistance des infections chroniques, ce qui a été démontré expérimentalement par déplétion des L<sub>TH</sub> dans le modèle murin d'infection au LCMV (Matloubian et al., 1994) (Figure 6). Des facteurs clés comme l'IL-21, apportés par les L<sub>TH</sub> lors d'infections sont essentiels au bon développement d'une réponse T antivirale efficace (Fröhlich et al., 2009). Par ailleurs, la présence de L<sub>Treg</sub> dans le milieu inflammatoire favorise l'épuisement lors d'infections chroniques (Figure 6). Expérimentalement, la déplétion seule des L<sub>Treg</sub> ne permet pas de rétablir l'immunité anti LCMV chez la souris. Combinée avec le blocage de PD-1, l'absence de L<sub>Treg</sub> augmente la clairance du virus plus efficacement que le blocage de PD-1 seul. Ces données suggèrent un rôle des L<sub>Treg</sub> dans le maintien de l'épuisement des L<sub>T</sub> spécifiques (Penaloza-MacMaster et al., 2014). Chez l'homme, les L<sub>Treg</sub> sont plus fréquents dans le sang périphérique chez des patients atteints de VIH et de HCV et pourraient participer à la chronicité de ces pathologies (Wherry and Kurachi, 2015). Les L<sub>Treg</sub> interviennent dans de nombreuses voies régulatrices et peuvent favoriser indirectement le développement de l'épuisement : augmentation de l'expression de ligand des récepteurs inhibiteurs par les CPAs, sécrétion des cytokines immunosuppressives (IL-10 par exemple).

#### d- L'épuisement comme état de différenciation du L<sub>T</sub>

Les études génomiques supportent l'idée que l'épuisement cellulaire représente un état de différenciation bien défini des L<sub>T</sub>. Les cellules épuisées ont notamment un profil transcrip-

tomique différent des cellules effectrices et des cellules mémoires (Wherry et al., 2007). Plusieurs voies transcriptomiques sont impliquées dans l'épuisement des  $L_T$  (Figure 6). Le facteur de transcription Blimp-1 est très fortement exprimé par les  $L_T$   $CD8^+$  épuisés (plus fortement que par les  $L_T$   $CD8^+$  effecteurs fonctionnels). Blimp-1 induit la surexpression des récepteurs inhibiteurs par les cellules épuisées (Shin et al., 2009). Les facteurs de transcription Eomes et T-bet permettent de définir deux états d'épuisement des  $L_T$  lors d'infections virales chroniques : une faible partie exprime fortement T-bet et PD-1 de façon intermédiaire et conserve un fort potentiel prolifératif, et une plus large partie exprime fortement EOMES ainsi que PD-1 et constitue le stade terminal d'épuisement décrit jusqu'à présent (Paley et al., 2012). D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans l'épuisement des  $L_T$  comme NFAT, BATF, VHL, FOXO1 et FOXP1 (Wherry and Kurachi, 2015).

#### e- L'anergie et l'épuisement : deux états distincts de dysfonction des $L_T$

Fonctionnellement, l'anergie (ou la tolérance adaptative *in vivo*) et l'épuisement des  $L_T$  sont caractérisés par la perte des capacités effectrices et l'absence de prolifération (figure 5). C'est au niveau des mécanismes d'induction et d'un point de vue moléculaire qu'il existe des différences entre ces deux états de dysfonction des  $L_T$ . L'anergie est induite rapidement et au moment de l'activation des  $L_T$  alors que l'épuisement est progressif, et les dysfonctions apparaissent au cours du temps, et en présence de signaux de costimulation au moment de la phase aiguë de l'infection. Les profils d'expression génique des cellules anergiques et des cellules épuisées sont différents. Malgré certaines similitudes comme l'expression commune de NFAT, de nombreux gènes ne sont exprimés que par les cellules anergiques (*grail*, *egr2* et *egr3* par exemple) (Wherry et al., 2007). Il est important de remarquer aussi que l'épuisement a surtout été décrit comme état de dysfonction des  $L_T$   $CD8^+$  (bien qu'il existe des  $L_T$   $CD4^+$  épuisés, (Wherry and Kurachi, 2015), alors que l'anergie est plutôt décrite pour les  $L_T$   $CD4^+$ , il est donc possible qu'il existe un état de dysfonction préférentiel selon le sous type de  $L_T$  impliqué.

### 5- La déviation immune

Outre le contrôle de  $L_T$  effecteurs par induction d'anergie, par tolérisation ou par épuisement, la tolérance en périphérie peut également être la conséquence d'une modification de la fonction effectrice des lymphocytes activés, et notamment via le type de cytokines sécrétées. Plusieurs sous populations de  $L_{TH}$  sont décrites (Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, Treg). Il existe une grande plasticité entre ces différentes sous populations, relativement dynamique et dépendante de l'environnement. La polarisation des  $L_T$   $CD4^+$  dépend de l'expression de facteurs de transcription, qui favorisent la production d'un nombre restreint de cytokines. Certains profils de sécrétion comme le profil TH1 favorisent l'inflammation, l'activation et la

différenciation des  $L_T$ . D'autres profils au contraire sont plutôt anti-inflammatoires et dévient la réponse immunitaire (TH2). La balance entre les différents profils de sécrétion permet le contrôle de la réponse immunitaire. Certaines conditions dépendantes du microenvironnement favorisent le développement de  $L_{Treg}$ , spécialisés dans le contrôle de la réponse immunitaire. Ce sous type cellulaire est défini par l'expression du facteur de transcription FoxP3. Les  $L_{Treg}$  sécrètent de fortes quantités d'IL-10 et suppriment la réponse effectrice localement. L'activité des  $L_{Treg}$  est hautement dépendante de l'IL-2.

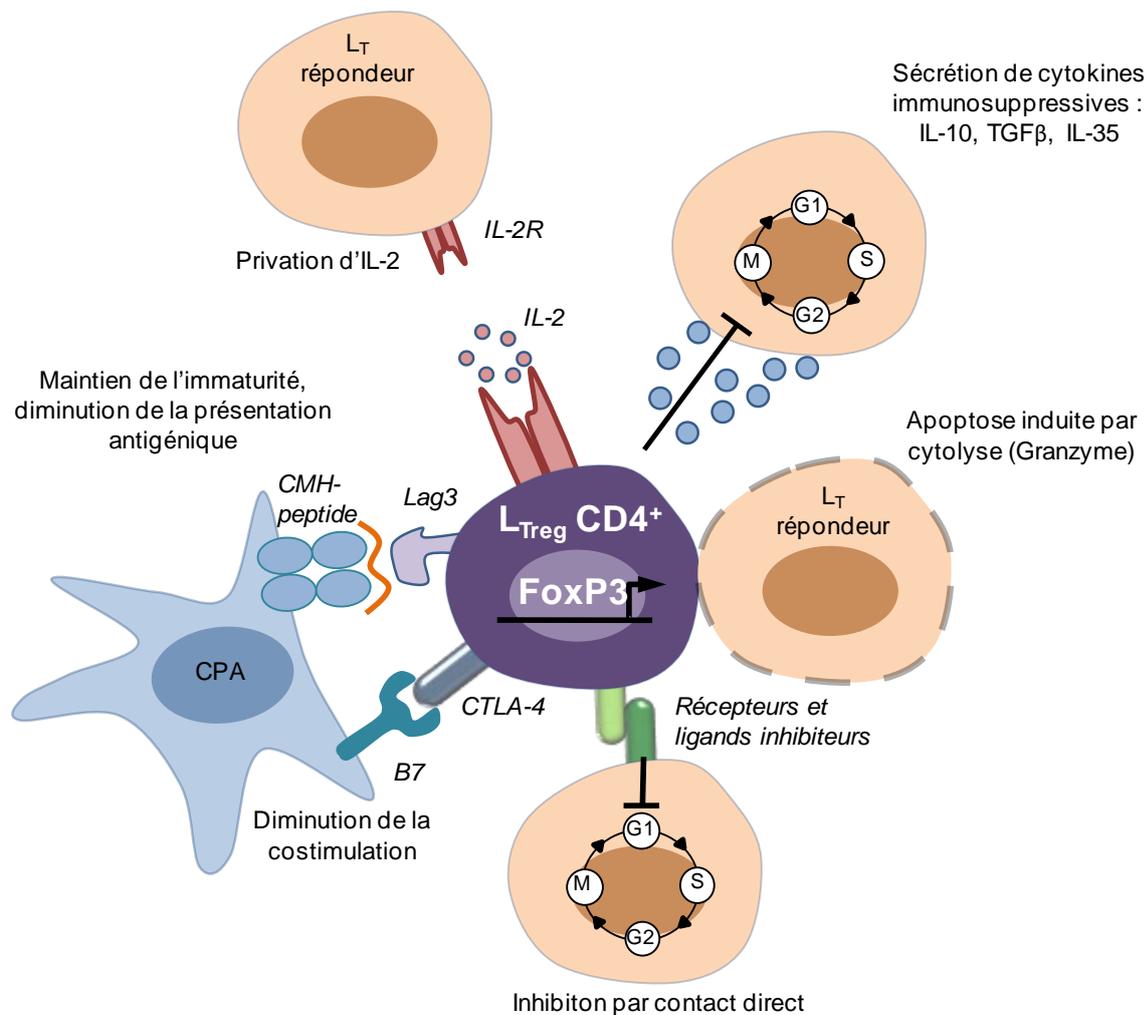
## IV- Les $L_{Treg}$ suppriment les réactions immunes en périphérie

### 1- Les $L_T$ $CD4^+$ régulateurs

Depuis leur découverte en 1995 (Sakaguchi et al., 1995), les  $L_{Treg}$   $CD4^+$  sont probablement les cellules régulatrices aujourd'hui les plus étudiées. Les  $L_{Treg}$   $CD4^+$  sont réparties en deux populations : les  $L_{Treg}$  naturels (nTreg) et les  $L_{Treg}$  induits (iTreg). Les nTreg expriment le facteur de transcription FoxP3 (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003) ainsi que de hauts niveaux de CD25. Le facteur de transcription FoxP3 est primordial dans l'induction, et l'acquisition des fonctions suppressives (Zheng and Rudensky, 2007). Les nTreg se différencient dans le thymus, après sélection de thymocytes exprimant un TCR avec une affinité intermédiaire pour des antigènes du soi et de façon dépendante de signaux apportés par CD28 (Hsieh et al., 2012). Les nTreg contribuent principalement à la prévention des réponses dirigées contre des antigènes du soi en périphérie. Chez la souris, l'expression de la neuropiline-1 par les nTreg permet de les différencier des iTreg en périphérie (Kalekar et al., 2016). Plusieurs pathologies autoimmunes à la fois chez l'homme et la souris (diabète de type I, sclérose en plaque) sont associées à une diminution du nombre de nTreg (Bluestone and Abbas, 2003).

En périphérie, les  $L_T$   $CD4^+$  conventionnels peuvent se différencier en iTreg. L'induction de l'expression de FoxP3 par les  $L_T$   $CD4^+$  conventionnels a d'abord été observée *in vitro*, après activation en présence de  $TGF\beta$  et d'IL-2 (Chen et al., 2003; Davidson et al., 2007; Fantini et al., 2004). Tout comme leurs homologues naturels, les iTreg expriment fortement CD25 lorsqu'ils sont activés (l'expression de CD25 dépendant de l'engagement du TCR), CTLA-4 et GITR. Une stimulation antigénique est requise pour leur activation après quoi ils suppriment la réponse des  $L_T$  effecteurs (Lohr et al., 2006). La conversion des  $L_T$   $CD4^+$  conventionnels en iTreg dépend en grande partie de la façon dont est présenté l'antigène. L'activation par exemple par des CPAs immatures ou tolérogènes (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007), et l'absence de costimulation favorise l'induction de  $L_{Treg}$ . L'engagement de CTLA-4 n'est pas essentiel mais facilite le développement des iTreg *in vitro* (Barnes et al.,

2013; Zheng et al., 2006). Les signaux apportés par l'interaction entre PD-1 et PD-L1 favorisent l'induction et la maintenance des iTreg (Francisco et al., 2009). La surexpression de PD-L1 par les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques est un moyen d'autoprotection contre les dommages tissulaires provoqués par les L<sub>T</sub> effecteurs auto-réactifs. Elle permet de réguler leur fonction et d'induire des cellules régulatrices (Keir et al., 2008).



**Figure 7 :** Les principaux mécanismes de suppression des L<sub>Treg</sub> CD4<sup>+</sup>

Les L<sub>Treg</sub> CD4<sup>+</sup> disposent d'une panoplie importante de mécanismes pouvant supprimer la réponse immunitaire (Figure 7), qui peuvent être classés en trois catégories principales : la suppression dépendante d'un contact cellulaire, dépendante de désordres métaboliques et la sécrétion de cytokines inhibitrices.

- (1) La suppression dépendante de contacts cellulaires : CTLA-4, en interagissant avec CD80 et CD86 transmet un signal négatif aux CPAs, ce qui module leur capacité immunostimulantes (diminution de l'expression de CD80/86, (Onishi et al., 2008). Lag3 interagit avec les CMH II inhibant l'activation des CPAs (Liang et al., 2008).

- (2) La suppression associée à des désordres métaboliques : l'expression constitutive de CD25 par les  $L_{Treg} CD4^+$  engendre leur forte consommation d'IL-2, appauvrissant le milieu et générant un manque, entraînant l'entrée en apoptose des  $L_T$  effecteurs (de la Rosa et al., 2004). Ils sont aussi capables de générer de l'adénosine qui supprime la fonction des  $L_T$  effecteurs après fixation sur son récepteur (Deaglio et al., 2007).
- (3) La production de cytokines inhibitrices : les  $L_{Treg} CD4^+$  produisent de fortes quantités d'IL-10, de TGF $\beta$  ou d'IL-35 qui inhibent la prolifération des  $L_T$  effecteurs et diminuent l'activation des CPA (Schmitt and Williams, 2013).

## 2- Les $L_T CD8^+$ régulateurs

La régulation active par des  $L_T$  régulateurs est un élément primordial dans le maintien de la tolérance au soi et le retour à l'homéostasie lors d'une réponse adaptative. Les  $L_T CD8^+$  ont été les premiers sous types cellulaires décrits comme possédant des activités suppressives (Gershon, Kondo 1970). Néanmoins, les difficultés pour caractériser cette population et pour identifier des marqueurs différenciant les cellules suppressives de l'ensemble des  $L_T CD8^+$  a limité leur étude. La découverte par Hall (Hall J Exp Med 1990) et Sakaguchi (JI 1995) de  $L_T CD4^+$  possédant une activité suppressive et sur-exprimant le marqueur CD25 a engendré une recrudescence des études sur la recherche de  $L_{Treg}$ .

### a- Définition

Donner une définition précise des  $L_{Treg}$  est actuellement impossible tant il existe une diversité de populations décrites dans la littérature. Leur diversité est observée d'une part phénotypiquement : pour le moment, aucun marqueur de surface ne permet de différencier les  $L_{Treg} CD8^+$  des  $L_T CD8^+$  conventionnels (Lu and Cantor, 2008). Ils sont donc définis par une combinaison de marqueurs différents d'un modèle à un autre (Tableaux 5 et 6). Le nombre de populations de  $L_{Treg} CD8^+$  décrites à la fois chez l'homme et chez le rongeur a largement augmenté ces dernières années. A ma connaissance, plus d'une dizaine de populations différentes ont été identifiées (Tableaux 5 et 6). Les  $L_{Treg} CD8^+$  ont été décrits dans de nombreux modèles d'autoimmunité (Hu et al., 2004; Najafian et al., 2003; Rifa'i et al., 2004; Tang et al., 2006), d'alloimmunité (Boor et al., 2011; Dai et al., 2010; Ezzelarab et al., 2016; Guillonnet et al., 2007; Xystrakis et al., 2004), de développement tumoral (Filaci et al., 2007; Wei et al., 2005) ou dans le contrôle de la réponse immunitaire lors d'infections (Chen et al., 2013b; Molloy et al., 2011).

**Tableau 5 : Les différentes populations de L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> décrites chez la souris et le rat**

Espèce	Dénomination	Pathologie/modèle	Origine	Spécificité antigénique	Phénotype	Mécanisme de suppression	Ref
Souris	L <sub>Treg</sub> restreint par Qa-1	modèle d'autoimmunité (EAE, diabète de type I, Lupus)	Thymique	Complexe Qa-1-peptide à la surface des L <sub>T</sub> CD4 <sup>+</sup> activés	phénotype mémoire : CD44 <sup>+</sup> CD122 <sup>+</sup> Ly49 <sup>+</sup> Ly6c <sup>+</sup> marqueurs des Treg : CTLA-4- et CD127 inchangés FoxP3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> et GITR <sup>+</sup>	Induction de la mort de L <sub>T</sub> CD4 <sup>+</sup> activés (perforine) et induction de signaux négatifs contact dépendant. Inhibition de l'activité des L <sub>TFH</sub>	1
	L <sub>Treg</sub> CD8αα restreint par Qa-1	modèle d'EAE (vaccination contre la MBP)	expansion <i>in vivo</i> après vaccination contre le Vβ8.2	Complexe Qa-1-peptide du Vβ8.2 exprimé par les L <sub>T</sub> CD4 <sup>+</sup> spécifiques de la MBP	après stimulation de clones <i>in vitro</i> : CD69 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD122 <sup>int</sup> CD44 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup>	Induction de la mort des L <sub>T</sub> CD4 <sup>+</sup> spécifiques de la MBP (TCR Vβ8.2)	2
	L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> CD122 <sup>+</sup> Treg	autoimmunité et homéostasie des populations lymphocytaires	Thymique		phénotype mémoire : CD44 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>	Les travaux suivants précisent que le sous type CD49d <sup>low</sup> (Akane PNAS 2016) ont de plus fortes capacités suppressives induite par l'apoptose de L <sub>T</sub> cibles via Fas -FasL	3
	L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	modèle d'EAE chez la souris CD28 KO (susceptible à l'EAE si déplétion des L <sub>T</sub> CD8 <sup>+</sup> dans un modèle induit par la MOG)	Thymique		phénotype mémoire : CD122 <sup>+</sup> CD45RB <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> et CD62L <sup>+</sup> NK1.1 <sup>-</sup> CD25 <sup>-</sup> CD210 <sup>-</sup> CD132 <sup>+</sup>	Suppression des L <sub>T</sub> CD4 <sup>+</sup> spécifiques de la MOG (diminution de la prolifération et de la sécrétion d'IFNγ), suppression nécessitant la présence de CPAs et contacte dépendante.	4
	L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> CD122 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup>	modèle allogénique de greffe de peau chez la souris B6 Rag KO reconstituée	Thymique		phénotype mémoire : CD44 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>	Inhibition de l'activation et de la prolifération de L <sub>T</sub> par sécrétion d'IL-10 (optimale si engagement de CD28 et PD1)	5
	L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> CD11c <sup>hi</sup>	modèles d'infection à <i>Listeria monocytogenes</i> ou <i>Staphylococcus aureus</i> (stades tardifs de la réponse)	Périphérique : retrouvés dans la rate		phénotype mémoire : CD122 <sup>hi</sup> CD69 <sup>low</sup> CD44 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> cytokines : IFNγ <sup>-</sup> , IL10 <sup>-</sup> , TGFβ <sup>-</sup>	Cytotoxicité potentielle contre les cellules cibles (FasL <sup>hi</sup> ) mais surtout contre les L <sub>T</sub> CD4 <sup>+</sup> activés <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> et de façon antigène indépendante	6
	L <sub>T</sub> CD8 <sup>+</sup> suppressif	modèle murin d'infection à l'herpesvirus γ : les L <sub>T</sub> CD8 <sup>+</sup> spécifiques injectés deviennent suppressif (sécrétion d'IL-10)	Transfert adoptif de L <sub>T</sub> CD8 <sup>+</sup> spécifiques		CD127 <sup>low</sup> CD43 <sup>hi</sup> CD62L <sup>low</sup> CD44 <sup>int</sup> PD-1 <sup>+</sup> expression de CD122	sécrétion d'IL-10 par des L <sub>T</sub> CD8 <sup>+</sup> (pool de cellules spécifiques et non spécifiques du virus)	7
Rat	L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> CD45RC <sup>low</sup>	<i>in vitro</i> puis <i>in vivo</i> dans un modèle de GvHD chez le rat	Thymique		FoxP3 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup>	Diminution de la prolifération et la différenciation des L <sub>T</sub> CD4 <sup>+</sup> autologues, par des mécanismes contacts dépendants	8
	L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> CD45RC <sup>low</sup>	Induits <i>in vivo</i> par traitement avec CD40lg, permettent l'acceptation d'allogreffes cardiaques		Reconnaissance d'allopeptides dérivés de CMH	FoxP3 <sup>+</sup> , GITR <sup>+</sup>	Importance de la production d'IFNγ et d'IDO dans la suppression du rejet	9

- 1 : Hu et al., 2004  
 2 : Tang et al., 2006  
 3 : Rifa'i et al., 2004  
 4 : Najafian et al., 2003  
 5 : Dai et al., 2010  
 6 : Chen et al., 2013b  
 7 : Molloy et al., 2011  
 8 : Xystrakis et al., 2004  
 9 : Guillonnet al., 2007

**Tableau 6** : Les différentes populations de L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> décrites chez le singe et l'homme

Espèce	Dénomination	Pathologie/modèle	Origine	Spécificité antigénique	Phénotype	Mécanisme de suppression	Ref	
Singe Rhesus	L <sub>T</sub> CD8 <sup>+</sup> Eomes <sup>low</sup> CTLA-4 <sup>hi</sup>	modèle de greffe rénale chez le singe		allospécifique		Pas de démonstration de leur effet sup- presseur mais leur augmentation chez le singe est associée à la survie	10	
	L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	<i>in vitro</i> , par stimulation par des monocytes CD14 <sup>+</sup> en présence d'Ac anti-CD3/28 ou de SEB	<i>in vitro</i>		CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> GITR <sup>+</sup> sécrétion de GrA, GrB et Perforine	Suppression contact dépendante malgré la sécrétion de PGE2, IL-10 et TGFβ Diminution de la prolifération et de la production de cytokines mais pas des capacités cytotoxiques des L <sub>T</sub> CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup>	11	
	L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> Lag3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CCL4 <sup>+</sup>	restimulation <i>in vitro</i> de PBMCs de patients et détection dans des granulomes de patients	<i>in vitro</i>	BCG principalement	Lag3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CCL4 <sup>+</sup>		12	
L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>-</sup>	déTECTés dans les TIL extraits de tumeurs humaines, aussi présents dans LN des organes métastasés et dans le sang périphérique	TIL (Tumor Infiltrating Cells)			CD28 <sup>low</sup>	Leur génération dépend de la sécrétion d'IL-10 ou GM-CSF par cellules tumorales. Papier souhaitant montrer la présence de L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> dans les tumeurs	13	
Humain	L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup>	Stimulation allogénique <i>in vitro</i> de L <sub>T</sub> CD8 <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup> de PBMC de pa- tients sains	<i>in vitro</i>	allogénique (stimulation en présence de PBMC irradiés)		CD103 <sup>+</sup> sécrétion d'IL4, IL-10 et TGFβ	La suppression <i>in vitro</i> ne dépend pas de l'alloantigène, mais est contact dépen- dant, malgré la sécrétion de cytokines anti-inflammatoire	14
	L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> Lag3 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup>	L <sub>Treg</sub> induits <i>in vitro</i> par des pDCs humains allogéniques stimulés par des ligands de TLR	<i>in vitro</i>	allogéniques (stimulation par pDCs allogéniques)		CD38 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> Lag3 <sup>+</sup>	La suppression dépend de CTLA-4 et non pas d'une mort induite ou de la sécrétion de cytokines	15
	L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	pDCs présents dans les ascites de patients atteints de cancers, isolés pour stimuler des L <sub>T</sub> autologues présents dans les ascites	<i>in vitro</i>	peptide de Her2/neu (Ag tumoral)		IL-10 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	Suppression de la fonction effectrice de L <sub>T</sub> activés avec des cellules myéloïdes via la sécrétion d'IL-10	16
	L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	identification de CXCR3 comme marqueur de L <sub>Treg</sub> CD8 <sup>+</sup> CD122 <sup>+</sup> murin. Présence de L <sub>T</sub> CD8 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup> CD122 <sup>-</sup> chez l'homme (PBMC) avec capacité suppressive <i>in vitro</i>	Thymique			CD45RA <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	Inhibe la prolifération et la sécrétion d'IFNγ Sécrétion d'IL-10 mais il n'est pas décrit si les mécanismes de suppression en dépen- dent.	17

10 : Ezzelarab et al., 2016

11 : Mahic et al., 2008

12 : Joosten et al., 2007

13 : Filaci et al., 2007

14 : Uss et al., 2006

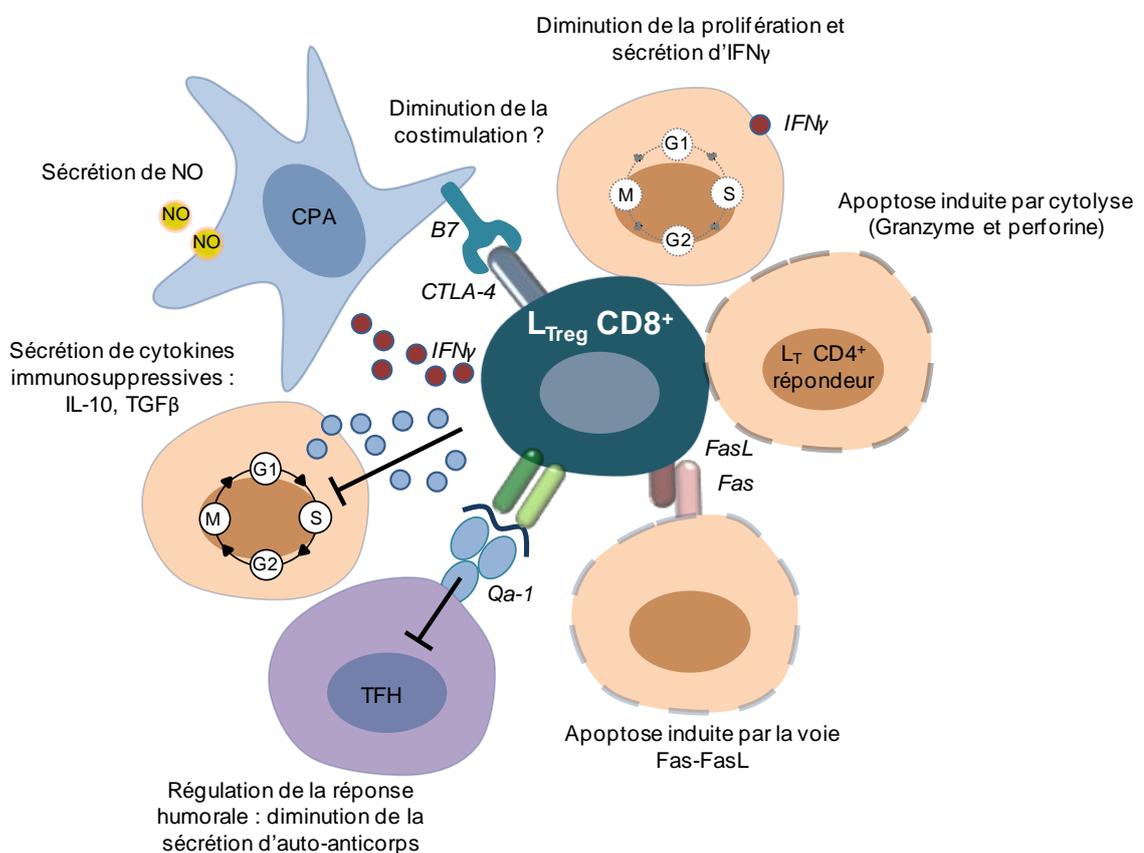
15 : Boor et al., 2011

16 : Wei et al., 2005

17 : Shi et al., 2009

La recherche d'homologies avec les  $L_{Treg} CD4^+$  a néanmoins permis de mettre en évidence l'expression de chaînes communes du récepteur à l'IL-2 chez la souris. Alors que les  $L_{Treg} CD4^+$  expriment fortement la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2, c'est la chaîne beta (CD122), commune avec le récepteur à l'IL-15 qui est surexprimée généralement par les  $L_{Treg} CD8^+$ . L'IL-15 est d'ailleurs un facteur clé dans le développement des  $L_{Treg} CD8^+$  chez la souris : il est impossible d'en détecter chez des souris déficientes en IL-15 (Kim and Cantor, 2011; Liu et al., 2015). Cependant, l'expression du CD122 ne permet pas d'identifier les  $L_{Treg} CD8^+$  chez l'homme. Le facteur de transcription FoxP3, associé aux fonctions suppressives des  $L_{Treg} CD4^+$  (Zheng and Rudensky, 2007), n'est pas nécessairement exprimé par les  $L_{Treg} CD8^+$ .

#### b- Les mécanismes de suppression des $L_{Treg} CD8^+$



**Figure 8 :** Les principaux mécanismes de suppression des  $L_{Treg} CD8^+$

Du fait de la diversité des  $L_{Treg} CD8^+$ , un large panel de mécanismes suppresseurs a été mis en évidence. La plupart des  $L_{Treg} CD8^+$  décrits dans la littérature sécrètent de fortes quantités d'IL-10 et parfois de TGF $\beta$ , mais elles ne sont généralement pas associées directement à la suppression *in vitro* (Figure 8 et Tableaux 5 et 6). La sécrétion d'IL-10 par les  $L_{Treg} CD8^+ CD122^+$  murins permet l'inhibition de la prolifération de  $L_T$  répondeurs *in vitro* (Dai

et al., 2010). La sécrétion d'IL-10 est optimale lorsque PD-1 et CD28 sont engagés dans ce modèle. *In vivo*, le blocage de l'IL-10 produit par les L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> accentue le rejet d'allogreffe de peau chez la souris (Dai et al., 2010). *In vitro*, il a été montré que la production de TGFβ par les L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> facilitait la différenciation de L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> conventionnels en L<sub>T</sub> régulateurs exprimant FoxP3 (Lerret and Luo, 2014). La suppression peut aussi être causée par la production d'IFNγ et d'IDO, inhibant la prolifération de L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> alloréactifs *in vitro* (Li et al., 2010).

Dans la majeure partie des cas, la suppression nécessite un contact cellulaire. Les L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> peuvent engendrer la mort de L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> répondeurs par sécrétion de perforines (Lu et al., 2008) ou par induction de l'apoptose dépendante de la voie Fas/FasL (Akane et al., 2016) (Figure 7). Les travaux de cette équipe suggèrent un rôle primordial des L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> CD122<sup>+</sup> dans le maintien de l'homéostasie des populations lymphocytaires. Ces résultats sont appuyés par le fait que l'induction de la mort de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> CD122<sup>-</sup> (cibles) par l'engagement de Fas n'est possible qu'après leur reconnaissance par le TCR des L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> (Akane et al., 2016).

Les L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> peuvent aussi altérer l'expression de molécules de costimulation par les CPAs *in vitro* (Lerret and Luo, 2014) (Figure 7). Par homologie avec les L<sub>Treg</sub> CD4<sup>+</sup>, ce mécanisme pourrait dépendre de l'expression de CTLA-4. L'expression de Lag3 et PD-1 par certaines populations de L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> pourrait aussi contribuer à limiter l'activation de L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> en périphérie. Les L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> restreint à Qa-1 sont aussi impliqués dans la régulation de la production d'auto-anticorps, en inhibant l'activation de L<sub>TFH</sub>. La modification génétique de Qa-1 à la surface des L<sub>TFH</sub> inhibe les processus de régulation, conduisant au développement de symptômes autoimmuns chez la souris (Kim et al., 2010) (Figure 7).

### c- Les L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> en transplantation

Une grande partie des études portant sur les L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> ont montré leur importance dans le contrôle de la tolérance au soi, notamment dans des modèles d'autoimmunité chez la souris comme l'EAE (Tang et al., 2006) ou le Lupus érythémateux disséminé (Kim et al., 2010). Les L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> peuvent aussi contribuer à l'amélioration de la survie d'allogreffe. Le transfert adoptif de L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> CD122<sup>+</sup>, présents naturellement dans la rate de souris naïves, améliore plus efficacement la survie d'îlots pancréatiques que le transfert de L<sub>Treg</sub> CD4<sup>+</sup> dans un modèle de souris lymphopéniques et reconstituées (Dai et al., 2014). Dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, le blocage de la costimulation à l'aide de CD40Ig permet la survie à long terme du greffon, associée à l'induction de L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> CD45RC<sup>low</sup> (Guillonnet et al., 2007). Les L<sub>Treg</sub> reconnaissent un peptide dominant dérivé de la région polymorphique de CMH II du donneur. L'expansion de L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> CD45RC<sup>low</sup> par des pDCs présentant ces

peptides permet de conserver leur fonction et d'induire la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat naïf (Picarda et al., 2014). Des populations de  $L_{Treg} CD8^+$  sont aussi impliquées dans la prolongation de la survie à des allogreffes de CSH et à des xénogreffes de cornée (Ligocki and Niederkorn, 2015).

Chez l'homme, la fréquence de  $L_{Treg} CD8^+ CD28^-$  est augmentée dans le sang de patients après transplantation cardiaque comparée à des donneurs sains (Colovai et al., 2003). Des études antérieures ont démontré *in vitro* que les  $L_{Treg} CD8^+ CD28^-$  humains pouvaient supprimer la réponse alloréactive des  $L_{TH}$  après reconnaissance de molécules de CMH I du donneur (inhibition de l'expression des molécules de costimulation) (Liu et al., 1998).

## V- Les Lymphocytes T effecteurs et anergiques participent au maintien de la tolérance

Le rôle immunorégulateur des  $L_{Treg}$  dans le microenvironnement inflammatoire a largement été décrit. La présence de cellules anergiques dans le milieu pourrait aussi orienter la réponse immunitaire. Certaines démonstrations expérimentales vont d'ailleurs dans ce sens. *In vitro*, la culture de  $L_T CD4^+$  mais aussi de  $L_T CD8^+$  rendus anergiques en présence de  $L_T$  répondeurs et de DCs présentant l'antigène induit une diminution de la prolifération des cellules répondeuses qui est dépendante du contact cellulaire mais indépendante de facteurs solubles. Ces observations sont associées à une diminution de l'expression de CMH II et de molécules de costimulation CD80 et CD86 et impliquent l'expression de CTLA-4 par les cellules rendues anergiques (Steinbrink et al., 2002; Vendetti et al., 2000).

L'importance des cellules anergiques dans le maintien de la tolérance aux antigènes du soi a été démontrée *in vivo* en 2016. Les auteurs ont identifié des marqueurs ( $FoxP3^+ CD44^{hi} CD73^{hi} FR4^{hi}$ ) permettant d'isoler des  $L_T CD4^+$  auto-réactifs, polyclonaux et anergiques chez des souris saines. Les  $L_T CD4^+$  anergiques représentent 2 à 5% des  $L_T CD4^+$  périphériques et restent à un état quiescent malgré l'expression membranaire de marqueur d'activation (CD69, PD-1 et CTLA-4), généralement associé à l'engagement du TCR. *In vivo*, les  $L_T CD4^+$  anergiques sont capables de se différencier en  $L_{Treg}$ , d'exprimer FoxP3 et de contrôler des réponses autoimmunes. Ce sont donc des précurseurs potentiels de cellules régulatrices (Kalekar et al., 2016). Ces résultats démontrent les fortes capacités d'adaptation de la réponse immunitaire visant à contrôler et maintenir l'intégrité des tissus ciblés par de potentielles cellules auto-réactives.

Lors de pathologies microbiennes, la production de facteurs solubles comme les TNF permet le contrôle des infections intracellulaires, et contribue aussi au développement de l'inflammation, pouvant causer de forts dommages tissulaires. L'établissement de patholo-

gies chroniques peut même conduire à un fort remodelage des tissus et des phénomènes de fibroses. Dans des modèles d'infections parasitaires (malaria et leishmaniose), associés à des hauts niveaux de relargage de TNF, le contrôle des dommages tissulaires est régulé par la production d'IL-10 dépendante de l'expression de Blimp-1 par les  $L_T CD4^+$  (Montes de Oca et al., 2016). Dans ces différents modèles, Blimp-1 est exprimé par les  $L_T CD4^+$  spécifiques sécrétant de l'IFN $\gamma$  en présence d'IL-12, produite largement lors d'inflammation. Lors d'infections chroniques au LCMV chez la souris, l'expression de Blimp-1 par les  $L_{TH1}$  spécifiques du virus permet leur déviation en cellules sécrétant de l'IL-10, ce qui constitue une nouvelle voie de contrôle négatif de la réponse anti infectieuse (Parish et al., 2014) et contribue à nouveau à la protection du soi contre des réponses immunitaires excessives.

Ces résultats récents suggèrent que des cellules caractérisées par leur état de dysfonction ou des cellules effectrices sont capables de se différencier sous certaines conditions et d'acquérir de nouvelles fonctions, et notamment des fonctions suppressives et régulatrices. Il s'agit de nouvelles boucles de contrôle des réponses immunitaires généralement exacerbées et pouvant conduire à une forte perte d'intégrité tissulaire.

## VI – La tolérance en transplantation

### 1- La tolérance opérationnelle

La prise de traitements immunosuppresseurs chez des patients transplantés a permis de largement augmenter la survie des greffons. Dès les années 1990, plusieurs cas de tolérance à des greffes rénales ou hépatiques (Starzl et al., 1993a) ont été observés. Ces cas spontanés de tolérance sont généralement mis en évidence après arrêt de la prise de traitements immunosuppresseurs chez des patients non observant ou lors de complications liées à la forte immunosuppression (toxicité, développement tumoral, Partie I.III.2). La tolérance dite opérationnelle après transplantation est aussi observée en clinique, où environ 20% des patients conservent un greffon fonctionnel malgré la diminution voire l'arrêt des traitements immunosuppresseurs lors de transplantation hépatique (Levitsky, 2011).

Les modèles plus anciens d'allogreffes hépatiques chez le cochon (Calne et al., 1969) avaient déjà démontré la forte proportion de tolérances spontanées et spécifiques des antigènes du donneur. La greffe hépatique réalisée en même temps qu'une greffe rénale permet même une survie indéfinie du rein greffé, alors qu'il est rejeté rapidement par des animaux contrôles (Calne et al., 1969). Chez le rat, les greffes simultanées de foie et de cœur (Kamada and Wight, 1984), de rein (Kamada et al., 1985) ou de peau (Kamada et al., 1980) favorisent l'acceptation des greffons. Les mécanismes favorisant l'induction de la tolérance systé-

mique après une greffe de foie sont mal compris. Ils pourraient dépendre de la présence de molécules de CMH I solubles (Sumimoto and Kamada, 1990) fortement synthétisées au niveau du foie (Spencer and Fabre, 1987) et pouvant inhiber les CTL spécifiques des antigènes du greffon. D'autres hypothèses suggèrent la présence de molécules Fas solubles ou d'autres facteurs solubles non identifiés (Alex Bishop et al., 2012). Il a aussi été émis la possibilité de l'établissement d'un chimérisme de cellules hématopoïétiques provenant du foie du donneur chez le receveur, même si aucune évidence expérimentale n'a encore été apportée.

Chez l'homme, les études cliniques montrent aussi un effet protecteur de la greffe de foie sur la greffe rénale, avec des taux de rejets aigus et chroniques plus faibles que chez des patients greffés rénaux (Lang et al., 2001). La combinaison des deux greffes protège simultanément du rejet des deux organes, avec une diminution significative de rejet de l'allogreffe hépatique comparée au rejet observé chez des patients greffés seulement d'un foie (Rana et al., 2008). Ces données cliniques et précliniques démontrent d'une part, la possibilité d'induire une tolérance immune spécifique des antigènes du donneur chez l'homme et d'autre part, l'apport des propriétés tolérogènes du foie dans la tolérance allogénique systémique, même si les mécanismes sont encore incompris.

## 2- L'induction de la tolérance à la greffe : nouvelles stratégies et problématiques

Rendre le système immunitaire du receveur tolérant vis-à-vis des antigènes du greffon pourrait en théorie permettre d'éviter le rejet du greffon tout en palliant aux problèmes liés à la prise des traitements immunosuppresseurs. Actuellement, plusieurs stratégies d'induction de la tolérance à la greffe sont testées chez l'homme dans le cadre d'essais cliniques, certaines spécifiques du donneur comme l'induction d'un chimérisme entre cellules hématopoïétiques du donneur et du receveur. D'autres stratégies sont basées sur les connaissances des médiateurs cellulaires de la régulation de la réponse immunitaires et visent à induire la tolérance spécifique ou non spécifique du donneur par injection de cellules régulatrices :  $L_{Treg}$ , DCs tolérogènes ou encore macrophages ou cellules souches mésenchymateuses (MSC).

### a- Induire un chimérisme

Les stratégies d'induction d'un chimérisme pour favoriser la tolérance à une greffe d'organe ont largement été développées et elles ont démontré leur efficacité chez le rongeur dès les années 1990 (Jankowski and Ildstad, 1997). La principale barrière dans la constitution d'un chimérisme est la réaction immunitaire dirigée d'une part contre les cellules souches hématopoïétiques (CSH) du donneur et d'autre part les réactions des cellules diffé-

renciées du donneur contre l'hôte (ou GvHD pour Graft versus Host Disease). Ces réactions dépendent en premier lieu du conditionnement à la fois du receveur et des CSH du donneur. Plusieurs essais cliniques ont été menés chez des patients avec des variations dans les protocoles de constitution du chimérisme (traitements lymphodéplétants, irradiation lymphoïde ou thymique, conditionnement des CSH du donneur). Les patients inclus dans ces essais cliniques reçoivent simultanément une greffe rénale ainsi qu'un traitement d'induction immunosuppresseur, dont la dose diminue au cours de la première année. Les résultats de ces différentes études sont prometteurs et ils démontrent la persistance du chimérisme à 1 an post-greffe, avec une réduction conséquente voire un arrêt total de la prise de traitement immunosuppresseurs sans signes de rejet chez environ la moitié des patients inclus dans ces essais (Kawai et al., 2008; Leventhal et al., 2012; Scandling et al., 2012).

#### b- Thérapies cellulaires basées sur l'utilisation de $L_{Treg}$

D'autres approches de thérapies cellulaires sont testées actuellement en transplantation. L'importance des  $L_{Treg}$  dans l'induction et le maintien de la tolérance en transplantation a d'abord été observée dans différents modèles expérimentaux puis chez les patients ayant acquis une tolérance opérationnelle (Graca et al., 2002; Levitsky, 2011). Le développement de techniques permettant d'amplifier efficacement les  $L_{Treg}$  *in vitro* tout en conservant leur phénotype et leurs fonctions suppressives (Earle et al., 2005; Hoffmann et al., 2004) a permis leur utilisation en transplantation. Les modèles animaux ont par ailleurs mis en évidence l'intérêt d'utiliser des  $L_{Treg}$  spécifiques d'antigènes du donneur (Joffre et al., 2008; Sagoo et al., 2011), bien qu'ils soient plus difficiles à isoler et à amplifier (Page et al., 2012). Leur utilisation chez l'homme dans le traitement de la GvHD ou du diabète de type I a donné des résultats encourageants. Des essais cliniques sont actuellement en cours chez des patients transplantés (rein ou foie), avec par exemple, des résultats prometteurs et un arrêt des traitements immunosuppresseurs chez 7/10 patients transplantés hépatiques et ayant reçu simultanément des  $L_{Treg}$  autologues amplifiés *in vitro* et spécifiques du donneur (Todo et al., 2016).

#### c- Orientation de la présentation antigénique : utilisation de CPAs tolérogènes

Les nombreuses propriétés immunorégulatrices des DCs immatures ou rendues tolérogènes (faible expression de molécules de CMH et de costimulation, sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, résistance à l'activation par les signaux de danger et à la ligation de CD40L, induction de l'apoptose des  $L_T$  effecteurs et induction de  $L_{Treg}$ ) (Thomson et al., 2009) font de ces cellules de bonnes cibles dans l'induction de la tolérance. Suite à de très bons résultats précliniques, des essais d'induction par transfert de DC tolérogènes sont envisagés en transplantation chez l'homme. Des essais cliniques de phase I ont été menés

dans le traitement du diabète de type I (Giannoukakis et al., 2011) et de l'arthrite rhumatoïde (Benham et al., 2015) avec la preuve de faisabilité et de la potentielle efficacité de la thérapie. D'autres cellules d'origine myéloïde ont fait l'objet d'études cliniques. L'injection de macrophages immunorégulateurs (ou Mreg, ou TAIC pour Transplant Acceptance-Inducing Cells) chez des patients transplantés rénaux a permis de minimiser de façon précoce la prise de traitements immunosuppresseurs sans provoquer d'épisodes de rejet aigu 3 ans après la greffe (Hutchinson et al., 2008a, 2008b).

Les cellules stromales mésenchymateuses ont la capacité d'inhiber l'activation et la prolifération des  $L_T$  par production d'IDO par exemple. Elles favorisent l'augmentation de la proportion de  $L_{Treg}$  et leur injection simultanée lors de greffes d'îlots pancréatiques chez le rat a permis d'améliorer la survie des greffons à long terme. La pertinence de leur utilisation chez l'homme reste à démontrer, les résultats d'essais cliniques menés sur des patients atteints de GvHD sont pour le moment contradictoires et ils ne démontrent pas de bénéfice de la thérapie (Allison, 2009; Le Blanc et al., 2008). Le potentiel pour induire la tolérance en transplantation d'autres types cellulaires comme les MDSCs (pour Myeloid-derived suppressor cells) (Dilek et al., 2012) et de certaines populations de  $L_B$  (Chesneau et al., 2013) a été testé dans des modèles précliniques avec des résultats encourageants (Chou et al., 2012; Dugast et al., 2008; Durand et al., 2015).

#### d- Les problèmes de la thérapie cellulaire en transplantation

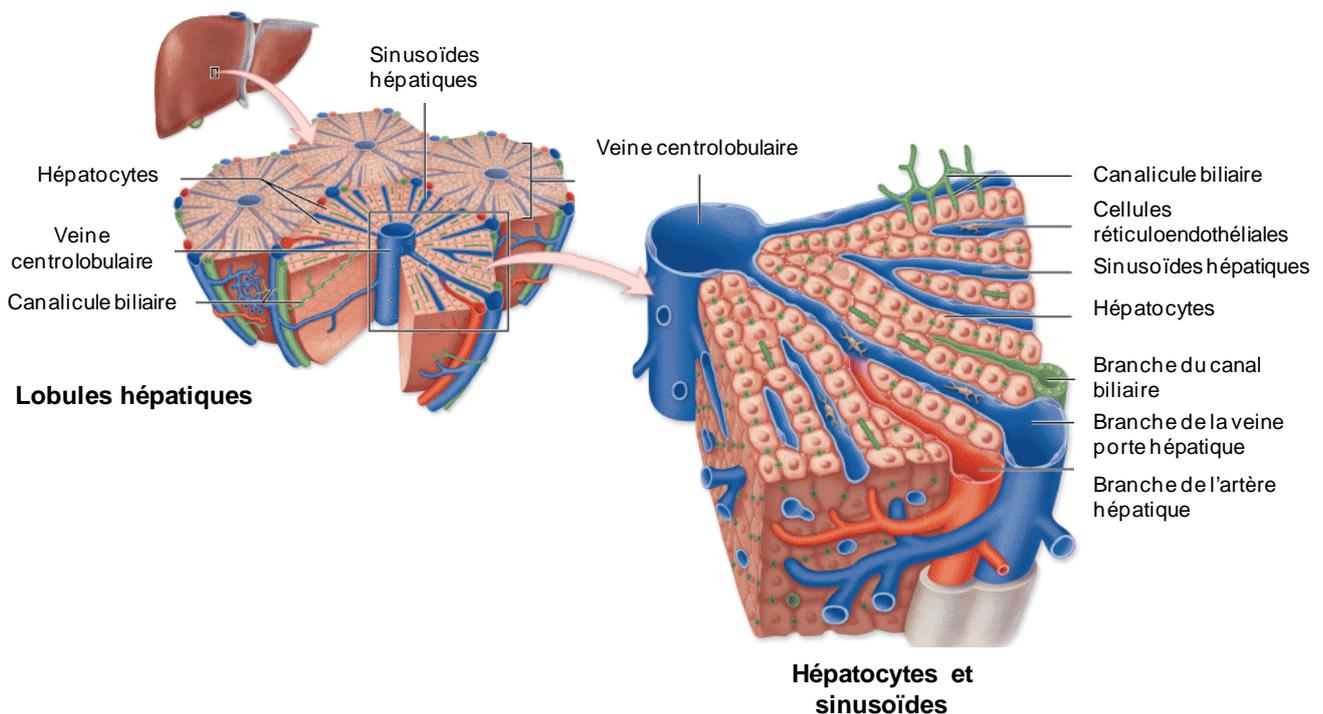
Les traitements basés sur la thérapie cellulaire ont montré de bons résultats dans des modèles précliniques mais le degré d'immunorégulation n'est pas suffisant pour induire une tolérance totale en transplantation chez l'homme et ils nécessitent la combinaison avec d'autres traitements immunosuppresseurs. Ils ont aussi soulevé un certain nombre de problèmes, liés principalement aux procédures de conditionnement ou d'expansion des cellules régulatrices, avec des difficultés de reproductibilité notamment entre les différents centres d'investigation et nécessitant la standardisation des procédures, la nécessité d'une logistique et de structures importantes, de matériel qui génèrent des coûts de production élevés. Ces stratégies soulèvent aussi des questionnements d'ordre biologique, liés à la stabilité et la pureté des cellules injectées (différenciation après injection ou présence dans le pool de cellules effectrices ou pro inflammatoires), à la génération d'effets non désirés et principalement la suppression non spécifique de l'immunité (apparition de cancers, augmentation du risque d'infection) (Bluestone et al., 2007). Ces différentes problématiques laissent la voie ouverte au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, et nous verrons par la suite l'intérêt que peuvent apporter par exemple les outils de transfert de gène en transplantation.

## Partie 3 : Le foie, haut lieu de la tolérance immunologique

« *Ami modeste et organisé. Travailleur profond, permets que je te donne l'aile de mon chant. Le coup d'air, le bondissement de mon Ode. Elle naît de ton invisible machine et prend son vol dans ton infatigable et secret moulin, entraille délicate et puissante toujours vive et obscure. Tandis que le cœur sonne et s'arroe la partition de la mandoline, à l'intérieur toi tu filtres, distribues, sépares, divises, multiplies, graisses, fais monter et recueilles les filets et les grâces de la vie.* » Pablo Neruda, Ode au Foie, 1956

Cette troisième partie a pour objectif de démontrer l'intérêt de cibler le foie dans le développement de nouvelles stratégies d'induction de la tolérance. Je décrirai dans un premier temps, les particularités immunologiques du foie, et m'intéressant tout particulièrement à ses propriétés tolérogènes. Basé sur les nombreux travaux de thérapie génique déjà existant, je montrerai comment il est possible d'induire un état de tolérance en exprimant une protéine exogène spécifiquement dans le foie.

### I- Généralités et anatomie du foie



**Figure 9** : La microanatomie du foie. Le foie est composé de lobules hépatiques, autour desquels se situent des espaces portes constitués des branches de la veine porte hépatique, de l'artère hépatique et des canaux biliaires. Le sang d'origine portal et artériel se mélange dans de petits capillaires drainant la totalité des lobules hépatiques et appelés sinusoides. Les sinusoides se rejoignent au niveau des veines centrolobulaires qui drainent la veine cave inférieure. Source : Mescher and Junqueira, 2013

Le foie est un organe au rôle majeur dans l'organisme, responsable de plus de 500 fonctions différentes, impliqué dans la synthèse de protéines, d'hormones, de facteurs sériques, dans la détoxification, dans la production de la bile, dans le stockage du glycogène, dans l'élimination et le renouvellement des érythrocytes. Le foie est situé en haut de la cavité abdominale, juste sous le diaphragme. Sans doute parce qu'il est impliqué dans autant de fonctions, le foie est l'organe interne le plus volumineux. Chez l'homme, il est constitué de 4 lobes de taille différente. Sa micro-architecture reflète les nombreuses fonctions hépatiques. Le foie est composé de lobules hépatiques, autour desquels se situent des espaces portes constitués d'artérioles, de veinules portaux et de conduits biliaires. Il est perfusé par du sang provenant de l'artère hépatique mais aussi, et c'est ce qui en fait sa grande particularité, du sang veineux provenant de la veine porte. La veine porte provient directement de la rate, du pancréas et du tube digestif. Le sang d'origine portal et artériel se mélange dans de petits capillaires drainant la totalité des lobules hépatiques et appelés sinusoides. C'est un sang particulièrement riche en oxygène mais aussi en composants dérivés de la flore bactérienne intestinale et de nutriments absorbés dans le tractus digestif. Les sinusoides se rejoignent au niveau des veines centrolobulaires qui drainent la veine cave inférieure (Figure 9).

Les hépatocytes, représentant environ 60% des cellules du foie, ne sont pas en contact direct continu avec la circulation sanguine. Les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques ou LSECs (pour Liver Sinusoide Endothelial Cells) forment une barrière fenestrée séparant les hépatocytes du flux sanguin et générant un espace appelé espace de Disse. Une partie des cellules immunitaires du foie y sont d'ailleurs situées. Les nombreuses fonctions du foie nécessitent un flux sanguin important et régulier. Chez l'homme, le volume sanguin perfusant le foie par jour est supérieur à 2000 litres. Avec ce fort afflux sanguin, les leucocytes présents dans le sang circulent plus de 300 fois par jour dans le foie, dans un flux ralenti (25 à 250  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) ce qui favorise les interactions entre les leucocytes et l'endothélium sinusoidal. En parallèle, le sang provenant du système porte est très riche en antigènes provenant de l'alimentation et de la flore bactérienne intestinale. Le foie est donc le point de rencontre principal entre les antigènes provenant du système porte et les leucocytes sanguins. Le foie est aussi particulièrement enrichi en éléments du système immunitaire, impliqués à la fois dans la réponse innée et adaptative.

## II- Le foie vu comme un organe lymphoïde impliqué dans la tolérance immunologique

### 1- Une multitude de réactions immunitaires siègent dans le foie

Les divers antigènes provenant du système porte sont des agents potentiellement activateurs de la réponse immunitaire au niveau du foie. Classiquement, une telle richesse antigénique serait la cause d'une inflammation perpétuelle causant des dommages tissulaires et cellulaires importants et un afflux massif de leucocytes pro-inflammatoires. En fait, la réponse immunitaire à ces antigènes est faible voire inexistante dans le foie et cela malgré la présence de l'ensemble des composantes moléculaires et cellulaires nécessaires au développement d'une réponse immune conventionnelle. Des mécanismes évolutifs favorisant le développement d'un environnement tolérogène se sont mis en place pour limiter la réponse immunitaire, et ainsi conserver l'intégrité du tissu hépatique et ses fonctions, malgré la présence importante d'antigènes exogènes. Ces mécanismes d'autoprotection limitent toute réponse exacerbée. L'implication du foie dans le phénomène de tolérance orale montre son potentiel tolérogène au niveau systémique. Ce processus connu depuis les années 1940 (Chase et Sultzburger) permet de limiter toute réaction d'hypersensibilité envers les antigènes d'origine alimentaire ou administrés par voie orale. Le rôle du foie dans l'induction de la tolérance orale a été suggéré en 1967 par H. Cantor et A. Dumont (Cantor and Dumont, 1967) mais les mécanismes ont été mis en évidence plus tardivement. Callery et collaborateurs en développant un modèle de dérivation portale chez le rat, empêchant la circulation des antigènes d'origine alimentaire dans le foie, ont observé que l'hypersensibilité provoquée par l'injection sous cutanée d'ovalbumine mélangée à un adjuvant est significativement atténuée chez des rats ayant ingéré l'ovalbumine 7 jours avant le test d'hypersensibilité. La tolérance disparaît lorsqu'une dérivation portale est appliquée. L'ingestion et la présentation des antigènes oraux dans le foie est essentielle au développement de la tolérance orale (Callery et al., 1989).

Les propriétés tolérogènes du foie ont aussi été observées en transplantation. Calne et collaborateurs (Calne et al., 1969) ont, en effet, démontré à l'aide d'un modèle de greffe allogénique de foie chez le porc :

- (1) que la greffe hépatique avait une survie sans immunosuppression plus importante que d'autres greffes
- (2) qu'elle favorisait la survie d'une seconde greffe de cœur ou de peau du même donneur
- (3) que l'injection au préalable d'antigènes solubles du foie du donneur suffisait à induire la survie du greffon.

Les propriétés tolérogènes du foie en transplantation d'abord démontrées chez l'animal ont été confirmées chez l'homme. Les premiers cas de tolérance opérationnelle ont été observés chez des patients après arrêt de la prise de traitements immunosuppresseurs, soit de façon spontanée, soit suite à l'apparition de désordres lymphoprolifératifs ou d'infections opportunistes (Rana et al., 2008; Rasmussen et al., 1995; Starzl et al., 1993b).

Le concept du foie vu comme un organe lymphoïde provient de preuves expérimentales démontrant que les  $L_T$  naïfs peuvent être directement activés par les cellules hépatiques. Le foie est riche en cellules immunitaires. En plus d'une forte proportion de macrophages spécifiques du foie, les cellules de Kupffer (KCs), principalement impliquées dans l'élimination de débris cellulaires et de toxines par phagocytose, le foie contient des lymphocytes, des cellules Natural Killer (NK), des cellules NKT, des DCs et des cellules étoilées (HSC pour Hepatic Stellate Cells). Chacune de ces cellules est impliquée dans l'immunosurveillance mais elles contribuent aussi aux mécanismes d'induction de la tolérance.

## 2- Immunité innée dans le foie

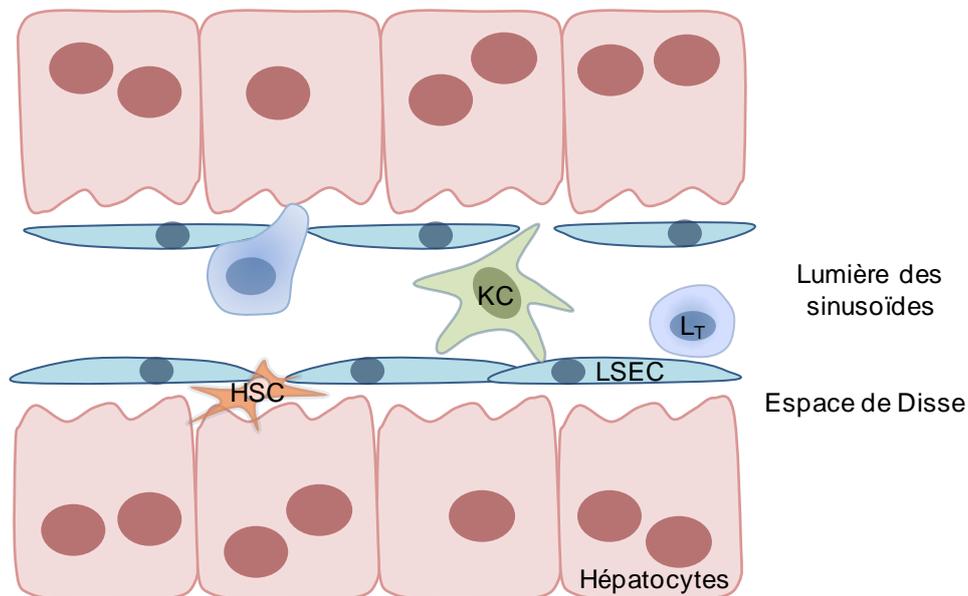
L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes extérieurs. Elle se déclenche rapidement en réponse à des molécules exprimées par de potentiels pathogènes, les PAMPs (pour Pathogen Associated Molecular Patterns) et les DAMPs. Les cellules parenchymateuses du foie (hépatocytes et cholangiocytes) ainsi que les cellules non parenchymateuses expriment des PRRs sensibles à ces différents signaux. La stimulation de PRRs conduit à l'expression de médiateurs pro-inflammatoires tels que les IFN I et l'IL-6, ainsi que d'autres facteurs favorisant la phagocytose et le recrutement de cellules immunitaires dans le foie. Les principaux PRRs sont les TLRs (pour Toll Like Receptors) exprimés à la membrane cellulaire ou endosomale. Les TLRs reconnaissent une diversité importante de molécules virales ou bactériennes. Les vecteurs viraux sont reconnus par certains TLR. Les vecteurs adénoviraux, décrits comme provoquant une forte réponse inflammatoire, sont reconnus par les TLRs 2 et 4 qui sont membranaires mais aussi 7, 8 et 9 qui sont endosomales. La reconnaissance des particules adénovirales par les TLRs engendre une forte activation et sécrétion d'IFN I (Fejer et al., 2011). Les vecteurs de type AAV (pour Adeno Associated Virus) sont reconnus par les TLRs 2 et 9. Le TLR 2 reconnaît particulièrement les protéines de la capsid virale, conduisant à une réponse inflammatoire dépendante de la voie NF- $\kappa$ B alors que le TLR 9 reconnaît l'ADN transporté par le vecteur AAV, ce qui induit la sécrétion d'IFN I (Mingozzi and Büning, 2015). Le LPS (Lipopolysaccharide), un composé dérivant de la paroi de bactéries de Gram négatif, active classiquement le système immunitaire en se fixant au TLR 4. Dans le foie, le TLR 4 est exprimé à la surface des hépatocytes, des LSECs et des HSCs qui sont constamment exposés à de bas niveaux de

LPS provenant du système porte, les rendant réfractaires à une forte réaction inflammatoire (Thomson and Knolle, 2010). D'autres récepteurs sont décrits dans le foie : les NLR (pour Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptor) sont sensibles à des composants bactériens anormalement présents dans le cytoplasme cellulaire et les récepteurs RIG-1 à certains virus.

Certaines populations cellulaires sont fortement impliquées dans les réponses innées. Les cellules NK sont plus fréquentes dans le foie que dans d'autres organes chez l'homme et le rongeur. Elles sont stimulées par des cytokines et par l'engagement de récepteurs activateurs (généralement des molécules de CMH non classiques). Les cellules NK stimulées ont un fort potentiel cytotoxique, via la sécrétion de perforine et l'expression de TRAIL pouvant, par exemple, causer la mort d'hépatocytes suite à une infection par HBV (Dunn et al., 2007). Elles sécrètent aussi des cytokines pro-inflammatoires (IFN $\gamma$ ). Dans le foie, les fonctions des NK sont altérées (expression du récepteur inhibiteur NKG2a, sécrétion de TGF $\beta$  et d'IL-10), favorisant la persistance de certains pathogènes comme le HBV et le HCV (Peng et al., 2016). Les cellules NKT sont plus fréquentes dans le foie chez la souris que chez l'homme. Elles reconnaissent des glycolipides présents au niveau des membranes bactériennes et de façon restreinte par la molécule de CMH non classique CD1d. Elles répondent à des composants de la paroi bactérienne dérivés de bactéries provenant de la flore commensale intestinale, ce qui explique à la fois leur abondance dans le foie mais aussi leur forte expression de marqueurs d'activation. Les NKT peuvent supprimer certaines réponses pro-inflammatoires pour protéger le foie de dommages tissulaires et peuvent protéger contre des lésions d'ischémie et reperfusion, des diabètes de type I et l'EAE (Bandyopadhyay et al., 2016). Les KCs, les DCs hépatiques mais aussi les LSECs sont principalement impliquées dans l'endocytose et la dégradation des débris et toxines présents dans les sinusoides.

### 3- Présentation de l'antigène dans le foie

Les phénomènes d'induction de tolérance observés dans le foie sont grandement dépendants de la façon dont sont présentés les antigènes. De nombreuses études démontrent le fort potentiel tolérogène des CPAs dans le foie. La micro-anatomie du foie favorise les interactions, notamment par les fenestrations créées par la discontinuité qu'il existe entre les LSECs, avec de nombreuses cellules spécialisées ou non dans la présentation antigénique, permettant l'activation des L<sub>T</sub> *in situ* (Figure 10). (Horst et al., 2016)



**Figure 10** : Représentation schématique de la microanatomie du foie et la localisation des principales cellules présentant les antigènes hépatocellulaires. Les  $L_T$  circulant dans les sinusoides peuvent interagir avec les LSEC formant l'endothélium, les KCs, mais aussi directement avec les hépatocytes au travers des discontinuités de l'endothélium (d'après Horst et al., 2016)

#### a- Les cellules dendritiques

Les DCs sont plus abondantes dans le foie que dans d'autres organes, ce qui est probablement lié à la forte présence de PAMPs dans le sang portal. Elles sont spécialisées dans la présentation de l'antigène et l'activation de la réponse adaptative. Il existe une certaine diversité de cellules dendritiques dans le foie : les DCs plasmacytoïdes, myéloïdes,  $CD8\alpha^+$  et les NKDCs (Natural Killer DCs) (Crispe, 2009). Les DCs hépatiques sont situés préférentiellement dans le tronc portal. Le flux sanguin y est important, ce qui défavorise les interactions avec les lymphocytes circulants. Les DCs hépatiques sont peu sensibles aux stimulations de TLRs (phénomène de tolérance aux endotoxines). Elles sont généralement moins matures que les DCs présentes dans les OLSs (faibles niveaux de CMH II et de molécules de costimulation). Les DCs activées dans le foie produisent des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et  $TGF\beta$ ) plutôt que pro-inflammatoires (IL-12) (Thomson and Knolle, 2010). Elles sont donc de faibles stimulatrices de  $L_T$  naïfs et favorisent plutôt une différenciation TH2 ou Treg.

#### b- Les cellules de Kupffer

Le foie contient une large proportion de macrophages, les cellules de Kupffer (environ 15% de la totalité des cellules hépatiques), spécialisées dans la phagocytose de débris cellulaires et de toxines provenant du système porte. Les KCs expriment des molécules de CMH I et II ainsi que des molécules de costimulation. Les KCs sont localisées dans les sinusoides hépatiques, leur permettant un lien direct avec les  $L_T$ , NK et NKT circulants. Ils jouent un rôle dans l'induction de la tolérance aux antigènes solubles et de la tolérance à la greffe hépa-

tique. Tout comme les DCs, ils expriment de faibles niveaux de CMH II et de molécules de costimulation en condition normale. La stimulation de KCs avec du LPS entraîne une forte production d'IL-10 et de TGF $\beta$ . Les KCs peuvent stimuler les L<sub>Treg</sub> et favoriser leur sécrétion d'IL-10, notamment suite à la présentation d'antigènes provenant de la dégradation d'hépatocytes apoptotiques (Crispe, 2009; Thomson and Knolle, 2010).

c- Les cellules non spécialisées dans la présentation de l'antigène

- Les LSECs :

Les LSECs peuvent phagocyter et internaliser des antigènes circulant ou dérivés d'hépatocytes pour les présenter sur des molécules de CMH I (par présentation croisée) et II. Elles expriment les molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 et sont donc capables d'activer des L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> naïfs. Elles possèdent un fort potentiel tolérogène : sécrétion d'IL-10 et perte d'expression de CMH II lors d'inflammation, différenciation des L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> en L<sub>Treg</sub> et tolérisation des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> (absence de fonctions cytotoxiques et une faible capacité à sécréter des cytokines). Ce mécanisme de tolérisation des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> est principalement lié à la forte expression de la molécule co-inhibitrice PD-L1 (Diehl et al., 2008; Knolle, 2016).

- Les hépatocytes :

Les nombreuses fonctions exercées par le foie dépendent des hépatocytes. Les réactions métaboliques génèrent de nombreux néoantigènes présentés aux L<sub>T</sub> directement par les hépatocytes. Les lymphocytes circulants peuvent contacter directement les hépatocytes via les fenestrations de l'endothélium et par pénétration dans l'espace de Disse à l'aide de filopodes (Warren et al., 2006). En condition physiologique, les hépatocytes expriment de faibles niveaux de molécules de CMH I et n'expriment pas ou peu de molécules de costimulation. Les L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> circulants peuvent être activés par les hépatocytes et rentrer en phase de prolifération clonale, mais l'absence de signaux supplémentaires provoque rapidement leur entrée en apoptose (Thomson and Knolle, 2010). Dans des conditions inflammatoires, les hépatocytes expriment des molécules de CMH II et sont donc capables de présenter des antigènes aux L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> (Herkele et al., 2003). L'activation de L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> conduit préférentiellement à une différenciation en TH2 et Treg contribuant à la tolérance hépatique. Dans certaines conditions, les hépatocytes peuvent favoriser le développement de l'immunité par une augmentation de l'expression de molécules de CMH I et de costimulation CD80 et CD86. Il y a alors un basculement entre tolérance et immunité (Dikopoulos et al., 2004).

- Les cellules étoilées :

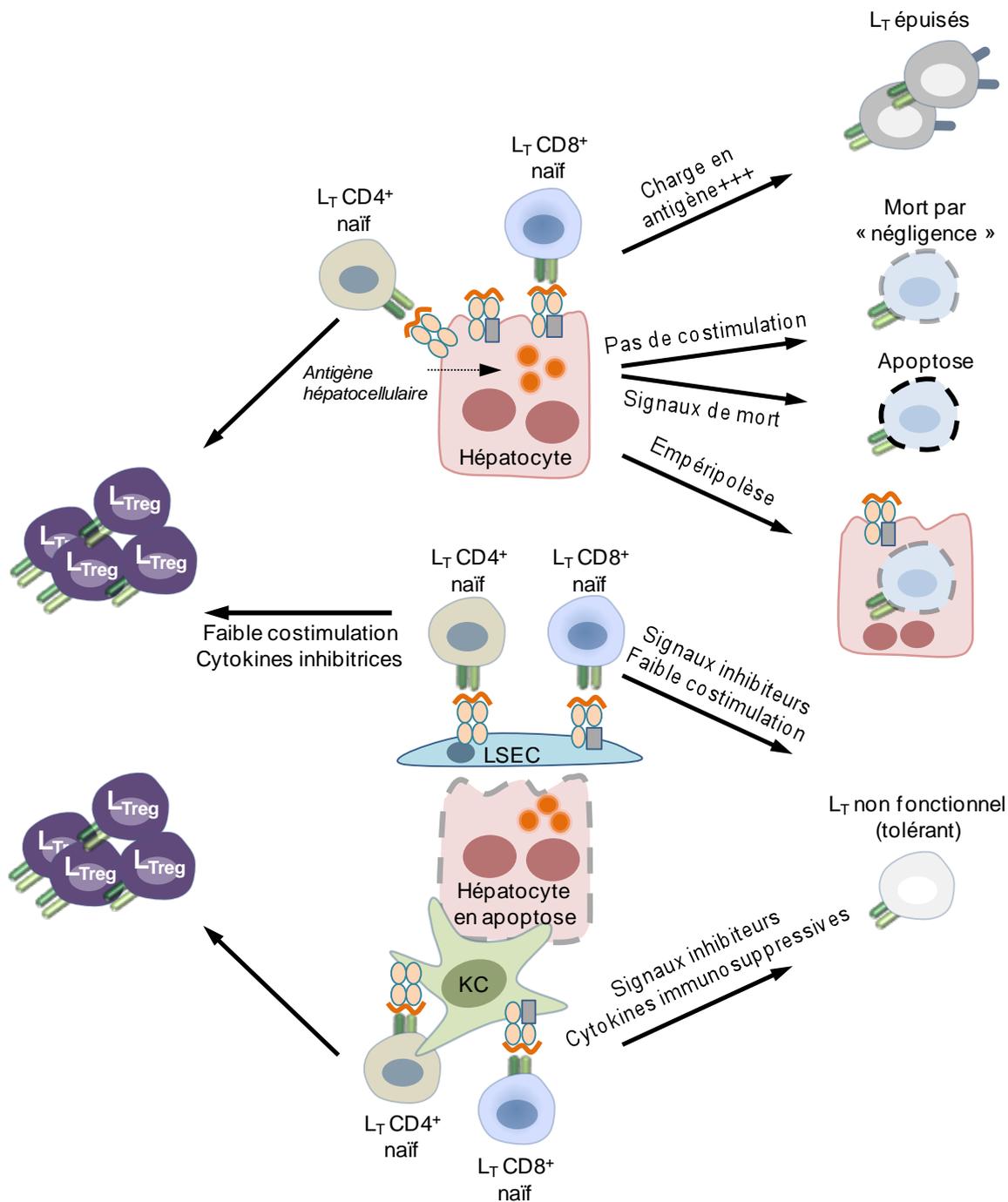
Lors d'inflammation, les HSCs sont avant tout impliquées dans le développement de la fibrose hépatique par différenciation en myofibroblaste et production de matrice extracellulaire. *In vitro*, les HSCs sont capables d'endocyter et de phagocyter et, en présence de cytokines pro-inflammatoires, elles sur-expriment des molécules de CMH I et II et la molécule de costimulation CD86, les rendant capables d'activer des L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Les études *in vivo* ont juste permis de démontrer des contacts entre les HSCs et les lymphocytes, suggérant la possibilité d'une activation directe (Muhanna et al., 2007; Winau et al., 2007).

#### 4- L'activation des lymphocytes T dans le foie contribue à leur tolérisation

##### a- L'architecture hépatique facilite l'activation des lymphocytes T *in situ*

Une large partie des L<sub>T</sub> naïfs sont présents dans les OLSs. Ils sont pleinement activés et se différencient uniquement en présence de deux signaux 1 (TCR-CMH-peptide) et 2 (costimulation). C'est seulement une fois activés que les L<sub>T</sub> acquièrent un phénotype leur permettant d'infiltrer les organes et les tissus périphériques.

Le foie possède des particularités uniques suggérant la possibilité de l'activation des L<sub>T</sub> naïfs *in situ*. La cyto-architecture hépatique, avec notamment la présence de fenestration dans l'endothélium mais aussi l'hémodynamisme particulier au sein des sinusoides hépatiques favorisent des contacts directs entre les lymphocytes et le parenchyme. Le diamètre des sinusoides (6-15 µm), très proche de la taille des lymphocytes (7-12 µm) crée un contact physique avec les cellules endothéliales. Les KCs participent aussi aux phénomènes hémodynamiques. Ils sont présents dans les sinusoides, et en plus de présenter des antigènes endogènes ou exogènes, ils peuvent obstruer partiellement le lumen des sinusoides, diminuant largement le débit sanguin et parfois même l'inversant (MacPhee et al., 1995). Ces facteurs mécaniques limitent la nécessité d'expression de sélectines par les lymphocytes circulants pour entrer en interaction avec les cellules hépatiques. Dans la partie précédente, j'ai décrit la richesse du foie en cellules potentiellement capables de présenter l'antigène, renforçant l'idée que l'activation des L<sub>T</sub> peut y avoir lieu directement.



**Figure 11** : L'activation des lymphocytes T dans le foie. Les L<sub>T</sub> peuvent être activés directement par les hépatocytes, ce qui peut induire la mort des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> par négligence, apoptose ou empéripolèse. Elle peut aussi conduire à leur épuisement. Les antigènes hépatocellulaires peuvent être présentés par les cellules pouvant phagocyter (LSEC et KC). La présentation croisée de ces antigènes aux L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> ne permet pas la pleine activation ce qui les rend non fonctionnels. Les L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> activés dans le foie se différencient préférentiellement en L<sub>Treg</sub>.

#### b- Preuves expérimentales de l'activation des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> dans le foie

La preuve de la capacité de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> spécifiques à infiltrer directement le tissu hépatique, sans la nécessité d'une présentation dans les organes lymphoïdes, a été apportée *in vivo* à l'aide d'un modèle de souris transgéniques exprimant un antigène de HBV à la membrane de l'ensemble des cellules parenchymateuses de l'organisme. L'injection intraveineuse de CTLs spécifiques de l'antigène a engendré des lésions uniquement au niveau du

tissu hépatique, phénomène lié aux nombreuses fenestrations situées dans l'endothélium des sinusoides (Ando et al., 1994). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* l'année suivante dans un modèle d'expression d'un alloantigène dans le foie. Les auteurs ont étudié le devenir de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> transgéniques, spécifiques de la molécule de CHM I H-2K<sup>b</sup> intacte (L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> Des-TCR) après injection à des souris H-2k (B10.BR) transgéniques et exprimant la molécule H-2K<sup>b</sup> sous contrôle du promoteur de la métallothionéine. Chez ces animaux, le gène codant H-2K<sup>b</sup> est transcrit dans le foie, le rein et le pancréas exocrine, mais la protéine n'est détectable avec les techniques de l'époque uniquement dans le foie et à de faibles niveaux au niveau des cellules stromales thymiques (Souris Met-Kb ; (Morahan et al., 1989). Pour éviter les phénomènes de sélection négative des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> Des-TCR dans le thymus des souris Met-Kb (due à l'expression thymique du transgène) la moelle osseuse des souris Des-TCR a été injectée après avoir réalisé successivement une thymectomie et une irradiation totale. La greffe d'un lobe de thymus sous la capsule rénale a ensuite permis la génération de nouveaux L<sub>T</sub> Des-TCR. Ce modèle complexe a permis d'observer une infiltration de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> Des-TCR uniquement dans le foie, associée à des dommages hépatiques importants. Ils disparaissent ensuite rapidement, suggérant leur délétion en périphérie (Bertolino et al., 1995).

La même équipe a démontré *in vitro* que les hépatocytes H-2b (C57Bl/6) pouvaient directement activer des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> Des-TCR, de façon aussi efficace que des splénocytes, induisant leur prolifération et leur différenciation en CTLs. Dans ce modèle, les cellules perdent rapidement leur fonction et entrent en apoptose deux jours après activation (Bertolino et al., 1998) (Figure 11). Leur mort serait liée à un manque important de signaux de costimulation (CD80/CD86) à la surface des hépatocytes, limitant la production d'IL-2 et du facteur anti-apoptotique Bcl-xL par les L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> activés (mort par négligence ; (Bertolino et al., 1999). *In vivo*, les L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> Des-TCR naïfs transférés chez la souris Met-Kb reconnaissent rapidement l'antigène dans le foie et sont retenus avant recirculation et entrée en apoptose (Bertolino et al., 2001). Néanmoins une forte partie des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> naïfs transférés sont rapidement localisés dans les ganglions et la rate, à cause de l'expression de la molécule de homing CD62L (Bertolino et al., 2001; Bowen et al., 2004). C'est l'activation dans le foie plutôt que dans un OLS qui est déterminante dans la balance entre immunité et tolérance (Bowen et al., 2004). L'injection d'un anticorps dirigé contre CD62L et bloquant l'entrée dans les ganglions, permet de limiter l'hépatite induite après transfert de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> Des-TCR chez la souris Met-Kb. L'utilisation du promoteur à l'albumine, protéine exprimée uniquement dans le foie, en remplacement du promoteur Met rend l'expression de H-2K<sup>b</sup> détectable seulement à la membrane des hépatocytes chez les animaux transgéniques. L'injection de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> Des-TCR à ces animaux induit une plus faible infiltration au niveau du foie, et une absence d'activation

au niveau des ganglions (absence d'expression de CD69). Comme les souris Met-Kb ayant reçu une injection d'anticorps anti-CD62L, il n'y a aucun signe d'apparition d'hépatite chez ces animaux, à cause d'un défaut de différenciation en CTL des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> activés dans le foie (Bowen et al., 2004).

Bien que le dogme de l'activation des L<sub>T</sub> stipule l'incapacité pour des cellules naïves de pénétrer la barrière endothéliale, l'utilisation de la microscopie électronique a permis de mettre en évidence *in vivo* l'interaction entre des hépatocytes et des L<sub>T</sub> naïfs via les fenestrations des sinusoides hépatiques. L'utilisation des modèles précédents démontrent même la possibilité de la reconnaissance directe de molécules de CMH allogéniques exprimées par les hépatocytes (Warren et al., 2006).

L'entrée en apoptose des L<sub>T</sub> activés localement par les hépatocytes dépend de la façon dont est présenté l'antigène (faible costimulation et présence de signaux inhibiteurs). Chez les patients souffrant d'hépatites virales chroniques, la présence de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> spécifiques ne permet pas l'élimination des virus HBV et HCV. Le facteur de transcription Bim est un médiateur pro-apoptotique clé induisant la mort des CTLs spécifiques du virus (Lopes et al., 2008). L'importance de Bim dans l'induction de la mort cellulaire a aussi été décrite dans les modèles de souris transgéniques Alb-Kb et Met-Kb (Holz et al., 2008). L'expression de Bim est favorisée par l'importance des signaux co-inhibiteurs tels que CTLA-4 ou le TGFβ (Schurich et al., 2011; Tinoco et al., 2009). D'autres mécanismes de mort induite par les hépatocytes ont été décrits dans des modèles expérimentaux murins d'autoimmunité. L'injection de L<sub>T</sub> auto-réactifs spécifiques d'un antigène ubiquitaire chez la souris ne provoque pas d'autoimmunité généralisée. Ce phénomène est lié à la rétention et à l'activation au niveau du foie, puis la mort de ces lymphocytes après invasion dans les hépatocytes (ou empérilopoïèse) et dégradation au niveau des endosomes et lysosomes (Benseler et al., 2011) (Figure 11).

#### c- L'épuisement des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> contribue au développement de pathologies hépatiques

L'équipe de P. Bertolino a proposé différents facteurs conditionnant la réponse des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> activés par les hépatocytes (Tay et al., 2014). Ils ont montré expérimentalement à l'aide d'outils de transfert de gène au niveau des hépatocytes, et des modèles de souris transgéniques Alb-Kb et Des-TCR, qu'un faible niveau d'expression, joint à une forte affinité de reconnaissance du TCR pour un complexe CMH-peptide, favorise le développement d'une réponse cytotoxique. La forte affinité TCR-CMH-peptide permettrait d'induire des signaux d'activation suffisant en rendant les L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> activés indépendants de signaux de costimulation. Au contraire, une forte expression de l'antigène par les hépatocytes entraîne

l'activation puis la persistance dans le foie de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> spécifiques, sans activité cytotoxique ainsi que phénotypiquement et fonctionnellement épuisés (PD-1<sup>+</sup>, faible sécrétion d'IFN $\gamma$  après restimulation) (Figure 11).

Le foie est sujet à de nombreuses pathologies dérivant en formes chroniques dues à la persistance du pathogène malgré la présence de L<sub>T</sub> spécifiques. La persistance des hépatites causées par les virus HBV ou HCV sont associées à un état de non réponse des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> spécifiques : sécrétion de faibles niveaux de cytokines (IFN $\gamma$ ), faible prolifération *ex vivo* et faible cytotoxicité (Fisicaro et al., 2010). Ils expriment des molécules de surface associées à un phénotype de cellules mémoires ainsi que de forts niveaux de molécules d'activation et de récepteurs inhibiteurs comme PD-1, dont le niveau d'expression dépend de l'importance de la charge virale initiale. La détection de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes tumoraux sécrétant de faibles quantités d'IFN $\gamma$  et faiblement cytotoxiques chez des patients atteints d'hépatocarcinome démontre que l'épuisement est aussi un mécanisme important d'échappement tumoral (Flecken et al., 2014). Bien qu'il n'y ait pas d'études réalisées chez l'homme, le développement d'un phénotype épuisé a aussi été observé dans un modèle de greffe de foie spontanément accepté chez la souris. Dans ce modèle, les L<sub>T</sub> alloréactifs sont rapidement activés dans le foie mais expriment des niveaux faibles de transcrits d'IFN $\gamma$ , de perforine et de FasL en comparaison avec les L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> isolés de reins ou de cœurs greffés, suggérant une fonction effectrice altérée (Steger et al., 2008).

#### d- Facteurs cellulaires et moléculaires favorisant l'épuisement dans le foie

Dans le foie, de nombreuses cellules expriment, ou peuvent exprimer dans certaines conditions, des ligands de récepteurs co-inhibiteurs PD-L1 (PD-1), Gal9 (Tim3), CD80-86 (CTLA-4). PD-L1 par exemple est exprimé par les KCs, les LSECs, les HSCs et les hépatocytes (Diehl et al., 2008; Iwai et al., 2003; Mühlbauer et al., 2006; Yu et al., 2004). L'expression de PD-L1 par les hépatocytes est renforcée lors d'infection virale et en présence de L<sub>T</sub> activés, et davantage après stimulation avec des IFN I et II (Mühlbauer et al., 2006). L'augmentation de l'expression de PD-1 par les L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> spécifiques du HBV lors des phases aiguës et sa persistance au cours du temps favorise la chronicité de l'hépatite B chez des patients (Zhang et al., 2008). L'interaction PD-1/PD-L1 intervient dans les processus de tolérisation des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> favorisant l'immunopathologie au dépend de l'immunité antivirale (Blackburn et al., 2010).

Les LSECs ont particulièrement été étudiées dans les mécanismes de la tolérance orale car elles sont continuellement exposées aux antigènes solubles d'origine portale. Elles sont aussi en contact étroit avec les L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> circulant dans le foie. Expérimentalement chez le rongeur, les LSECs sont capables d'activer les L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> circulant par présentation croisée

de peptides exogènes (Limmer et al., 2000) et même de peptides dérivés d'antigènes administrés par voie orale (Limmer et al., 2005). *In vitro*, l'interaction entre les LSECs et les  $L_T$   $CD8^+$  transmet un signal aux deux types cellulaires, activant des  $L_T$   $CD8^+$  mais induisant l'expression de PD-L1 et réduisant l'expression de CD80 et CD86 à la surface des LSECs ce qui contribue à diminuer les fonctions cytotoxiques des  $L_T$   $CD8^+$  et favoriser leur survie plutôt que leur délétion (forte expression de Bcl-2) (Diehl et al., 2008). La réponse des  $L_T$   $CD8^+$  dépend de la concentration en antigène et conditionne le niveau de présentation croisée par les LSECs et d'activation du TCR. A l'inverse de la présentation par les hépatocytes, de fortes doses d'antigène favoriseront le développement de CTLs (par augmentation de la présentation croisée) et des bas niveaux engendreront plutôt la tolérance (Schurich et al., 2010). Les LSECs présentent des antigènes tumoraux circulants dans un contexte de CMH I et activent des  $L_T$   $CD8^+$  spécifiques qui deviennent incapables de développer une réponse effectrice à cause d'une inhibition par interaction PD-1/PD-L1 (Höchst et al., 2012) (Figure 11).

Les KCs jouent un rôle essentiel dans l'élimination de débris cellulaires et d'endotoxines dans le foie. Elles circulent continuellement dans les sinusoides hépatiques (2  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) et sont idéalement localisées dans le lumen des sinusoides pour interagir avec les  $L_T$ . *In vitro*, les KCs présentent des antigènes solubles et activent les  $L_T$   $CD8^+$  qui entrent en prolifération mais sécrètent moins efficacement de l'IFN $\gamma$  que des  $L_T$   $CD8^+$  activés par des mDCs spléniques (Ebrahimkhani et al., 2011).

Le foie contient un nombre important de DCs, ce qui est lié uniquement à sa taille (la densité de DCs dans le foie étant plus faible que dans les autres organes – (Steptoe et al., 1999). Bien que situées principalement dans les zones portales, ne favorisant pas les interactions avec les  $L_T$  circulants, les DCs sont capables de présentation croisée et donc potentiellement d'activer les  $L_T$   $CD8^+$ . Les DCs hépatiques pourraient être impliquées dans les mécanismes de tolérance spontanée aux allogreffes hépatiques puisqu'elles vont principalement migrer dans les OLSs du receveur (Thomson and Knolle, 2010).

Les  $L_T$   $CD4^+$ , contrairement aux  $L_T$   $CD8^+$ , ne peuvent pas répondre aux antigènes hépatocellulaires indépendamment de la présentation par les CPAs. L'absence de signaux apportés par les  $L_{TH}$  lors de l'activation des  $L_T$   $CD8^+$  directement par les cellules non hématopoïétiques altère leurs fonctions effectrices et pourrait favoriser l'émergence des infections virales chroniques du foie (Wuensch et al., 2010). La persistance dans le foie de fortes doses antigéniques durant ces infections, la richesse en cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF $\beta$ ), accentuée par la présence de  $L_{Treg}$  dans le microenvironnement hépatique limitent l'inflammation et participent à la tolérisation des  $L_T$ . L'utilisation de tétramères a permis

d'identifier des  $L_T CD8^+$  spécifiques du HCV sur des biopsies de foie de patients. Par co-marquage, il a été impossible de détecter la présence d'IFN $\gamma$  mais en revanche ces cellules étaient positives pour l'IL-10, suggérant un rôle protecteur contre le développement de dommages tissulaires lors de l'infection (Abel et al., 2006).

e- Les  $L_T CD4^+$  activés dans le foie acquièrent un profil régulateur

Comme les  $L_T CD8^+$ , les  $L_T CD4^+$  peuvent être activés directement dans le foie. *In vitro*, les LSECs murins activent des  $L_T CD4^+$  naïfs mais ne provoquent pas leur différenciation en TH1 (Knolle et al., 1999). La présentation d'antigènes hépatocellulaires aux  $L_T CD4^+$  spécifiques dans le foie nécessite des processus de phagocytose ou d'endocytose de débris ou molécules d'origines hépatocytaires par les KCs et les LSECs (Tay et al., 2014). Par exemple, l'expression ectopique de la MBP (pour Myelin Basic Protein, antigène impliqué dans le développement de l'EAE) par les hépatocytes, en plus de prévenir le développement de l'EAE, permet aussi l'induction de  $L_{Treg}$  spécifiques grâce à la présentation par les CPAs hépatiques (Lüth et al., 2008). La faible expression de molécules de costimulation par les LSECs biaise l'activation des  $L_T CD4^+$ , entraînant leur production d'IL-10 et d'IL-4 (Knolle et al., 1999) ou favorisant le développement de fonctions suppressives indépendantes de l'expression de CD25 et FoxP3 (Kruse et al., 2009). *In vitro*, les LSECs convertissent plus efficacement les  $L_T CD4^+$  conventionnels en  $L_{Treg} FoxP3^+$  que les KCs et les DCs du foie, de façon dépendante à la sécrétion de TGF $\beta$ . Générés de façon spécifique à des peptides de la MBP, de tels  $L_{Treg}$  retardent l'apparition de l'EAE chez la souris (Carambia et al., 2014) (Figure 11).

Les KCs peuvent induire localement l'activation et la prolifération de  $L_T CD4^+$  circulants et permettre l'expansion des nTreg de façon antigène spécifique dans le foie. Ils expriment des marqueurs inhibiteurs et sécrètent des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF $\beta$ ) favorisant l'induction de la tolérance (Heymann et al., 2015) (Figure 11). Les DCs du foie expriment des niveaux de molécules de CMH II et de costimulation (CD80 et CD86) plus faibles que les DCs spléniques, ce qui les rend moins immunogéniques. Ils sont aussi en forte compétition dans la présentation de l'antigène avec les LSECs qui ont une plus grande activité endocytaire (Schurich et al., 2009). Les DCs hépatiques sécrètent de l'IL-10 en cas d'activation, favorisant leur tolérogénicité. Les HSCs participent aussi à l'induction de  $L_{Treg}$  dans le foie. Bien que leur capacité à présenter l'antigène soit très controversée, elles contribuent à l'induction de  $L_{Treg}$  en présence de DCs et de TGF $\beta$  et de façon antigène indépendante, via la sécrétion d'acide rétinoïque (Dunham et al., 2013).

Les  $L_{Treg}$  peuvent aussi être efficacement recrutés dans le foie lors d'inflammation. Dans le modèle d'hépatite aiguë par injection de concanavaleine A (ConA), l'induction de l'expression de CXCL9, CXCL10 et CXCL11 par les hépatocytes est accompagnée par un

fort recrutement de  $L_{Treg}$  qui expriment le récepteur CXCR3 et qui participent à la régulation de l'hépatite, évitant des dommages tissulaires exacerbés (Erhardt et al., 2011).

### III- Le foie, une cible importante en thérapie génique

Les maladies héréditaires sont souvent associées à des mutations dans le gène codant pour une protéine, conduisant à son absence ou son dysfonctionnement. Le transfert de gène permet le remplacement de ce gène délétère par sa version non mutée, ce qui rétablit le phénotype normal. D'un point de vue immunologique, le développement du transfert de gène *in vivo* est associé au risque important d'induction d'une réponse immunitaire dirigée contre le produit du transgène, due à l'apparition d'une nouvelle protéine et donc de potentiels nouveaux épitopes reconnus par le système immunitaire. L'immunité, en plus de provoquer la perte d'expression de la protéine thérapeutique, peut aussi causer de forts dommages au niveau du tissu ciblé lors du transfert de gène.

Le foie est un site privilégié dans l'induction de la tolérance. De plus, l'hépatocyte est le siège de nombreuses fonctions métabolique. Il est de ce fait impliqué dans de nombreux déficits d'origines génétiques (Facteur IX,  $\alpha$  1-antitrypsine). C'est aussi pour cela que le champ de la thérapie génique ciblant le foie s'est développé. Le développement des techniques de transfert de gène, et notamment l'utilisation de différents types de vecteurs viraux, a permis de cibler spécifiquement le foie (informations complémentaires en Encart 2). Différents modèles expérimentaux de traitement de maladies héréditaires par transfert de gène dans le foie ont rapidement été développés depuis les années 1990, avec notamment un succès majeur obtenu récemment lors d'essais cliniques dans le traitement de l'hémophilie B. Le champ d'investigation de l'utilisation du transfert de gène dans le foie s'est ensuite élargi, avec l'apport de preuves expérimentales démontrant la possibilité de traitement de maladies autoimmunes, voire d'induction de la tolérance en transplantation.

## *Encart n°2 : Les vecteurs AAV*

Les vecteurs AAV (pour Adeno Associated Virus) sont utilisés de plus en plus fréquemment pour le transfert de gène *in vivo* car ils présentent de multiples avantages. Leur utilisation date des années 1980 (Hermonat and Muzyczka, 1984). A l'état naturel, les AAV font partis de la famille des *Parvoviridae*, et sont naturellement non pathogènes et incapables de se répliquer sans la présence de virus « helper » (Adénovirus ou autres membres de la famille des *Herpesviridae*). Chez l'homme, 12 sérotypes différents d'AAV ont été identifiés (plus d'une centaine chez le primate non humain), avec des tropismes tissulaires variés.

Les vecteurs recombinants (rAAV) sont composés de la capsid virale de forme icosaédrique, contenant le gène thérapeutique d'intérêt et de son promoteur. Ils peuvent contenir des séquences de 5kb (le génome naturel, contenant les gènes Rep et Cap, a une taille de 4675 nucléotides). Les vecteurs AAV interagissent avec les cellules hôtes par fixation de la capsid à des récepteurs membranaires. Par exemple, l'AAV de sérotype 2 (AAV 2) se lie au récepteur HSPG (pour Heparan Sulfate Proteoglycan), exprimé à la surface de nombreux types cellulaires, lui conférant un large tropisme. Les tropismes des vecteurs AAV sont variés : foie, muscle squelettique, muscle cardiaque, système nerveux central, rétine, rein, poumon, pancréas. Après transduction, l'ADN vectoriel persiste sous forme épisomale et comme monomères ou plus souvent concatémères circulaires. Il arrive qu'il s'intègre dans le génome de la cellule hôte, au niveau de gènes fréquemment transcrits ou dans des zones de cassure des 2 brins d'ADN.

Les améliorations des vecteurs AAV pour favoriser leur utilisation en transfert de gène *in vivo* ciblent principalement la capsid, car elle est directement impliquée dans le tropisme et l'intégration dans la cellule hôte. La technique de pseudotypage par exemple permet de modifier le tropisme initial de l'AAV 2 en intégrant son génome (ou gène thérapeutique compris entre les séquences ITR pour Inverted Terminal Repeated) dans la capsid d'un autre sérotype d'AAV. Contrairement aux vecteurs AAV 2, les vecteurs pseudotypés 2/8 (2/8 AAV) permettent par exemple de cibler le foie. La stabilité et la rapidité de l'expression du transgène est améliorée par l'utilisation de vecteurs auto complémentaires (ou « self complementary, scAAV), composés du génome dimérique sous forme simple brin qui s'auto-assemble après transduction pour former une molécule double brin fonctionnelle (McCarty et al., 2001).

*Suite à la page suivante*

Les vecteurs AAV ont une faible immunogénicité en comparaison avec d'autres types de vecteurs viraux comme les adénovirus. Néanmoins, des réponses immunes neutralisant les vecteurs AAV limitent leur efficacité clinique. Leur utilisation peut engendrer une inflammation dépendante de la voie NF- $\kappa$ B ou de la sécrétion d'IFN I. Cette inflammation est liée à la reconnaissance de protéines de la capsid et du génome vectoriel respectivement par les TLR 2 et 9. L'administration de vecteurs AAV engendre le développement d'une réponse immune cellulaire caractérisée par la production de hauts niveaux d'anticorps neutralisants et du développement de  $L_T$   $CD8^+$  mémoires spécifiques. Ces deux facteurs, combinés avec la forte prévalence de personnes possédant des anticorps anti-AAV (près de 60% des individus sains), limitent l'utilisation clinique des AAV et leur efficacité notamment lors de réadministrations (Mingozzi and Büning, 2015).

Actuellement, de nombreux essais cliniques utilisant le transfert de gène à l'aide de vecteurs AAV sont en cours, dans le traitement de maladie héréditaires (Myopathie de Duchenne, Maladie de Pompe, déficits en  $\alpha$ 1-antitrypsine ou Hémophilie B) ou acquises (Arthrite rhumatoïde, maladie de Parkinson).

## 1- Le traitement des maladies héréditaires : une réussite clinique

L'hémophilie B est une maladie liée à des troubles de la coagulation caractérisée par des hémorragies spontanées ou prolongées. Elle est causée par la transmission d'une forme mutée du gène codant pour le facteur IX (FIX), présent sur le chromosome X. Le FIX est déficitaire chez le patient possédant la forme mutée. Le transfert du gène non muté dans le foie, qui est le site majeur d'expression du FIX, est une stratégie envisagée depuis le début des années 1990. Le premier succès d'expression à long terme et à des niveaux thérapeutiques chez le rongeur a été obtenu après transfert de gène par injection intra portale d'un vecteur de type AAV contenant le gène humain non muté et sous contrôle d'un promoteur hépato-spécifique (AAV-EF1 $\alpha$ -F.IX, (Nakai et al., 1998). D'autres modèles murins ont été développés avec l'utilisation notamment d'autres types de vecteurs viraux comme les lentivirus (Follenzi et al., 2004) ou des rétrovirus chez le souriceau (Zhang et al., 2004). Les stratégies utilisant des vecteurs AAV ont ensuite été testées avec succès chez le chien (Mount et al., 2002), bien qu'associées à un risque de développement d'une réponse immunitaire notamment caractérisée par l'apparition d'anticorps neutralisant le FIX. Les essais cliniques menés chez l'homme depuis 2011 sont très encourageants, et ils démontrent une expression thérapeutique à 3 ans du FIX après une seule injection de vecteur AAV transportant la séquence codante non mutée (Nathwani et al., 2011, 2014) Des mesures régulières des enzymes hépatiques permettent d'évaluer l'apparition de réactions inflammatoires dans le foie (lyse hépatocyttaire) qui sont facilement enrailées par un traitement court à base de corticoïdes.

Les modèles murins de la maladie ont largement été utilisés pour étudier les mécanismes immunologiques favorisant l'expression à long terme du FIX humain. Cibler le foie est un élément majeur dans le maintien de l'expression au long terme. L'expression restreinte aux hépatocytes permet à la fois d'éviter le développement d'anticorps neutralisants spécifiques du FIX humain et le développement d'une réponse cellulaire, même après vaccination des animaux. Ce n'est pas le cas lorsque l'expression est ubiquitaire ou induite dans le muscle (Liu et al., 2004; Mingozzi et al., 2003). Des expériences de déplétion des L<sub>Treg</sub> ont démontré leur importance dans l'absence de formation d'anticorps neutralisants (Cao et al., 2007).

Le traitement de l'hémophilie B par transfert de gène utilisant un vecteur AAV a été et continue à être très largement investigué, probablement pour sa portée historique et son aboutissement clinique. Au niveau préclinique, le transfert de gène dans le foie est aussi utilisé pour traiter d'autres pathologies héréditaires. La maladie de Pompe est liée à une mu-

tation du gène codant l'enzyme lysosomale dégradant le glycogène, l'acide glucosidase (ou GAA), entraînant un dépôt de glycogène dans les muscles cardiaques et squelettiques souvent mortel chez l'enfant. L'administration d'une dose d'AAV transportant la séquence codant le gène humain fonctionnel rétablit des niveaux de glycogènes normaux ou quasi normaux dans un modèle murin de la maladie. A nouveau, il n'y a pas d'anticorps dirigés contre l'enzyme fonctionnelle détectés dans le sérum des souris (Franco et al., 2005). La combinaison de vecteurs AAV avec la séquence codante sous contrôle d'un promoteur hépatique et d'un promoteur ubiquitaire induit aussi la tolérance, contrairement à l'administration de la forme ubiquitaire seule, relevant l'immuno-dominance de l'expression hépatique. La combinaison des deux vecteurs permet une meilleure répartition de l'expression dans l'ensemble de l'organisme et ainsi un meilleur rétablissement de la maladie (Zhang et al., 2012).

Les bénéfices d'une combinaison de vecteurs AAV ciblant différents organes a aussi démontré son intérêt dans une autre maladie lysosomale. La maladie de Niemann-Pick est liée à la perte d'activité de l'acide sphingomyelinase (ASM), ce qui engendre l'accumulation de lipides non dégradés dans les tissus viscéraux et dans le système nerveux central. L'expression combinée de la version fonctionnelle du gène dans le foie et dans le cerveau permet de corriger les troubles cognitifs et la survie chez la souris avec le gène codant l'ASM invalidé. Pour cela, l'expression de l'ASM humaine est d'abord induite dans le foie par transfert de gène à l'aide d'un vecteur AAV à tropisme hépatique et sous contrôle d'un promoteur spécifique du foie (AAV 8 hASM, i.v.) puis dans le cerveau par injection intrathécale (4 zones d'injections par hémisphère) d'un vecteur AAV de sérotype différent et à tropisme cérébral (AAV 2 hASM), la séquence codante étant sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire (Passini et al., 2007). Ces différents travaux démontrent donc que la tolérance à un antigène peut être induite par transfert de gène dans le foie, applicable à l'homme, et cela à l'aide de vecteurs viraux.

## 2- Restaurer la tolérance dans les maladies autoimmunes

Le développement de pathologies autoimmunes provient d'une rupture de tolérance aux antigènes du soi, associée à l'expansion de  $L_T$   $CD4^+$  et  $CD8^+$  effecteurs auto-réactifs. Certains antigènes du soi sont reconnus préférentiellement, et restaurer un état de tolérance envers ces antigènes pourrait donc permettre de contrôler la maladie et de limiter la destruction tissulaire. Une des possibilités envisagées est de délivrer l'antigène à forte dose dans le foie. La première démonstration a été apportée par Lüth et collaborateurs (Lüth et al., 2008) dans un modèle murin de la sclérose en plaque, l'EAE, provoquée par vaccination des animaux contre la MBP, protéine impliquée dans la transmission du signal électrique généré par les neurones. L'expression de la MBP dans le foie (souris transgénique avec expression de

la MBP sous contrôle d'un promoteur hépato-spécifique) permet de prévenir du développement de l'EAE. La protection est due à l'induction de  $L_{Treg}$  spécifiques en périphérie. Le transfert du gène de la MBP dans le foie chez la souris adulte à l'aide d'un vecteur adénoviral protège aussi les animaux du développement de l'EAE, démontrant la faisabilité de l'approche pour le traitement des maladies autoimmunes.

Le diabète de type I est une pathologie de plus en plus fréquente, résultant de la destruction des cellules productrices de l'insuline dans le pancréas. L'expression d'un peptide dérivé de l'insuline (l'un des auto-antigènes décrit dans le développement de la maladie) dans le foie de souris NOD (modèle murin du diabète de type I) à l'aide d'un vecteur lentiviral permet de supprimer les réponses autoimmunes en cours. La combinaison avec un traitement éliminant les  $L_T$  (anticorps anti-CD3) permet de reverser totalement la maladie chez la souris (Akbarpour et al., 2015). Les effets thérapeutiques observés dans ce modèle sont dépendants de l'induction de  $L_{Treg}$  spécifiques du peptide dans ce modèle.

### 3- Limiter la réponse allogénique en transplantation

Les problèmes en transplantation sont majoritairement liés au rejet immun du greffon après reconnaissance des alloantigènes. Une stratégie envisagée pour limiter, retarder ou éviter le rejet, vise à induire la tolérance aux alloantigènes par expression dans le foie. Parmi les différents alloantigènes reconnus, les molécules de CMH I sont de bons candidats pour le transfert de gène dans le foie car ils sont exprimés par l'ensemble des cellules nucléées. Parallèlement aux travaux que nous avons menés au cours de mon doctorat, une étude a été publiée décrivant d'une part la possibilité d'exprimer un alloantigène dans le foie sans provoquer de dommages tissulaires et d'autre part, l'amélioration de la survie de greffe chez la souris. L'injection d'un vecteur AAV à tropisme fort pour le foie et codant la molécule de CMH I H-2K<sup>b</sup> sous contrôle d'un promoteur hépato-spécifique chez la souris B10.BR (H-2k) permet d'induire la survie au long terme de greffe de peau d'un donneur ne possédant qu'un seul variant allogénique (souris 178.3 H-2k transgénique exprimant H-2K<sup>b</sup>; (Cunningham et al., 2013). La survie du greffon (greffe de peau ou greffe de cœur) n'est pas prolongée si les différences allogéniques entre donneur et receveur concernent l'ensemble des CMH I et II conventionnels (greffons provenant de souris C57Bl/6). L'effet observé est dépendant de la dose de vecteurs injectée (le niveau d'expression du transgène par les hépatocytes n'est pas évoqué) : à forte dose c'est la tolérance qui est induite alors que de faibles doses provoquent un rejet accéléré de la greffe. L'injection de  $L_T$  CD8<sup>+</sup> spécifiques de H-2K<sup>b</sup> (isolés de la rate de souris Des-TCR) n'entraîne pas leur délétion. Au contraire, ils sont retrouvés en plus grand nombre chez des animaux traités mais sécrètent des niveaux faibles d'IFN $\gamma$  après une greffe de peau comparé à des animaux contrôles (Cunningham et al., 2013). Nos travaux

enrichissent ces observations, notamment quant à la contribution des  $L_T$   $CD8^+$  spécifiques de l'alloantigène dans la prolongation de la survie de la greffe.

#### 4- Les modèles expérimentaux de transfert de gène dans le foie contribuent à la compréhension des mécanismes d'induction de la tolérance dans le foie

Bien que d'abord développés sur des modèles animaux, les mécanismes associés à la tolérance observée après transfert d'un gène thérapeutique dans le foie sont encore mal compris. De nombreux outils de caractérisation de la réponse immunitaire sont disponibles pour certaines protéines comme l'ovalbumine (OVA) ou la GFP (pour Green Fluorescent Protein), ce qui en fait de bons candidats pour investiguer les mécanismes immuns responsables de la tolérance. Différents mécanismes d'induction de la tolérance après transfert de gène dans le foie ont ainsi été décrits. Le transfert du gène de l'ovalbumine, une protéine soluble, sous contrôle d'un promoteur hépato-spécifique et à l'aide d'un vecteur AAV à tropisme hépatique induit une forte déléation des  $L_T$   $CD4^+$  spécifiques de l'ovalbumine chez la souris transgénique DO11.10 TCR (TCR transgénique spécifique du peptide OVA 323-339). Les  $L_T$   $CD4^+$  spécifiques non délétés prolifèrent moins et sécrètent des quantités plus faibles d'IL-2 comparé à des souris contrôles n'exprimant pas l'ovalbumine dans le foie (Dobrzynski et al., 2004). Cette équipe a aussi démontré que le transfert du gène de l'ovalbumine dans le foie permettait d'induire des  $L_{Treg}$  spécifiques de l'ovalbumine (Cao et al., 2007). Les  $L_{Treg}$  générés après transfert du gène du FIX humain permettent d'ailleurs de contrôler la réponse humorale chez la souris (Cao et al., 2007). Après transfert du gène de l' $\alpha$ 1-anti-trypsine humaine (hAAT) dans le foie de souris, les  $L_{Treg}$  spécifiques induits sécrètent de l'IL-10. Leur déplétion induit le développement de la réponse anti-hAAT après vaccination, caractérisée par une diminution de la concentration sérique en hAAT et par la plus forte capacité des  $L_T$   $CD8^+$  spécifiques à sécréter de l'IFN $\gamma$  après stimulation *in vitro* (Breous et al., 2009).

La façon dont est présenté l'antigène est à nouveau primordiale dans le développement de la tolérance après transfert de gène dans le foie. Les vecteurs lentiviraux (LV) transduisent fortement les CPAs. Le transfert du gène de la GFP sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire PGK (pour Phosphoglycerate kinase) (LV-PGK-GFP) permet d'induire l'expression de la GFP dans toutes les cellules transduites ce qui inclut les KCs, les hépatocytes, les LSECs et les CPAs professionnelles de la rate (Annoni et al., 2009). L'expression est transitoire et disparaît après 6 semaines. Le microRNA mir142.3, est exprimé exclusivement par les cellules de la lignée hématopoïétique. L'ajout de séquence cible du mir142.3 (mir142.3T) à la suite de séquences codantes permet la destruction des transcrits. L'ajout de mir142.3T à la construction lentivirale précédente permet d'induire une expression à long terme de la GFP dans les hépatocytes, dépendante de l'induction de  $L_{Treg}$  spécifiques. Ces travaux dé-

montrent de plus qu'une présentation efficace par les CPAs favorise le développement de l'immunité et par conséquent l'élimination du transgène. L'expression de la GFP par les hépatocytes plutôt que par les LSECs est un élément clé dans l'induction de la tolérance, comme le démontre le blocage de l'expression de la GFP par les hépatocytes en utilisant la cible du mir122a (Annoni et al., 2009).

En résumé, il est clair que l'induction de  $L_{Treg}$  spécifiques est primordiale dans le développement de la tolérance à une protéine cytosolique (GFP) ou soluble (ovalbumine, FIX, hAAT, MBP, Insuline, GAA) après transfert de gène dans le foie. La façon dont est présenté l'antigène est un élément majeur, et limiter la présentation par les CPAs professionnelles favorise l'induction de la tolérance. Les CPAs et notamment les KCs participent aussi indirectement à la tolérisation, probablement via la sécrétion de facteurs anti-inflammatoires (IL-10, TGF $\beta$ ). Les mécanismes de délétion clonale et d'anergie participent pleinement au maintien de la tolérance. Des réponses altérées et faiblement effectrices des  $L_T CD8^+$  spécifiques ont aussi été observées après expression de protéines membranaires (CMH I allogénique) par les hépatocytes.

## Partie 4 : Synthèse du projet

Dans ma première partie d'introduction, j'évoquais les problèmes médicaux associés à la prise à long terme de traitements immunosuppresseurs chez les patients transplantés. La mise en évidence de cas de tolérance spontanée à certaines greffes et notamment les greffes hépatiques, associée à la description des mécanismes de tolérance et de régulation de la réponse immunitaire a favorisé l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques cherchant à induire un état de tolérance spécifique aux antigènes du donneur. La façon dont est présenté l'alloantigène est l'élément primordial déterminant l'orientation de la réponse immunitaire, que ce soit dans la réponse conduisant à la perte du greffon ou dans l'induction de populations régulatrices favorisant son maintien.

Les voies d'induction de la tolérance sont multiples (*c.f.* Partie 2). Les cas de tolérance spontanée aux greffes de foie, son implication dans la tolérance orale puis les différents travaux expérimentaux étudiant les réponses immunitaires spécifiques d'antigènes hépatiques (*c.f.* Partie 3), ont permis de mettre en évidence les propriétés tolérogènes du foie. La tolérance dans le foie est principalement due à l'activation *in situ* des lymphocytes T naïfs, et résulte de la façon dont sont présentés les antigènes. Les cellules présentatrices de l'antigène hépatiques sont moins sensibles aux signaux de danger émis lors d'une atteinte du tissu hépatique, et présentent les antigènes dans un contexte pro-tolérogène, lié à la faible expression de molécules de CMH, de costimulation et à la sécrétion de facteurs anti-inflammatoires plutôt que pro-inflammatoires.

Ces propriétés particulièrement tolérogènes du foie en font un site immuno-privilegié et une cible intéressante dans le développement de stratégies d'induction de la tolérance antigène spécifique. La revue de la littérature démontre bien l'intérêt de la thérapie génique ciblant le foie, non seulement dans le traitement des maladies génétiques, mais aussi dans le contrôle de pathologies autoimmunes puis plus récemment dans l'induction de la tolérance allogénique.

Le projet initié avant la publication des travaux de Cunningham et collaborateurs, et inspiré des travaux porteurs de transfert de gène dans le foie, visait à induire, à l'époque de façon originale, la tolérance allogénique dans le but d'améliorer la survie de greffes d'îlots pancréatiques chez la souris. Pour cela, nous avons développé un vecteur AAV à fort tropisme hépatique (pseudosérotype 2/8) codant pour la molécule de CMH I allogénique H-2K<sup>d</sup>

sous contrôle d'un promoteur hépato-spécifique (mTTR pour murine Transthyréline) (scAAV mTTR-H-2K<sup>d</sup>). Les objectifs initialement étaient alors :

- (1) de vérifier que la transduction de souris C57Bl/6 (H-2b) naïves et immunocompétentes à l'aide des vecteurs AAV H-2K<sup>d</sup> permettait une expression restreinte aux hépatocytes ;
- (2) de tester l'effet de l'expression hépatique d'une molécule de CMH I allogénique dans le foie sur la survie de greffons. Ces animaux ont été rendus diabétiques avant de réaliser des greffes allogéniques d'îlots pancréatiques de souris donneuses Balb/c (H-2d) sous la capsule rénale, afin de les guérir de leur diabète.

# Résultats

# Résultats

L'objectif de cette étude était de vérifier que : (1) l'injection d'une dose forte et unique de vecteur scAAV2/8 mTTR H-2K<sup>d</sup> (AAV H-2K<sup>d</sup>) permettait d'induire l'expression de la molécule de CMH I H-2K<sup>d</sup> dans le foie de souris C57Bl/6 (H-2b) et (2) que l'expression d'un CMH I du donneur dans le foie favorisait la survie d'une allogreffe chez la souris. L'utilisation de souris transgénique Met-Kb et Alb-Kb avait déjà mis en évidence les phénomènes de tolérisation des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> Des-TCR, spécifiques de la forme intacte de la molécule H-2K<sup>b</sup> chez la souris B10.BR (H-2k). Au début de nos travaux, et à notre connaissance, il n'avait jamais été démontré la possibilité d'induire l'expression à long terme d'une molécule de CMH I allogénique dans le foie après transfert de gène. L'expression de H-2K<sup>d</sup> persiste même après vaccination par injection intramusculaire d'un vecteur adénoviral transférant la séquence codant H-2K<sup>d</sup> et qui normalement provoque une forte réaction humorale et cellulaire chez la souris naïve.

Deux semaines après administration du vecteur AAV H-2K<sup>d</sup> (ou AAV contrôle contenant une séquence non codante), des animaux sont rendus chimiquement diabétiques par injection de streptozotocine (STZ), puis soignés de leur diabète par une greffe d'îlots pancréatiques de souris donneuses Balb/c (H-2d) et exprimant donc H-2K<sup>d</sup>. Dans ce modèle, la survie des greffons est prolongée lorsque l'expression de H-2K<sup>d</sup> est induite dans le foie, au-delà de 100 jours chez 40% des animaux.

L'amélioration de la survie des greffons suggère la mise en place de phénomènes de régulation systémique et spécifiques de l'alloantigène H-2K<sup>d</sup>. En isolant les leucocytes du foie d'animaux traités avant la greffe, nous avons découvert une population de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> mémoires, spécifiques de H-2K<sup>d</sup>, exprimant des marqueurs communément décrits chez les L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> murins. Ils exercent des fonctions suppressives *in vitro*, et *in vivo* ils améliorent la survie de greffe d'îlots pancréatiques après transfert adoptif chez la souris naïve.

Ces résultats, présentés dans le manuscrit suivant et actuellement en soumission, montrent que le transfert de gène d'une molécule de CMH I dans le foie induit une population de L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> spécifiques et favorise l'induction de la tolérance en transplantation.

**Alloantigen gene transfer to hepatocytes  
promotes tolerance to pancreatic islet graft  
by inducing CD8+ regulatory T cells.**

Valentin Le Guen<sup>1,2,4</sup>, Jean-Paul Judor<sup>1,2,4</sup>, Françoise Boeffard<sup>1,2,4</sup>, Vanessa Gauttier<sup>1,2,4</sup>, Nicolas Ferry<sup>3</sup>, Jean-Paul Souillou<sup>1,2,4</sup>, Sophie Brouard<sup>1,2,4</sup>, Sophie Conchon<sup>1,2,4,\*</sup>.

1-INSERM UMR1064, Nantes, France

2-Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France

3-Direction BIOVAC, ANSM, Saint Denis France

4-ITUN Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes, Nantes, France.

\* Corresponding author : Sophie Conchon -INSERM UMR 1064, CHU HôtelDieu, 30 Bd Jean Monnet, 44000 Nantes, France. Tel. +33 2 40 08 75 07.sophie.conchon@univ-nantes.fr

Conflict of interest statement: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Author's contributions : VLG: study concept and design, acquisition and interpretation of data, drafting of manuscript. JPJ, FB, VG : acquisition of data. NF, JPS, SB : project concept, discussion with important intellectual input, critical reading of manuscript. SC : supervision of the study, concept and design, analysis and interpretation of data, drafting of manuscript. All authors read and approved the manuscript.

## **Abstract :**

Induction of donor-specific immune tolerance is a good alternative to chronic life-long immunosuppression for transplant patients. Donor major histocompatibility complex (MHC) molecules represent the main targets of the allogeneic immune response of transplant recipients. Liver-targeted gene transfer with viral vectors induces tolerance toward the encoded antigen. The aim of this work was to determine whether alloantigen gene transfer to hepatocytes induces tolerance and promotes graft acceptance.

C57Bl/6 (H-2b) mice were treated with adeno-associated viral (AAV) vector targeting the expression of the MHC class I molecule H-2K<sup>d</sup> to hepatocytes. AAV H-2K<sup>d</sup> treated mice were tolerant to the alloantigen, as demonstrated by its long-term expression at the membrane of the hepatocytes, even after a highly immunogenic challenge with an adenoviral vector. In addition, after chemical induction of diabetes, the AAV treated mice had significantly delayed rejection of fully allogeneic pancreatic islet grafts from Balb/c mice (H-2d), with more than 40% recipients tolerant (>100 days). AAV mediated expression of H-2K<sup>d</sup> in the liver induced the local expansion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes with allo-specific suppressive properties. The adoptive transfer of these liver-generated CD8<sup>+</sup> Tregs into naive diabetic mice promoted the long-term survival of allogeneic pancreatic islet grafts.

We demonstrate for the first time that AAV-mediated long-term expression of a single MHC class I molecule in the liver induces the generation of a subset of allospecific CD8<sup>+</sup>Treg cells, which promote tolerance toward fully allogeneic graft. Liver gene transfer represents a promising strategy for *in vivo* induction of donor-specific tolerance.

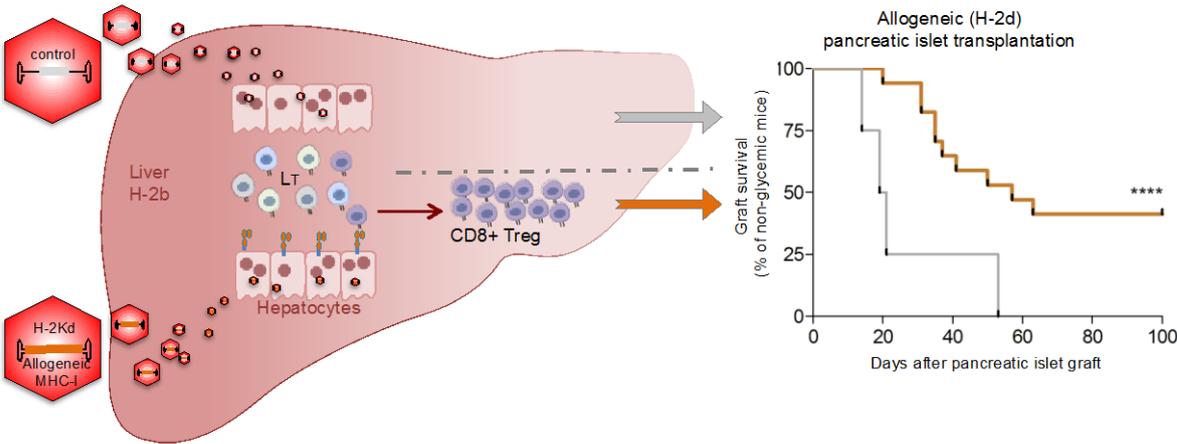
## Lay summary

The liver has a special immune system, biased towards tolerance. In this work we investigated the possibility of harnessing this property of the liver to induce tolerance to an allogeneic transplantation.

We demonstrate for the first time that the *in vivo* gene transfer of an allogeneic antigen with an adeno associated viral vector to mouse hepatocytes induces the expansion of a population of CD8+ regulatory T lymphocytes. These Tregs are then instrumental in avoiding the rejection of allogeneic pancreatic islets transplanted in these animals.

Allogeneic transplantation is the main treatment for end stage diseases of different organs. Lifelong immunosuppressive treatments are still required to limit graft rejection, and these treatments present serious side effects. Our present findings open a new avenue for promoting allo-specific tolerance via *in vivo* induction of CD8+ Treg expansion.

Graphical abstract:



## Introduction

Allogeneic transplantation remains the only treatment available for end-stage diseases of various organs, such as kidney, heart, liver, and pancreas. However, the donor-specific allogeneic immune response of the host requires life-long immunosuppression. Despite constant progress, these long-term treatments still carry serious side effects, from toxicity to increased risk of opportunistic infections and of neoplasia [1,2]. An ideal way of doing away with the need for long-term exposure to immunosuppressors would consist of the induction of a donor-specific immune tolerance, which, despite having been achieved experimentally, remains a challenge in the clinical arena. The first intentional tolerance induction in transplant patients was achieved by induction of donor mixed chimerism in various ways after combined kidney and bone marrow transplantation, with long-term stable allograft survival without maintenance immunosuppression being achieved in a number of patients [3-5]. Another appealing approach is to actively establish peripheral tolerance by inducing and increasing *in vitro* immune cells with regulatory functions that can control allo-specific effector T cells [6]. Several different regulatory cell populations are being tested in clinic, and these suggest that donor specific regulatory cells may be also a promising strategy for achieving immune tolerance [6,7]. Experimentally, the higher suppressive potential of allo-specific CD4<sup>+</sup> regulatory cells over their naturally occurring polyclonal counterparts has been demonstrated in protecting against alloimmunity in a challenging skin graft model [8]. A number of obstacles to (e.g. risk of GvHD and/or vascular toxicity in induction of mixed chimérisme [9,10]) and difficulties with (such as the logistics of *in vitro* preparation of specific regulatory cells [11]) these cell therapies persist and there is still the need for new preventive strategies of tolerance induction that could alleviate some of these concerns and permit the reduction of allograft loss through immunological injury and long-term exposure to non-specific immunosuppression.

The strategy we outline in this paper is to induce antigen-specific immune tolerance, through harnessing an “immune-privileged” site, the liver, by a forced expression of the antigen directly into such a site, in the hope of benefiting from its unique regulatory properties on systemic immune response. The immune response in the liver is biased toward tolerance rather than immunity [12]. Due to its anatomic location, the blood supply from the portal vein constitutively exposes the hepatic immune cells to Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs), toxins and food-derived antigens [13]. Exorbitant inflammation and tissue damage in this unique, vital organ are limited by control mechanisms developed by hepatic immune cells to reduce inflammation and induce a pro-tolerogenic microenvironment and act as a checkpoint to determine if antigenic presentation will result in immunity or tolerance [14,15].

Several mechanisms have been involved in hepatic tolerance. Among them, the most described is effector CD8<sup>+</sup> T cell premature death and their exhaustion, which result from incomplete activation by various liver resident antigen presenting cells including the hepatocytes [16,17], as well as active suppressive mechanisms relying on activation of regulatory T cells [18].

Liver targeted gene therapy for inherited diseases has benefited from this property to allow long term expression of a therapeutic transgene, first in animal models, and now in clinical trial. This is the case for a trial for haemophilia B that used a self-complementary adeno associated viral vector (scAAV8) that permitted a stable expression of human factor IX by the hepatocytes for more than 3 years at a level sufficient to reduce or abrogate the need for prophylactic factor IX concentrate [19]. At a preclinical level, the pro-tolerogenic properties of the liver to induce systemic tolerance to auto-antigens in models of autoimmune diseases have also been investigated. The liver targeted expression of the neural auto-antigen myelin basic protein (MBP) leads to protection from autoimmune neuroinflammation in a mouse model of multiple sclerosis [20]. More recently, hepatocyte-specific expression of an immunodominant peptide of insulin suppressed the progression of type 1 diabetes in NOD mice when performed at a late pre-diabetic stage [21]. In both cases, the regulatory mechanism involved the generation of antigen-specific CD4<sup>+</sup>Treg cells.

In this paper, we tested whether the long-term stable expression of a donor MHC antigen in the liver with an AAV vector induced tolerance to allogeneic pancreatic islets. We demonstrate that liver targeted expression of a single donor MHC class I molecule (H-2K<sup>d</sup>) prolongs pancreatic islet allograft survival in diabetic H-2b mice. The AAV vector injection results in the long-term expression of the alloantigen in the hepatocytes, and in the generation of a specific population of CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in the liver. We show that these CD8<sup>+</sup> Treg cells display a particular phenotype and allo-specific suppressive function *in vitro* and *in vivo* in transfer experiments.

## Material and methods

### Viral vectors design and production

Vector plasmid used for AAVvector production consisted of H-2K<sup>d</sup> coding sequence, or a non-coding DNA sequence for the AAV null control vector, inserted between the liver-specific promoter mTTR (mouse transthyretin) sequence, and a BGH polyA signal and flanked by 2 AAV2-ITRs.

Adenoviral vectors used for intra-muscular vaccination were produced with a pShuttle vector plasmid containing the H-2K<sup>d</sup> coding sequence inserted behind the PGK promoter and followed by a SV40 polyA signal. Control AdLacZ and the peptide used for detection of  $\beta$ Gal-specific immune response have been described previously [22].

scAAV2/8 and Adenoviral vector productions were performed by the INSERM UMR 1089 Vector Production Centre at the University Hospital of Nantes (France).

### Mice

6-8 week-old male C57/Bl6 (H-2b), Balb/c (H-2d) and C3H (H-2k) mice were purchased from Janvier Laboratory, France. All mice were housed at the Nantes University animal facilities. Procedures were approved by the regional ethical committee for animal care and use and by the French Ministry of Research.

Mice were injected intravenously with  $1.2 \cdot 10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup> (vg for vector genome) of the scAAVmTTR H-2K<sup>d</sup> or of the AAV null vector for the control group. For the adenoviral vaccination, the mice were injected intramuscularly with  $1.6 \cdot 10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup> of Ad PGK-H-2K<sup>d</sup> or Ad LacZ.

Depletion experiments were performed by intraperitoneal (*i.p.*) injections of anti CD25 mAb (PC61, 250 $\mu$ g on day -5, -2, 1 of Ad immunization), and anti PD-L1 mAb (BioXCell, clone 10F.9G2, 200 $\mu$ g, day -3, 3, 6, 9, 12 of Ad immunization).

### Pancreatic islet transplantation

Sub-capsular kidney pancreatic islet transplantations were performed in diabetic mice after streptozotocine *i.p.* injection of 200mg.kg<sup>-1</sup> 3 to 5 days before graft. Diabetes was defined as a non-fasting blood glucose greater than 16 mmol.L<sup>-1</sup> (290 mg.dl<sup>-1</sup>) at two consecutive measurements. Pancreatic islets were purified from Balb/c mice after digestion by collagenase and isolation by Ficoll gradient centrifugation. 300-500 islets were transplanted under the right renal capsule [23]. When pancreatic islets were not rejected for more than

100 days, a total resection of the kidney with the implanted islet graft was performed to control the return to hyperglycemia.

### **Hepatocyte isolation and immunostaining**

Hepatocytes were isolated following an adaptation of the standard 2-step collagenase perfusion protocol [24]. Isolated hepatocytes were quickly stained with PE anti H-2K<sup>d</sup> (SF1-1.1) antibodies and fixed with 4% Paraformaldehyde before analysis by flow cytometry.

### **Non-parenchymal cell preparation**

Liver non-parenchymal cells (NPCs) were isolated after *in vivo* elimination of blood by perfusion of HBSS buffer. Livers were digested with collagenase IV and NPCs enriched by Percoll density gradient centrifugation and red blood cells lysis [25].

### **Antibodies for flow cytometry and depletion experiments :**

The following antibodies were used for multiparameter flow cytometry : anti H-2K<sup>d</sup> (SF1-1.1), anti CD3 (145-2C11), anti TCR $\beta$  (H57-597), anti CD4 (RM4-5), anti CD8 $\alpha$  (53-6.7), anti CD69 (H1.2F3), anti CD44 (IM7), anti CD62L (MEL-14), anti CD28 (37.51), anti NK1.1 (PK136), anti PD-1 (J43), anti CTLA-4 (UC10-4F10-11), anti CD244.2 (2B4), anti CD127 B12-1), anti CD122 (TM- $\beta$ 1 or 5H4 for depletion verification), anti CD25 (PC61 or 3C7 for depletion verification), anti CD45.1 (A20), anti IFN $\gamma$  (XMG1.2), anti CD103 (M290), anti KLRG1 (2F1), anti CCR7 (4B12), anti CD27 (LG.3A10), anti CXCR3 (CXCR3-173), (BD Biosciences Pharmingen), anti Lag3 (eBioC9B7W), anti IL-10 (JES5-16E3) and anti Ly49 C/I/F/H (14B11) (eBioscience).

Non-viable cells were excluded of analysis after staining with the Live/Dead fixable yellow dead cell stain kit (Life technologies). Cells were analyzed on an LSR II (Becton Dickinson). Data were processed with FlowJo software.

### **H-2K<sup>d</sup> expressing APC**

The murine dendritic cell line JAWS II derived from BMDCs of a C57Bl/6 p53-knockout mice [26] was used as target cell for *in vitro* experiment. H-2K<sup>d</sup> expression was constitutively induced in JAWS II cells by lentiviral transduction (PGK H-2K<sup>d</sup>). Briefly, 5.10<sup>5</sup> cells were cultured for one day before lentivirus was added in the medium at a MOI of 10 and incubated 24h before washing and amplification of cells. More than 90% of cells were H-2K<sup>d</sup> positive after 3 days and the frequency of positive cells remained stable over time.

## **IL-10 assays**

Hepatic and splenic CD8 T cells were purified by magnetic cell sorting with MACS beads according to the manufacturer's protocol (CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit, Miltenyi). CD8 T cells were cultured 72h in the presence of anti-CD3, anti-CD28 and IL-2 (100U.ml<sup>-1</sup>)/IL-15 (10ng.ml<sup>-1</sup>, Peptrotech). Supernatants were collected and assayed for IL-10 by ELISA (mouse IL-10 ELISA Set, BD Biosciences). For H-2K<sup>d</sup> specific assay, hepatic and splenic CD8 T cells were cultured 48 hours in the presence of syngeneic APCs or H-2K<sup>d</sup> expressing APCs. Cells were stimulated with 50 ng.ml<sup>-1</sup> PMA, 100 ng.ml<sup>-1</sup> ionomycin and BD GolgiPlug™ Protein Transport Inhibitor for 6 hours and stained for FACS analysis.

## **Proliferation and cytokine assays**

NPCs and splenocytes were isolated, stained with 10 $\mu$ M Cell Proliferation Dye (CPD) eFluor® 450 (eBioscience) and stimulated 96 hours in the presence of syngeneic APCs, H-2K<sup>d</sup> expressing APCs or with anti-CD3 and anti-CD28 as positive control. Supernatants were collected and assayed for cytokines with a multiplex bead assay (Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix, eBioscience). Cells were harvested and stained for proliferation analysis by FACS.

The  $\beta$ -Galactosidase-specific immune response was monitored after 96 hours culture of liver NPCs or splenocytes with a class I immunodominant peptide (P<sub>497-504</sub> ICPMYARV) or with irrelevant peptide (PA-15 PVSLMRMATPLLMQA). IFN $\gamma$  ELISA assay was performed on the culture supernatants.

## **MLR/suppressive assay**

Suppressive ability of hepatic CD8<sup>+</sup> Treg cells was evaluated *in vitro* on the proliferation of responder T cells isolated from B6.Ly5.1 mice (Charles River) stained with CPD. Hepatic NPCs from C57Bl/6 mice 4-6 weeks after AAV H-2K<sup>d</sup> transduction were pooled. Cells were stained with anti-CD3-PB, anti-CD8-APC Cy7, anti-PD-1-APC and anti-CD122-PE and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> T cells were sorted out using a FACS Aria (BD Biosciences). The purity of the sorted cells was higher than 95%. Suppressive cells were co-cultured at different ratio Effector T cells: Suppressive cells (E:S 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 and 2:0; 4.10<sup>4</sup> effector T cells per well), in the presence of anti-CD3/anti-CD28 coated microbeads for 48 hours, in 96-wells conical bottom microplate. When indicated, anti IL-10R antibody (1B1.3A, BioXCell, 150  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) or isotype were added in culture medium. Cells were harvested and Ly5.1<sup>+</sup> T cells stained for proliferation analysis by FACS.

## **Histology, immunofluorescence**

Histological analyses were performed on 4% paraformaldehyde-fixed/paraffin-embedded sections (5µm) after hematoxyline and phloxine staining. The presence of H-2K<sup>d</sup> positive cells was assessed by immunofluorescence on frozen liver section (8µm). Purified mouse anti H-2K<sup>d</sup> antibody (SF1-1.1, BD Pharmingen) diluted in PBS containing 5% BSA, 5% NGS was applied overnight at 4°C. Revelation was performed with AlexaFluor568 goat anti mouse IgG2d (Life Technologies) incubated for 1h30 at room temperature.

## **RT qPCR : mRNApreparation, list of primers**

Total RNA was extracted from liver tissue using Trizol reagent and purified with the Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. One microgram total RNA was transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase, oligonucleotides and random primer from Life Technologies. Real-time RT-PCR was performed using the ViiA™ 7 Real-Time PCR System and Power SYBR®Master Mix (Life Tecnologies). Primers for murine H-2K<sup>d</sup> (forward 5' GTGACATCAACTTGAGATCTGGG 3' ; reverse 5' ACACGTTGCAGCGGAT GTTC 3'), PD-1 (forward 5'CAGGCTGGGTAGAAAGGTGAG 3' ; reverse 5' CATTCACT TGGGCTGTGCT 3'), CTLA-4 (forward CTGAAGGTTGGGTCACCTGT 3' ; reverse 5' TGGACTCCGGAGGTACAAAG 3'), IL-10 (forward 5'CCAAGCCTTATCGGAAATGA 3' ; reverse 5' TTTTCACAGGGGAGAAATCG 3') and β-actin (forward 5' TACCACAGGC ATTGTGATGG 3'; reverse 5' AATAGTGATGACCTGGCCGT 3') were used for detection. Relative gene expressions were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

## **Donor specific antibody (DSA) assay**

For total donor-specific antibody detection or anti-H-2K<sup>d</sup> antibody detection, sera were serially diluted (1:20, 1:200 and 1:2000) and incubated with  $2 \cdot 10^5$  Balb/c (H-2d) mesenteric lymph node cells or  $2 \cdot 10^5$  C57Bl/6.K<sup>d</sup> (H-2K<sup>d</sup>) for 20 min at 4°C. The cells were washed and incubated with FITC conjugated goat anti-mouse IgG, Fcy Fragment specific (Jackson ImmunoResearch) for 20 min. An additional anti-CD3 staining was performed. Mean fluorescence intensity of CD3 positive cells were measured by flow cytometry.

## **PD-1<sup>+</sup> CD122<sup>+</sup> CD8 T cells isolation and adoptive transfer**

Hepatic CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> T cells were sorted out using a FACS Aria (BD Biosciences) as described above. The purity of the sorted cells was higher than 95%. Cells

were cultured overnight with anti-CD3, anti-CD28 and IL-2/IL-15. CD8 T cells were counted and  $3 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^5$  cells were intravenously injected in mice at the time of the graft.

### **Statistical analysis**

Prism (GraphPad Software, Inc.) was used for statistical analysis. For group comparison analysis,  $p$  values were calculated using the non-parametric Mann-Whitney U test. For survival analysis,  $p$  values were calculated by Kaplan Meier log-rank test. Two-sided  $p$  values  $<0.05$  were considered statistically significant between two groups.

## Results

### *Hepatocyte-targeted H-2K<sup>d</sup> expression regulates donor specific antibodies and allogeneic immune response in pancreatic islet allograft.*

An adeno-associated virus encoding for the MHC class I molecule H-2K<sup>d</sup>, downstream of the liver-specific murine transthyretin promoter (AAV H-2K<sup>d</sup>,  $1.2 \times 10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup>, *i.v.*) was injected to adult C57Bl/6 mice of the H-2b haplotype. The frequency of H-2K<sup>d</sup> expressing hepatocytes was evaluated by flow cytometry, and H-2K<sup>d</sup> mRNAs were quantified by RT qPCR to determine the level of expression in the liver at different time points. Expression of H-2K<sup>d</sup> was detected in more than 80% of the hepatocytes for at least 10 weeks (Fig. 1A), and the level of expression was maximal one week after transduction and remained stable thereafter (Fig. 1B). H-2K<sup>d</sup> was expressed at the membrane of hepatocytes, as shown on specific immunostaining of liver sections (Fig. 1C). Plasma levels of AST/ALT did not reveal any signs of liver damage at any time (Supp Fig.1). Histological examination showed a diffuse global infiltration of cells within the parenchyma of AAV H-2K<sup>d</sup> transduced animals, and an absence of hepatocytic damage at any time (Fig 1D).

We then examined whether the sustained expression of a single allogeneic MHC class I molecule at the surface of hepatocytes could be instrumental in avoiding rejection and maintaining a functional allogeneic graft. Two weeks after AAV H-2K<sup>d</sup> transduction diabetes was chemically induced in C57Bl/6 mice by injection of a single dose of Streptozotocin (Fig. 2A). Pancreatic islets were isolated from fully MHC mismatched mice (Balb/c - H-2d) and grafted under the kidney capsule of the AAV H-2K<sup>d</sup> transduced diabetic recipients. Graft function was monitored by repeated glycemia measurements (Fig. 2B). In mice that received a control AAV vector, the median survival time (MST) was 20 days. Mice injected with AAV H-2K<sup>d</sup> exhibited a significantly extended overall survival of their pancreatic islet allograft (MST 57 days), and 41% of the treated mice exhibited long-term survival and remained normoglycemic ( $144.8 \pm 20$  mg.ml<sup>-1</sup>) for more than 100 days, until they were euthanised. Third party grafts from H-2k mice were rejected rapidly in AAV control and AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice, demonstrating the specificity of the process (Fig. 2C). Donor specific antibodies (DSA) were monitored in long survivors (>100 days), and were hardly detectable, and drastically lower than the high titres of control mice at the time of their allograft rejection. Regarding the H-2K<sup>d</sup> specific antibodies, no specific IgG could be found in AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice, either in long survivors, or in those with a delayed rejection, in contrast to the control mice, in which high titres of H-2K<sup>d</sup>-specific antibodies were detected at rejection (Fig. 2D). This suggests a strong regulation of the allogeneic immune response by the AAV-mediated liver expression of the alloantigen. The level of expression of H-2K<sup>d</sup> was similar in

the liver of rejecting mice and of long survivors (Fig. 2E), suggesting that the graft rejection was not due to a weakening of the liver induced H-2K<sup>d</sup>-specific tolerance but rather to an immune response toward other alloantigens expressed in the islet graft. This is consistent with the moderate, but significant, presence of DSA and the absence of H-2K<sup>d</sup>-specific antibodies in the blood of the rejecting animals (Fig. 2D).

*AAV H-2K<sup>d</sup> transduced recipients cross-regulate the humoral and cellular immune response against a highly immunogenic Adenoviral vector challenge:*

To investigate the cellular and molecular events involved, we first focused on the H-2K<sup>d</sup>-specific immune response and its regulation by the sustained liver expression of the alloantigen. Intramuscular injection with adenoviral vector is well known for triggering a very strong humoral and cellular immune response against the product of the transgene. C57Bl/6 mice were immunized by intramuscular injection with an adenovirus encoding for H-2K<sup>d</sup> (Ad H-2K<sup>d</sup>) 2 weeks after transduction with the AAV H-2K<sup>d</sup> or the control vector (Fig. 3A). To characterize the H-2K<sup>d</sup> specific immune response, specific antibodies were monitored in the serum of the mice and splenic and hepatic leucocytes were prepared. The ability of these cells to proliferate and to secrete IFN $\gamma$  after specific stimulation with syngeneic H-2b antigen presenting cells stably expressing H-2K<sup>d</sup> (APC H-2K<sup>d</sup>+) was monitored. As expected, Ad H-2K<sup>d</sup> vaccinated mice had a high level of alloantigen-specific antibodies (Fig. 3B), and their T cells prepared from the spleen and the liver responded strongly to the H-2K<sup>d</sup> specific stimulation, in terms of IFN $\gamma$  secretion and proliferation (Fig. 3 C&D). In contrast, in mice that had first been transduced with AAV-H-2K<sup>d</sup> and stably expressed H-2K<sup>d</sup> in their liver, the humoral and cellular immune responses triggered by Ad H-2K<sup>d</sup> *i.m.* injection were significantly blunted, reminiscent of what was observed in the pancreatic islets allograft long survivors (Fig 2D). Consistent with this, we found that the level of expression of H-2K<sup>d</sup> in the liver of AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice was not significantly altered after Ad H-2K<sup>d</sup> immunization (Fig. 3E), and there was no sign of liver damage upon histological examination (Fig. 3F). Thus, after AAV-mediated H-2K<sup>d</sup> expression in the liver of the C57Bl/6 mice, a specific immune regulation takes place that allows the maintenance of the liver expression of the alloantigen, and is strong enough to control and even block the specific immune response triggered by intramuscular immunization with the Ad H-2K<sup>d</sup>. The specificity of this regulation is confirmed by the unaltered immune response stimulated by immunization with an adenovirus encoding  $\beta$ -galactosidase (Fig. 3G).

*AAV H-2K<sup>d</sup> transduction in the liver results in local expansion of a PD1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cell population, and H-2K<sup>d</sup>-specific tolerance depends on the PD-1/PD-L1 pathway:*

As stated earlier, there was a general infiltrate within the liver of AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice. To identify the immune cell population generated by AAV H-2K<sup>d</sup> mediated liver transduction that was responsible for the regulatory mechanisms observed, the liver non-parenchymal cells (NPC) were harvested and counted at different time points. The infiltration increased steadily from 1 week up to 4 weeks after AAV H-2K<sup>d</sup> transduction ( $8.2 \times 10^5$  to  $3.12 \times 10^6$  liver NPCs) (Fig. 4A), and remained stable afterwards. This increase was specific to AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice and was not observed in AAV Control transduced mice (data not shown). The main cell subsets among NPCs were analysed by flow cytometry. There was a general increase in the number of all cell types, however the CD8<sup>+</sup> T cell subset was the only one that showed a significantly increased frequency among NPCs, a consequence of a 5-fold increase of their total number after AAV H-2K<sup>d</sup> transduction (Fig. 4B&C). In comparison, the frequencies of all the other cell populations decreased or stayed stable over time (data not shown). There was also a significant increase in the frequency of Ki67-positive hepatic CD8<sup>+</sup> T cells in AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice compared to control mice, demonstrating their entrance in cell cycle and their ability to proliferate (Fig. 4C).

Markers associated with immunomodulation and regulation were analyzed by qPCR on liver NPC and splenocyte samples. A significant increase of the CTLA-4 and IL-10 mRNA levels was detected in liver NPCs of AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice (respectively 1.9 and 2.5 fold increase compared to AAV control mice) and in their splenocytes (respectively 4.3 and 3.4 fold increase). A large increase in the PD-1 mRNA level was observed in liver NPCs of AAV H-2K<sup>d</sup> mice (13.6 fold increase) as well as in their splenocytes, although to a lesser extent (3.6 fold increase) (Fig. 4D). Flow cytometry analysis showed a PD-1 staining almost exclusively restricted to CD8<sup>+</sup> T cells among liver NPCs from AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice (Fig. 4E), and the frequency of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells increased over the time to reach about 7% of total liver NPCs (Fig. 4F). No similar population was detected in the spleen of the mice (data not shown). Altogether, these results argue for the importance of PD-1 in the maintenance of transgene expression.

We then took advantage of the Adenoviral vaccination model described above (Fig 3A) to test whether the immune response against the alloantigen H-2K<sup>d</sup> could be restored in the presence of an anti-PD-L1 antibody (10F.9G2), which blocks the PD-1/PD-L1 pathway. We also tested the effect of an anti-CD25 antibody (PC61), classically used to deplete CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes. AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice were injected with either antibody or with isotype controls at the time of the Ad H-2K<sup>d</sup> vaccination. The

expression of H-2K<sup>d</sup> in the liver of the mice was monitored 2 weeks later (Fig. 4G) and was not modified by the depletion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T cells. The depletion of Treg cells was confirmed (SuppFig.2), and the H-2K<sup>d</sup> specific immune response triggered by Ad H-2K<sup>d</sup> *i.m.* vaccination was not altered by the PC61 injection in control mice (SuppFig.3). This argues against an active role of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg cells in the maintenance of the H-2K<sup>d</sup>-specific tolerance in AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice. In contrast, the anti PD-L1 antibody treatment resulted in a drastic reduction of H-2K<sup>d</sup> mRNA levels in the liver, as a consequence of the restoration of the immune response triggered by the Ad H-2K<sup>d</sup> vaccination, leading to major hepatocytic damages as shown on liver sections (Fig. 4H). This suggests that the immune regulation triggered by the liver expression of the alloantigen relies on the PD1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T lymphocytes generated after AAV transduction.

*Liver PD1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells display a regulatory phenotype and secrete IL-10 after H-2K<sup>d</sup>-specific stimulation in vitro:*

In conditions of hepatic chronic inflammation (e.g. after HCV or HBV infection), PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells have been reported to be anergic, or exhausted cells [27,28]. We performed an extensive phenotypic characterization of the CD8<sup>+</sup> T cells in the liver of AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice (Fig. 5A). We found that up to 60% of hepatic CD8<sup>+</sup> T cells were PD-1<sup>+</sup>. These PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cells were memory cells (CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>), they up-regulated the activation marker CD69, and down-regulated CD127. They also expressed the markers 2B4, Lag-3 and down-regulated CD3, TCRβ, and CD28. However, hepatic PD1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells over expressed CD122 and CD25, the beta and alpha subunit of IL-2 receptor respectively. The phenotype of these cells was stable over time, especially in terms of their CD122 staining, which was still positive more than 16 weeks after AAV transduction (data not shown). This, together with the fact that they were actively proliferating (over-expression of Ki67), is in striking contrast with the classical phenotype of exhausted cells [29], and could correspond to a population of regulatory T cells. Indeed, although they were negative for Foxp3, these cells were positive for Helios, suggesting a possible regulatory function.

CD8<sup>+</sup> T cells purified from the liver of mice transduced with AAV H-2K<sup>d</sup> or AAV control were cultured *in vitro*, and a polyclonal TCR stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies was performed. After 72hours, the supernatants were collected and IL-10 concentration was determined by ELISA. A significantly increased secretion of IL-10 was detected in the supernatant of cells from AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice, and it was enhanced by IL-2 and IL-15 (Fig. 5B). The receptors of these two cytokines share the same β subunit (CD122). The expression of IL-10 was detected by flow cytometry in CD8<sup>+</sup> T cells purified from NPCs of AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice, after specific stimulation for 48 hours with syngeneic H-2b APC

stably expressing H-2K<sup>d</sup>. The frequency of IL-10 positive cells detected by flow cytometry increased to more than 12% of CD8<sup>+</sup> T cells, and these IL-10<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells overexpressed both PD-1 and CD122 (Fig. 5C&D). Thus, AAV H-2K<sup>d</sup> transduction leads to a sustained expression of the alloantigen in the hepatocytes, and concurrently promotes the local proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells that upregulate PD-1 and CD122 and synthesize IL-10 after H-2K<sup>d</sup>-specific stimulation *in vitro*.

*Transfer of suppressive CD8<sup>+</sup>T cells from AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice inhibits rejection of allogeneic islets in naive mice:*

The suppressive function of these liver PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was first demonstrated *in vitro*, in mixed lymphocyte reactions with purified T cells from B6.Ly5.1 mice as responders, stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 microbeads. PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells inhibited T-cell proliferation *in vitro* at various ratios and this inhibition was dependent on the number of suppressor cells, but was not due to competition in culture (data not shown) (Fig. 6A&B). Anti-IL-10R antibody (1B1.3A, 100µg.ml<sup>-1</sup>) was added to the culture. This led to a partial restoration of the proliferation of responder T cells (E:S 4:1 92% vs 67.5%), demonstrating the role IL-10 secretion by PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in their suppressive function *in vitro* (Fig. 6C &D).

We then tested whether the suppressive CD8<sup>+</sup> T cells, educated in the AAV H-2K<sup>d</sup> transduced recipients, were able to specifically affect the survival of the fully allogeneic islets following transfer into naive mice. Liver PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were FACS-sorted from NPCs of mice that had been transduced with AAV H-2K<sup>d</sup>, and adoptively transferred to diabetic, naive C57Bl/6 mice on the same day they were grafted with the Balb/c pancreatic islets (Fig. 6E). The adoptive transfer of 3.10<sup>5</sup> to 5.10<sup>5</sup> of these CD8<sup>+</sup> Treg cells led to a significantly prolonged graft survival in all the mice, with 50% (2 out of 4) reaching more than 100 days, comparable to what we had observed in the mice that had been transduced with the AAV H-2K<sup>d</sup> vector, demonstrating that the tolerance was transferred to naive mice by the liver H-2K<sup>d</sup>-specific PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Treg cells (Fig. 6F).

## Discussion :

In this article, we show that AAV based gene transfer of the allogeneic MHC I molecule H-2K<sup>d</sup> in the liver induces the long-term survival of fully allogeneic pancreatic islet graft in streptozotocin-induced diabetic mice. The survival was extended beyond 100 days in more than 40% of the animals, and was associated with a quasi-absence of DSA. In addition, we show that the AAV H-2K<sup>d</sup> transduction inhibits H-2K<sup>d</sup>-specific T cell response and the production of anti-H-2K<sup>d</sup>-specific antibodies observed after adeno viral vaccination. Finally, we show for the first time that the AAV H-2K<sup>d</sup> transduction in the liver acts through the generation of “educated” suppressor CD8<sup>+</sup> T cells able to transfer the regulation following their transfer to unmodified naive mice.

The field of gene therapy was the first to take advantage of the tolerogenic properties of the liver, to permit the long term expression of the product of a transgene, which was either a model antigen (GFP, OVA) or a therapeutic protein (factor IX for haemophilia B, ATP7B for Wilson’s disease) [30-33]. This strategy was then extended to the field of experimental autoimmune diseases. Systemic tolerance was re-introduced after liver-targeted expression of auto-antigens, and can protect mice from EAE, a model of multiple sclerosis, and more recently from type 1 diabetes [20,21]. Tolerance induction toward an alloantigen expressed in the liver has been described recently, and the tolerized mice (H-2d) stably expressed the MHC I H-2K<sup>b</sup> molecule in their liver and accepted a skin graft with a single MHC class I mismatch [34]. Our work extends this result to another haplotype combination (H-2K<sup>d</sup> in H-2b mice) and demonstrates that the tolerance induced by the liver expression of a single allogeneic MHC I molecule is a robust phenomenon which resists an active vaccination with an adenoviral vector encoding the alloantigen, and more importantly, that this tolerance is sufficient to allow the long term acceptance of a fully allogeneic pancreatic islet graft.

Several immune mechanisms participate in the tolerogenic skew of the liver. Among them, studies based on gene transfer of soluble antigens in the liver have demonstrated the importance of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells as key cellular mediators [21,35]. Interestingly, we have no evidence of a role for CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg cells in the persistence of H-2K<sup>d</sup> expression and in the underlying immune regulation. The frequencies of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg cells in the liver of transduced mice remained unchanged over time. Moreover, the depletion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells in AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice did not restore the effector functions of T cells, nor the humoral response, did not break the tolerance state, even after Ad H-2K<sup>d</sup> vaccination, and the H-2K<sup>d</sup> expression in the liver remained stable during the antigenic challenge (Fig.4& supp. Fig.3). This difference in the type of regulatory effectors could result from our choice of transgene, an MHC I molecule,

expressed at the plasma membrane of hepatocytes, which implies a strong bias toward CD8-related events.

We observed the emergence of hepatic CD8<sup>+</sup> T cells, highly proliferating up to 4 weeks after AAV H-2K<sup>d</sup> transduction and remaining stable for at least 15 weeks. Phenotypic studies revealed a global homogeneity in this population, which was restricted to the liver and could represent up to 60% of total CD8<sup>+</sup> T cells in this organ. This emerging population of hepatic memory CD8<sup>+</sup> T cells was first identified by their lower expression of CD3, in accordance with TCR engagement. It was confirmed by up-regulation of the activation markers CD69, CD44 and NK1.1. The persistence of activated memory T cells in the liver without sign of tissue damage and no loss of transgene expression even after vaccination, suggested altered effector functions of these CD8<sup>+</sup>T cells. Phenotypically, expression of high levels of the inhibitory T-cell activation markers (PD-1, CTLA-4, Lag3, 2B4) by memory CD8<sup>+</sup> T cells, comparable to what we have observed on our population, is associated with exhaustion, a state of unresponsiveness reached by T cells after strong and persistent TCR engagement during chronic viral, bacterial and parasitic infections [29]. Reversing CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction by blocking the PD-1/PD-L1 pathway is a promising therapeutic strategy, that has demonstrated some efficacy in murine models of chronic viral infection, such as HBV [36] and malignancies [37]. However, blocking only this pathway might not always be sufficient to restore T cell effector function [38-40], consistent with the idea that there might be compensatory roles of other inhibitory molecules such as CTLA-4 or Tim 3 [41]. In our model of persistent alloantigen expression in the liver, the injection of an anti PD-L1 antibody at the time of AAV transduction induced a proliferation of liver CD8 T cells, but there was no sign of liver damage and the liver expression of H-2K<sup>d</sup> remained high and stable (data not shown), in agreement with what has been reported recently in another murine model [38]. However, the administration of the anti PD-L1 treatment concomitantly with the Ad H-2K<sup>d</sup> vaccination restored the effector functions of liver T cells, leading to major hepatocytic damage, destruction of H-2K<sup>d</sup> expressing hepatocytes (Fig. 4G&H) and tolerance breakdown. These results strongly suggest that the combination of PD-1/PD-L1 inhibition with antigen-specific vaccination could constitute a promising therapy against persistent hepatotropic pathogens.

The most original observation of our work is that the liver PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell population generated was not a classical exhausted population, but developed regulatory functions. Despite the phenotypic proximity of induced hepatic PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells with exhausted T cells, they differ in their cell cycle activity, demonstrated by their increased absolute number over time, their Ki67 expression and their higher size and granularity (data not shown). Another notable difference is the expression of IL-2R alpha and beta chains, normally down-regulated by exhausted cells [42,43], but which remained stable and even increased over

time in our cells. Interestingly, expression of both CTLA-4 and the IL-2R, as well as down-regulation of CD127, was reminiscent of what is described for CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells [44]. Although PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells did not express FoxP3, they up-regulated Helios, a key transcription factor important for the survival and stabilization of the suppressive functions of Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Tregs and also of some CD8<sup>+</sup> Treg cells [45]. The population described here is, however, a distinct population of CD8<sup>+</sup> Tregs, which does not express Ly49 (supp. Fig.4).

*In vitro*, liver PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells prepared from the AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice secreted IL-10 upon H-2K<sup>d</sup> specific stimulation and suppressed proliferation of activated T cells. This suppression was partially dependent on IL-10 since T-cell proliferation was restored in the presence of anti-IL-10R antibody. A population of CD122<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells positive for PD-1 has recently been described as regulatory T cells. Adoptive transfer of these cells also improved the survival of full allogeneic skin graft in Rag KO mice, in an IL-10 dependent manner. However, these CD8 Treg cells were naturally occurring naive cells, and their adoptive transfer to immunocompetent animals failed to induce long term survival of fully allogeneic pancreatic islets [46]. This is in striking contrast with the PD1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tregs isolated from the H-2K<sup>d</sup>-expressing liver, since, in our experiment, the intravenous injection of only 3.10<sup>5</sup> hepatic H-2K<sup>d</sup>-specific PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was sufficient to allow the survival of Balb/c allogeneic pancreatic islet in naive immunocompetent C57Bl/6 mice. Superior suppressive functions of allo-specific memory over naturally occurring naive Treg cells have been demonstrated for CD4<sup>+</sup> Tr1 cells in the same stringent model of pancreatic islet allograft [47]. In the present work, though, the suppressive cells that transferred the tolerance to naive mice were specific to a single alloantigen, suggesting possible linked suppression events [48] that need to be further investigated.

Whether the allo-specificity of this population of liver CD8<sup>+</sup> Tregs depends on a direct allogeneic recognition is yet another interesting question, particularly relevant in transplantation settings [49]. The use of an AAV8 vector, known for its low immunogenicity [50] and strong liver tropism, together with an hepato-specific promoter driving the expression of the transgene, ensure a restricted expression of H-2K<sup>d</sup> to the hepatocytes, as shown by immunohistochemistry (Fig.1C), and in agreement with the literature [51]. These authors demonstrated with a similar vector, at a comparable titre, that a membrane-anchored form of ovalbumin was expressed by the hepatocytes, and that Ova derived peptides were presented on MHC I molecules at the surface of the hepatocytes, and also extra-hepatically, by cross-presentation within lymphoid tissues. In the present work, the same presentation pathways also exist, but the alloantigen H-2K<sup>d</sup> expressed at the plasma membrane of the hepatocytes can also be directly recognized by alloreactive CD8<sup>+</sup> T cells. One experimental

line of evidence points toward a direct allorecognition: the transduction of mice with an AAV vector encoding a soluble form of the H-2K<sup>d</sup> molecule deleted of its transmembrane domain did not induce the expansion of the PD1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Treg cells (Supp Fig. 5), suggesting that the expression of H-2K<sup>d</sup> at the plasma membrane of the hepatocytes, and its direct interaction with the CD8/TCR complex is necessary.

We speculate that the efficacy of the adoptive transfer relies on the strong specificity and affinity of the CD8<sup>+</sup> Treg cells for H-2K<sup>d</sup>. It has been shown that exhaustion of CD8<sup>+</sup> T cells in the liver requires high levels of expression of the antigen, and that the maintenance of the exhausted phenotype requires the constant expression of the antigen [51,52]. The same property might apply to the CD8<sup>+</sup> Treg cells generated and isolated from H-2K<sup>d</sup> expressing liver. Since H-2K<sup>d</sup> is only present in the graft, and not in the liver of the recipient mice, the transferred cells might localize at the level of the graft under the kidney capsule. Their strong tissue resident properties (CD69<sup>+</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CCR7<sup>-</sup>, KLRG1<sup>-</sup>, CXCR3<sup>int</sup>) (Fig. 5 & supp. Fig 4) could favour the migration towards this site, and their secretion of IL-10, in addition to their expression of co-inhibitory molecules such as Lag3 and CTLA-4 could tip the balance of the graft microenvironment toward a tolerogenic state.

In this article we demonstrate the potential of gene therapy to induce a process of allo-specific tolerance mediated by CD8<sup>+</sup> Treg cells. Although the CD4<sup>+</sup> T cell populations with donor-specific immunoregulatory activity have been the main focus of many studies for some times now [53], other T-cell populations, including CD8<sup>+</sup> ones with a direct [54] or an indirect allorecognition [55], have been shown to exhibit regulatory activities in different situations related to transplantation. These cellular regulation mechanisms are not exclusive one from another, and it is clear that optimal therapeutic benefit might arise from a combination of strategies harnessing several of these populations. The recent success of gene therapy clinical trials in the field of inherited disease and cancer treatment and their excellent safety records [56] argue for continuing the implementation of gene therapy strategies such as the one described in this article in the field of organ and cell transplantation.

## **Acknowledgement**

We thank E. Mériaux and C. Uzal from the animal facilities for their precious help, and Dr A. Nicot and Dr N. Degauque for helpful discussions.

This work was done in the context of the IHU-Cesti project which received French government financial support managed by the National Research Agency via the “Investment Into The Future” program ANR-10-IBHU-005, in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency, program ANR-11-LABX-0016-01 and the LABEX TRANSPLANTEX [ANR-11-LABX-0070\_TRANSPLANTEX]. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. This work was also supported by grants from the Fondation de l’Avenir, the Fondation Centaure and from the Société Francophone de Transplantation.

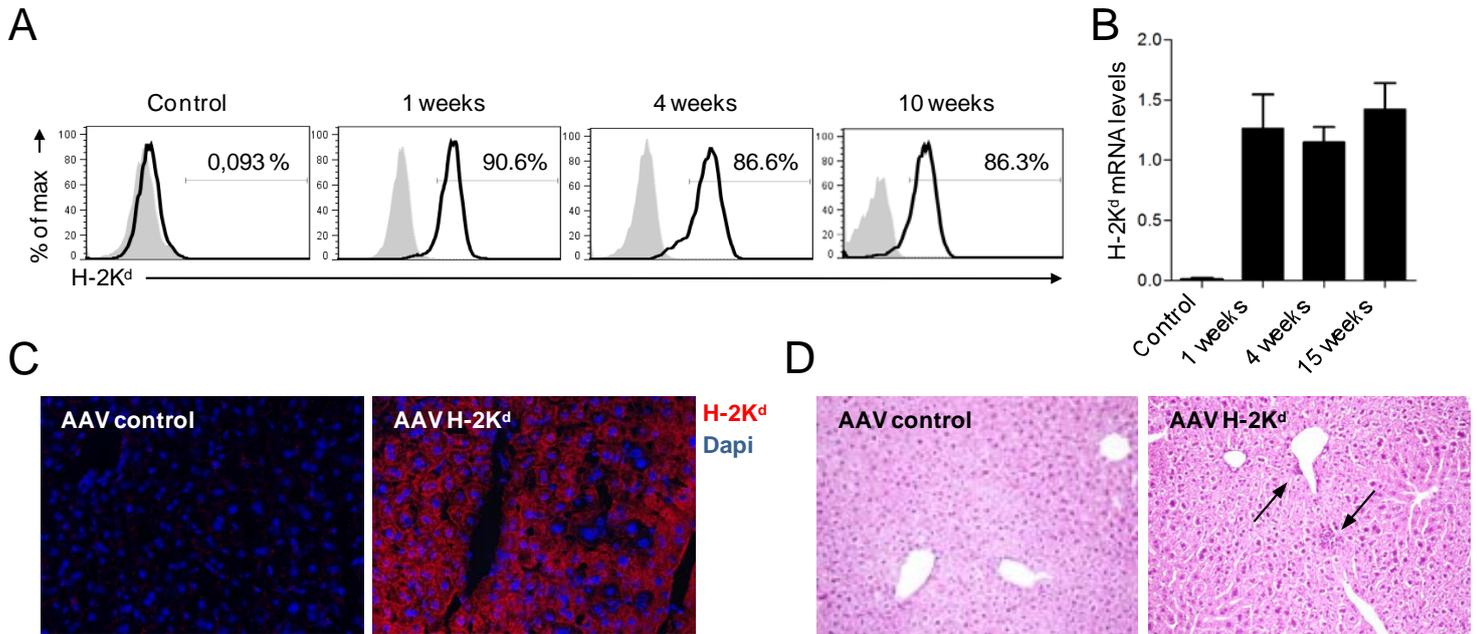
## References

- [1] Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 2007;357:2601–14.
- [2] Euvrard S, Morelon E, Rostaing L, Goffin E, Brocard A, Tromme I, et al. Sirolimus and secondary skin-cancer prevention in kidney transplantation. *N Engl J Med* 2012;367:329–39.
- [3] Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, Benike C, Millan MT, Shizuru JA, et al. Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2008;358:362–8.
- [4] Leventhal J, Abecassis M, Miller J, Gallon L, Ravindra K, Tollerud DJ, et al. Chimerism and tolerance without GVHD or engraftment syndrome in HLA-mismatched combined kidney and hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Transl Med* 2012;4:124ra28–8.
- [5] Kawai T, Sachs DH, Sprangers B, Spitzer TR, Saidman SL, Zorn E, et al. Long-Term Results in Recipients of Combined HLA-Mismatched Kidney and Bone Marrow Transplantation Without Maintenance Immunosuppression. *Am J Transplant* 2014;14:1599–611.
- [6] Geissler EK, Hutchinson JA. Cell therapy as a strategy to minimize maintenance immunosuppression in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant* 2013:1–8.
- [7] Tang Q, Bluestone JA. Regulatory T-Cell Therapy in Transplantation: Moving to the Clinic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2013;3:a015552–2.
- [8] Sagoo P, Ali N, Garg G, Nestle FO, Lechler RI, Lombardi G. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* 2011;3:83ra42–2.
- [9] Farris AB, Taheri D, Kawai T, Fazlollahi L, Wong W, Tolckoff-Rubin N, et al. Acute Renal Endothelial Injury During Marrow Recovery in a Cohort of Combined Kidney and Bone Marrow Allografts. *Am J Transplant* 2011;11:1464–77.
- [10] Sachs DH, Sykes M, Kawai T, Cosimi AB. Immuno-intervention for the induction of transplantation tolerance through mixed chimerism. *Semin Immunol* 2011;23:165–73.
- [11] Putnam AL, Safinia N, Medvec A, Laszkowska M, Wray M, Mintz MA, et al. Clinical Grade Manufacturing of Human Alloantigen-Reactive Regulatory T Cells for Use in Transplantation. *Am J Transplant* 2013;13:3010–20. doi:10.1111/ajt.12433.
- [12] Crispe IN. Immune tolerance in liver disease. *Hepatology* 2014;60:2109–17.
- [13] Jacob AI, Goldberg PK, Bloom N, Degenshein GA, Kozinn PJ. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 1977;72:1268–70.
- [14] Knolle PA, Thimme R. Hepatic immune regulation and its involvement in viral hepatitis infection. *Gastroenterology* 2014;146:1193–207.
- [15] Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver - from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13:88–110. doi:10.1038/nrgastro.2015.200.
- [16] Bertolino P, Bowen DG, McCaughan GW, Fazekas de St Groth B. Antigen-Specific Primary Activation of CD8+ T Cells Within the Liver. *J Immunol* 2001;166:5430–8.
- [17] Warren A, Le Couteur DG, Fraser R, Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 2006;44:1182–90.
- [18] Stross L, Günther J, Gasteiger G, Asen T, Graf S, Aichler M, et al. Foxp3+ regulatory T cells protect the liver from immune damage and compromise virus control during acute experimental hepatitis B virus infection in mice. *Hepatology* 2012;56:873–83.
- [19] Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EGD, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, et al. Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *N Engl J Med* 2014;371:1994–2004.
- [20] Lüth S, Huber S, Schramm C, Buch T, Zander S, Stadelmann C, et al. Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. *J Clin Invest* 2008;118:3403–10.
- [21] Akbarpour M, Goudy KS, Cantore A, Russo F, Sanvito F, Naldini L, et al. Insulin B chain 9-23 gene transfer to hepatocytes protects from type 1 diabetes by inducing Ag-specific FoxP3+ Tregs. *Sci Transl Med* 2015;7:289ra81–1.

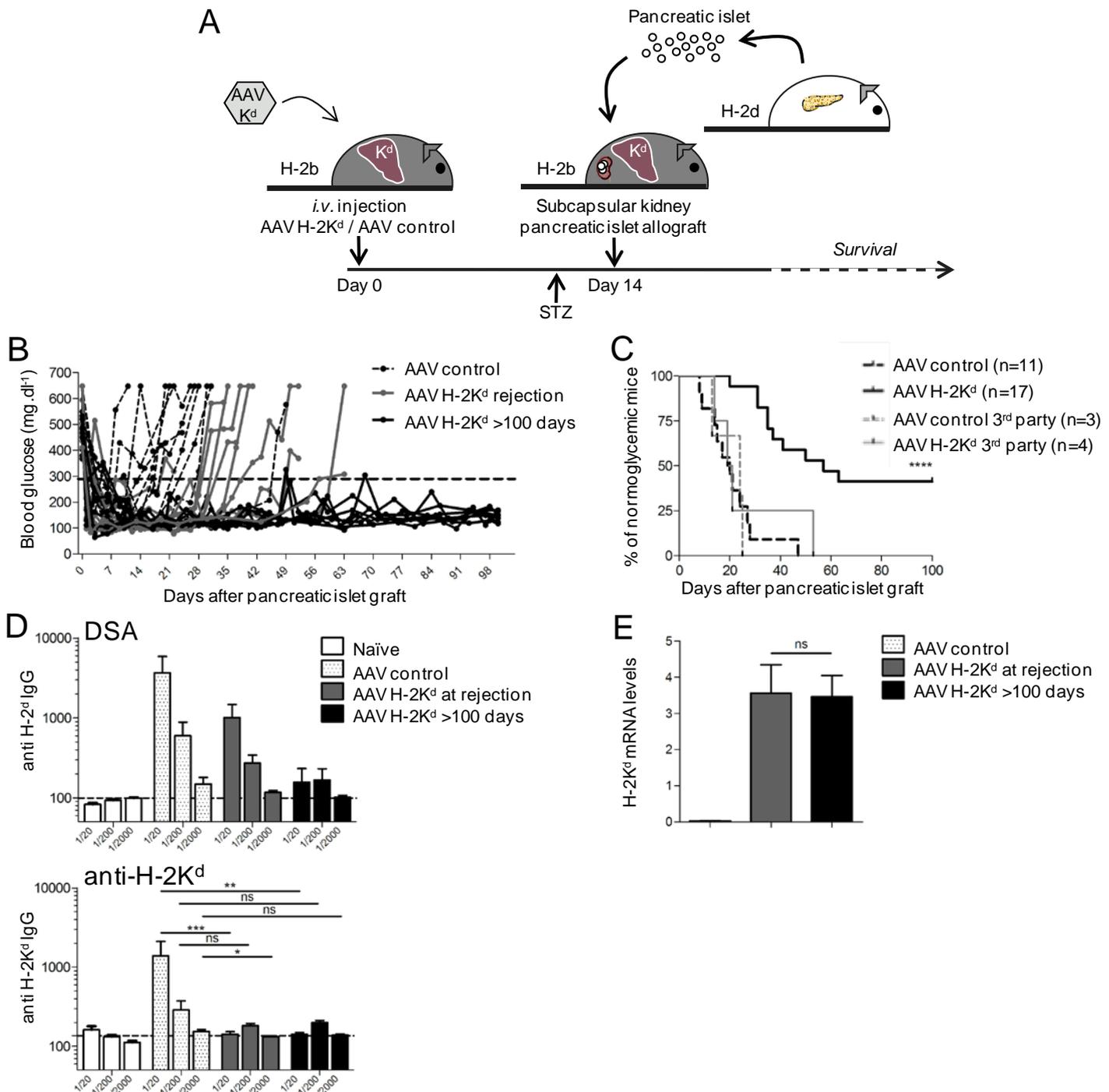
- [22] Cany J, Avril A, Pichard V, Aubert D, Ferry N, Conchon S. A transgenic mouse with  $\beta$ -Galactosidase as a fetal liver self-antigen for immunotherapy studies. *J Hepatol* 2007;47:396–403.
- [23] Mai H-L, Boeffard F, Longis J, Danger R, Martinet B, Haspot F, et al. IL-7 receptor blockade following T cell depletion promotes long-term allograft survival. *J Clin Invest* 2014;124:1723–33.
- [24] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976;13:29–83.
- [25] Gauttier V, Judor J-P, Le Guen V, Cany J, Ferry N, Conchon S. Agonistic anti-CD137 antibody treatment leads to antitumor response in mice with liver cancer. *Int J Cancer* 2014;135:2857–67.
- [26] Jiang X, Shen C, Rey-Ladino J, Yu H, Brunham RC. Characterization of murine dendritic cell line JAWS II and primary bone marrow-derived dendritic cells in *Chlamydia muridarum* antigen presentation and induction of protective immunity. *Infect Immun* 2008;76:2392–401.
- [27] Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* 2006;80:11398–403.
- [28] Zehn D, Utzschneider DT, Thimme R. Immune-surveillance through exhausted effector T-cells. *Curr Opin Virol* 2016;16:49–54.
- [29] Wherry EJ, Ha S-J, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, et al. Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity* 2007;27:670–84.
- [30] Mingozi F, Liu Y-L, Dobrzynski E, Kaufhold A, Liu JH, Wang Y, et al. Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer. *J Clin Invest* 2003;111:1347–56.
- [31] Brown BD, Venneri MA, Zingale A, Sergi L, Naldini L. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med* 2006;12:585–91.
- [32] Breous E, Somanathan S, Vandenberghe LH, Wilson JM. Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver. *Hepatology* 2009;50:612–21.
- [33] Murillo O, Luqui DM, Gazquez C, Martinez-Espartosa D, Navarro-Blasco I, Monreal JI, et al. Long-term metabolic correction of Wilson's disease in a murine model by gene therapy. *J Hepatol* 2016;64:419–26.
- [34] Cunningham EC, Tay SS, Wang C, Rtshiladze M, Wang ZZ, McGuffog C, et al. Gene therapy for tolerance: high-level expression of donor major histocompatibility complex in the liver overcomes naive and memory alloresponses to skin grafts. *Transplantation* 2013;95:70–7.
- [35] Cooper M, Nayak S, Hoffman BE, Terhorst C, Cao O, Herzog RW. Improved induction of immune tolerance to factor IX by hepatic AAV-8 gene transfer. *Hum Gene Ther* 2009;20:767–76.
- [36] Isogawa M, Chung J, Murata Y, Kakimi K, Chisari FV. CD40 Activation Rescues Antiviral CD8+ T Cells from PD-1-Mediated Exhaustion. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003490.
- [37] Hamid O, Carvajal RD. Anti-programmed death-1 and anti-programmed death-ligand 1 antibodies in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2013;13:847–61.
- [38] Vo M, Holz LE, Wong YC, English K, Benseler V, McGuffog C, et al. The extent and duration of acute hepatitis in mice is dominated by the function rather than by the survival of effector CD8 T cells. *J Hepatol* 2016;1–43.
- [39] Fuller MJ, Callendret B, Zhu B, Freeman GJ, Hasselschwert DL, Satterfield W, et al. Immunotherapy of chronic hepatitis C virus infection with antibodies against programmed cell death-1 (PD-1). *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:15001–6.
- [40] Gardiner D, Lalezari J, Lawitz E, DiMicco M, Ghalib R, Reddy KR, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled assessment of BMS-936558, a fully human monoclonal antibody to programmed death-1 (PD-1), in patients with chronic hepatitis C virus infection. *PLoS ONE* 2013;8:e63818.
- [41] Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015;15:486–99.

- [42] Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nature Immunol* 2011;12:492–9. doi:10.1038/ni.2035.
- [43] Shin H, Blackburn SD, Blattman JN, Wherry EJ. Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J Exp Med* 2007;204:941–9.
- [44] Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701–11.
- [45] Kim H-J, Barnitz RA, Kreslavsky T, Brown FD, Moffett H, Lemieux ME, et al. Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science* 2015;350:334–9.
- [46] Dai Z, Zhang S, Xie Q, Wu S, Su J, Li S, et al. Natural CD8+CD122+ T cells are more potent in suppression of allograft rejection than CD4+CD25+ regulatory T cells. *Am J Transplant* 2014;14:39–48.
- [47] Gagliani N, Jofra T, Stabilini A, Valle A, Atkinson M, Roncarolo MG, et al. Antigen-specific dependence of Tr1-cell therapy in preclinical models of islet transplant. *Diabetes* 2010;59:433–9.
- [48] Kendal AR, Waldmann H. Infectious tolerance: therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 2010;22:560–5.
- [49] Benichou G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci* 1999;4:D476–80.
- [50] Zaiss A-K, Liu Q, Bowen GP, Wong NCW, Bartlett JS, Muruve DA. Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 2002;76:4580–90.
- [51] Tay SS, Wong YC, McDonald DM, Wood NAW, Roediger B, Sierro F, et al. Antigen expression level threshold tunes the fate of CD8 T cells during primary hepatic immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:E2540–9.
- [52] Wong YC, Tay SS, McCaughan GW, Bowen DG, Bertolino P. Immune outcomes in the liver: Is CD8 T cell fate determined by the environment? *J Hepatol* 2015;63:1005–14.
- [53] Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3:199–210.
- [54] Kusaka S, Grailer AP, Fechner JH, Jankowska-Gan E, Oberley T, Sollinger HW, et al. Clonotype Analysis of Human Alloreactive T Cells: A Novel Approach to Studying Peripheral Tolerance in a Transplant Recipient. *J Immunol* 2000;164:2240–7.
- [55] Guillonneau C, Hill M, Hubert F-X, Chiffolleau E, Hervé C, Li X-L, et al. CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2007;117:1096–106.
- [56] Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 2015;526:351–60.

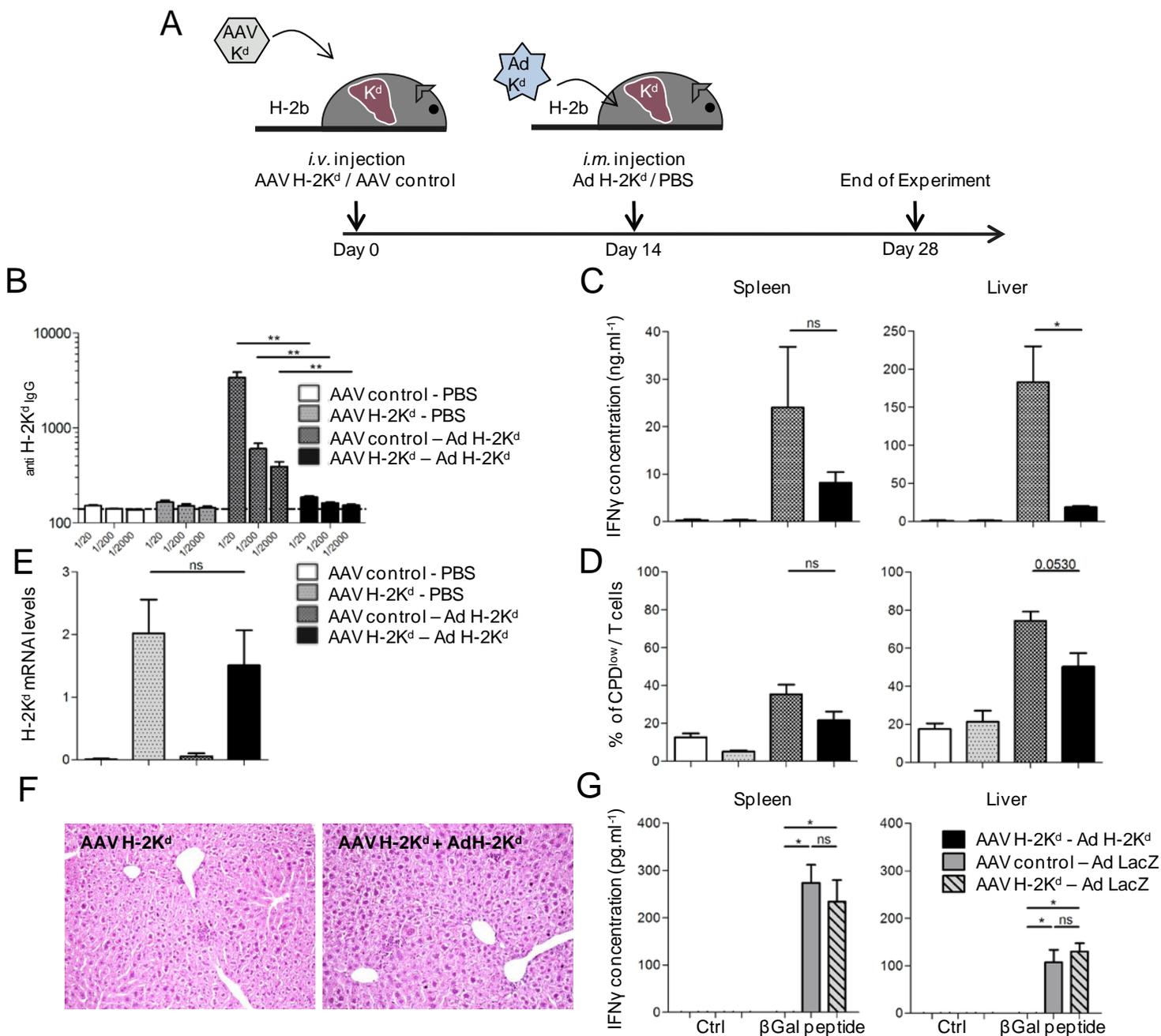
## Figures and Legends



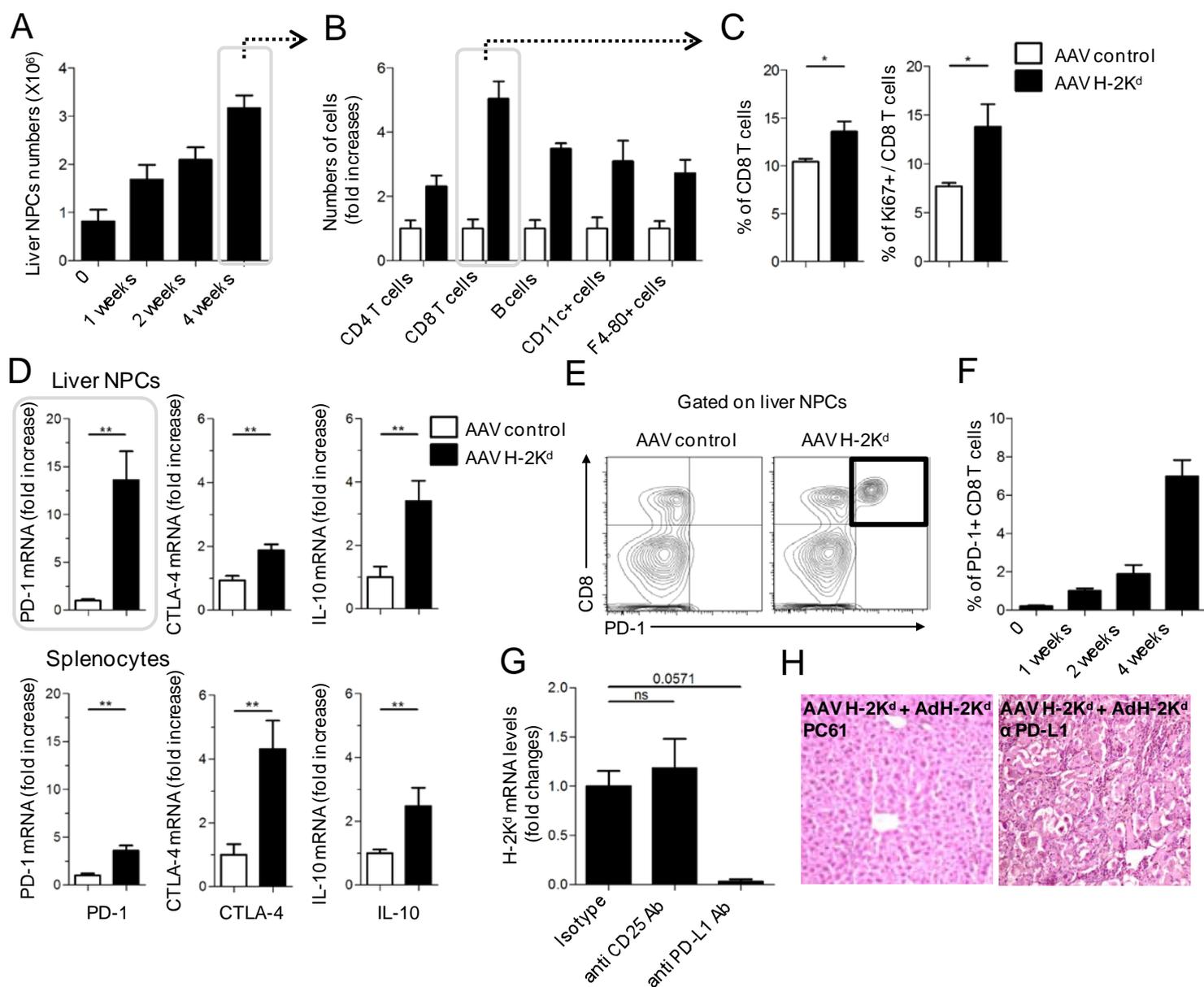
**Figure 1. Long term expression of H-2K<sup>d</sup> in the liver of H-2b mice after a single injection of AAV vector.** Eight week old C57Bl/6 mice received an injection of AAV control or AAVH-2K<sup>d</sup> ( $1.2 \cdot 10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup>, *i.v.*) and (A) hepatocytes were isolated 1, 4 and 10 weeks after transduction and stained with anti H-2K<sup>d</sup> antibody before analysis by flow cytometry (n=4). Histograms present the percentage of H-2K<sup>d</sup> positive hepatocytes at each time point. (B) Quantitative RT-PCR analysis of H-2K<sup>d</sup> mRNA expression in liver samples of AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice or control at 1, 4 and 15 weeks (n=4). Results are presented relative to the expression of β-actin. (C) H-2K<sup>d</sup> expression was detected by immunofluorescence on frozen liver sections of C57Bl/6 mice 8 weeks after AAV control or AAV H-2K<sup>d</sup> injections. (D) H&E staining on paraffin liver samples 2 weeks after AAV transduction (X200). The arrows point to leucocyte infiltrations. (D-E) Images are representative of liver from four animals per group.



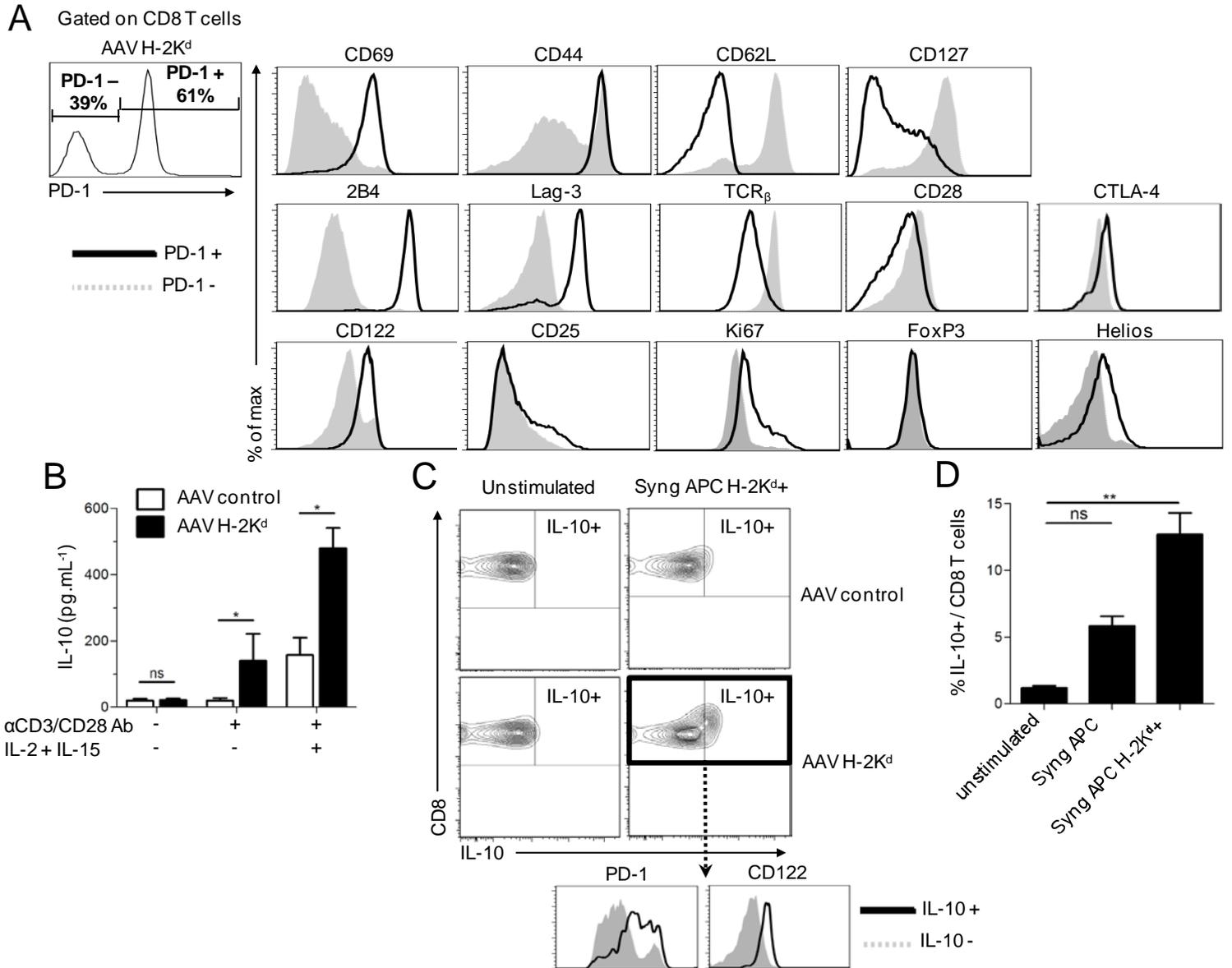
**Figure 2. Hepatic H-2K<sup>d</sup> expression improves the survival of pancreatic islet allografts.** (A) C57Bl/6 mice (H-2b) received an injection of AAV H-2K<sup>d</sup> or control ( $1.2 \times 10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup>, *i.v.*). 2 weeks after, diabetes was induced by injection of streptozotocin (STZ, 200 mg.kg<sup>-1</sup>, *i.p.*) and 300-500 pancreatic islets from Balb/c mice (H-2d) were implanted under the kidney capsule. Survival of pancreatic islets was evaluated by measure of blood glucose several times per week. (B) Blood glucose level in individual mouse. Graft rejection corresponded to blood glucose level above 290 mg.dl<sup>-1</sup>. (C) Graft survival in AAV control (dotted black lines) and AAV H-2K<sup>d</sup> (bold black lines) mice. In control mice, grafts were rejected with an MST of 20 days (n=11). MST is statistically prolonged to 57 days ( $p < 0.0001$ , n=17) in AAV H-2K<sup>d</sup> treated mice. Third party allografts (from H-2k mice) were similarly rejected in control (dotted gray lines, n=3, MST of 24 days) and AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice (bold gray lines, n=4, MST of 20 days). (D) Serum were diluted (1:20, 1:200, 1:2000 in PBS) and assayed for titration of donor specific antibodies (DSA) or anti H-2K<sup>d</sup> IgG (naïve mice n=3, AAV control n=8, AAV H-2K<sup>d</sup> at rejection n=9, AAV H-2K<sup>d</sup> >100 days n=6). (E) Quantitative RT-PCR analysis of H-2K<sup>d</sup> mRNA expression in liver samples of grafted AAV H-2K<sup>d</sup>-transduced mice, at time of rejection (n=5) or at sacrifice (>100 days) when there was no rejection (n=3), or in grafted AAV control-transduced mice at rejection (n=5). Results are presented relative to the expression of  $\beta$ -actin. Histograms represent the mean ( $\pm$  s.e.m). For survival analysis, *p* values were calculated by Kaplan Meier log-rank test (\*\*\*\*  $P < 0.0001$ ). For group comparison, *p* values were calculated by Mann-Whitney U test, ns = no significance, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



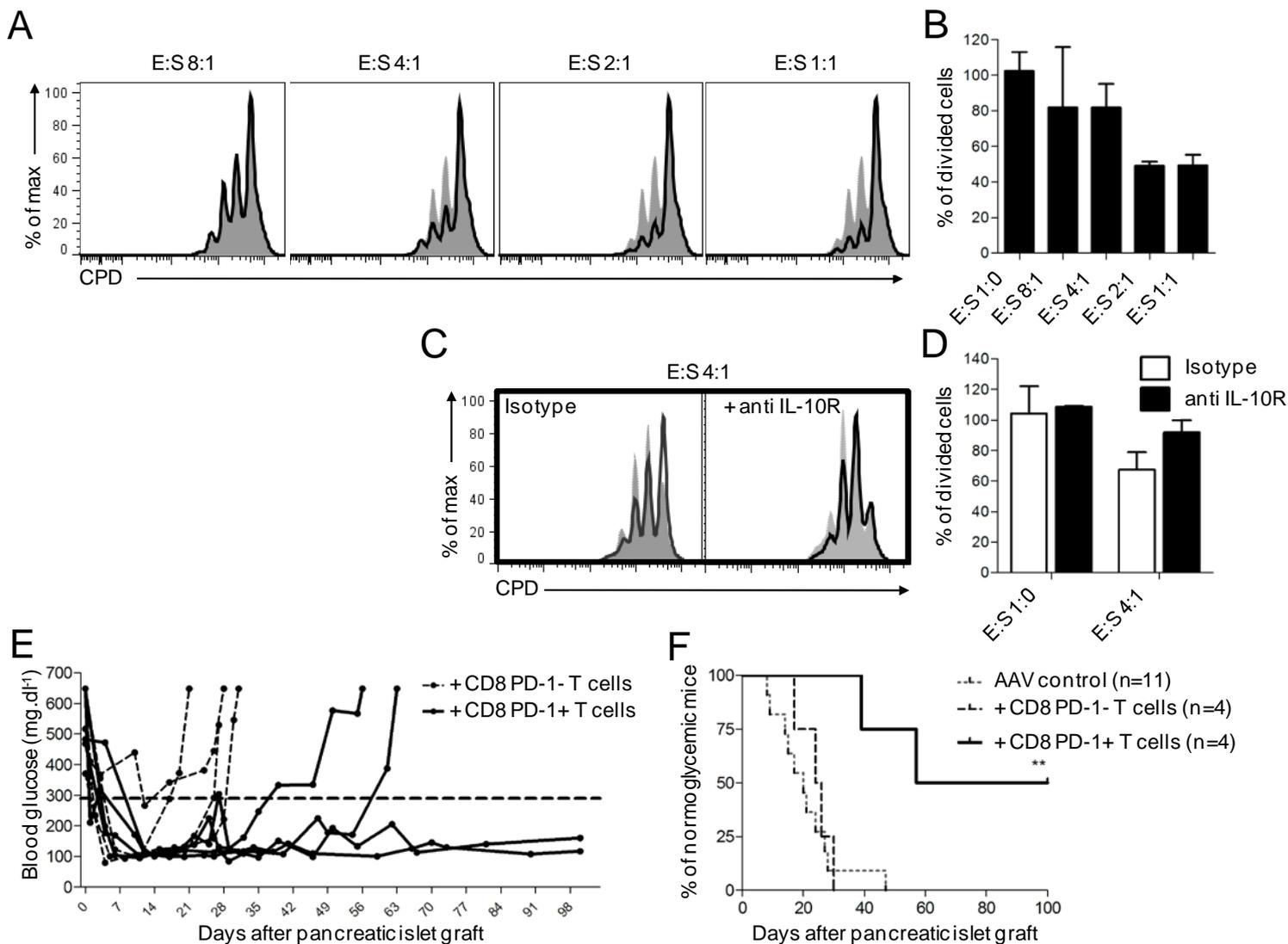
**Figure 3. AAV H-2K<sup>d</sup> transduced mice regulate the humoral and cellular immune response triggered by an Adenoviral H-2K<sup>d</sup> immunisation.** (A) Two weeks after AAV control or AAV H-2K<sup>d</sup> injection, mice were immunized with a single injection of Ad H-2K<sup>d</sup> ( $1.6 \times 10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup>, *i.m.*). (B) At the end of experiments, diluted sera (1:20, 1:200, 1:2000 in PBS) were assayed for determination of anti H-2K<sup>d</sup> IgG levels by flow cytometry (n=4 for AAV control-PBS and AAV H-2K<sup>d</sup>-PBS and n=8 for AAV control-Ad H-2K<sup>d</sup> and AAV H-2K<sup>d</sup>-Ad H-2K<sup>d</sup>). Splenocytes and liver NPCs were co-cultured 96 hours in the presence of syngenic APCs H-2K<sup>d</sup>+. (C) Culture supernatants were collected for dosage of IFN $\gamma$  by multiplex bead assay (n=4). (D) Cells were stained and analyzed by flow cytometry for CPD dilution (n=7). (E) qRT-PCR analysis of H-2K<sup>d</sup> mRNA expression in liver samples of mice (n=5 for AAV control + PBS and AAV control + Ad H-2K<sup>d</sup> and n=8 for AAV H-2K<sup>d</sup> + PBS and AAV H-2K<sup>d</sup> + Ad H-2K<sup>d</sup>). Results are presented relative to expression of  $\beta$ -actin. (F) H&E staining of liver section (X200). Images are representative of liver from 4 animals per group. (G) Immune responses after immunization against third party antigen were tested by injection of Ad LacZ ( $1.2 \times 10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup>, *i.m.*) 2 weeks after AAV transduction. Two weeks after vaccination, splenocytes and liver NPCs were cultured for 96 hours in the presence of  $\beta$ -gal immunodominant peptide (P497-504) or irrelevant peptide. Culture supernatants were tested for IFN $\gamma$  by ELISA (n=4). Data were compiled from two experiments (B, E) or representative of two (C) or three independent experiments (D, F). (G) represents data from single experiments performed on 3 to 4 animals per group. Histograms represent the mean ( $\pm$  s.e.m). *p* values were calculated by Mann-Whitney U test, ns = no significance, \* *p*<0.05, \*\* *p*<0.01.



**Figure 4. H-2K<sup>d</sup> expression in the liver impacts hepatic CD8 T cells.** (A) Liver NPCs were isolated at different times after AAV H-2K<sup>d</sup> injection ( $1.2 \times 10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup>, *i.v.*) and counted ( $n=4$ ). At week 4, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, B cells, CD11c<sup>+</sup> and F4-80<sup>+</sup> cells were evaluated by flow cytometry and (B) absolute number of each subpopulation was compared with that measured for control mice ( $n=4$ ). (C) Frequencies of CD8<sup>+</sup> T cells and Ki67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in liver NPCs ( $n=4$ ) were reported on histograms. (D) qRT-PCR analysis of indicated mRNA expression in liver NPCs and splenocytes isolated from AAV control or AAV H-2K<sup>d</sup> mice 2 weeks after injections. Results are presented relative to expression of  $\beta$ -actin and compared to the mean of relative mRNA levels of sample from AAV control mice ( $n=6$ ). (E) Representative PD-1 and CD8 co-staining of liver NPCs isolated from AAV control or AAV H-2K<sup>d</sup> mice. (F) Time-course of hepatic PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells frequencies after AAV H-2K<sup>d</sup> injection ( $n=4$ ). (G) qRT-PCR analysis of H-2K<sup>d</sup> mRNA expression in liver samples of AAV H-2K<sup>d</sup> - Ad H-2K<sup>d</sup> mice injected with isotype antibody (200  $\mu$ g per injection, *i.p.*,  $n=4$ ) or anti CD25 antibody (250  $\mu$ g per injection, *i.p.*,  $n=4$ ) or anti PD-L1 antibody (200  $\mu$ g per injection, *i.p.*,  $n=3$ ). Results are presented relative to  $\beta$ -actin expression and compared to the mean of relative mRNA levels of mice receiving isotype antibody. (H) Representative images of H&E staining of liver section from indicated mice. Data were representative of two (A, B, C, D) or more than three independent experiments (E, F). (G, H) represent data from single experiments performed on 3 to 4 animals per group. Histograms represent the mean ( $\pm$  s.e.m).  $p$  values were calculated by Mann-Whitney U test, ns = no significance, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

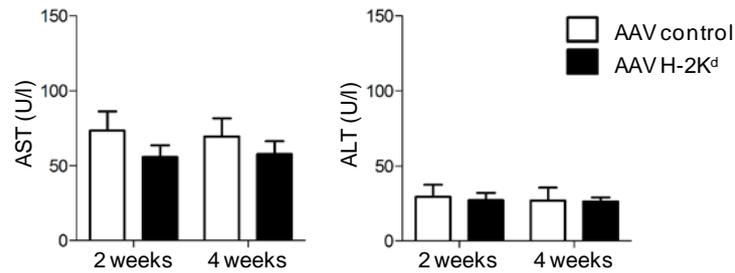


**Figure 5. Hepatic PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells express markers of regulatory T cells and secrete IL-10.** (A) Four weeks after injection of AAV H-2K<sup>d</sup> ( $1.2 \times 10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup>, *i.v.*), liver NPCs were isolated and stained for phenotypic analysis by flow cytometry of indicated molecules on PD-1<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (gray histogram) or PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (black histogram) ( $n=3$ ). Representative results are shown. (B) Four weeks after injection of AAV H-2K<sup>d</sup> or control, hepatic CD8<sup>+</sup> T cells were isolated and stimulated 72 hours at 37°C in the presence of anti-CD3, anti-CD28 antibodies and IL-2 (100 U.mL<sup>-1</sup>) /IL-15 (10 ng.mL<sup>-1</sup>). Culture supernatants were collected for dosage of IL-10 by ELISA ( $n=6$ ). (C) Hepatic CD8<sup>+</sup> T cells were stimulated 48 hours at 37°C in the presence of syngeneic APCs H-2K<sup>d</sup> and by addition of PMA (50 ng.mL<sup>-1</sup>), Ionomycin (100 ng.mL<sup>-1</sup>) and BD GolgiPlug for the last 6 hours for intracellular cytokine staining. Representative IL-10 and CD8 co-staining are presented. Histograms represent the analysis of PD-1 and CD122 expression on IL-10<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (gray histograms) and IL-10<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (black histograms). Frequencies of IL-10<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells for each condition are reported in (D) ( $n=4$ ). Histograms represent the mean ( $\pm$  s.e.m).  $p$  values were calculated by Mann-Whitney U test, ns = no significance, \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ . Data were representative of two (A) or three independent experiments (B, C and D).

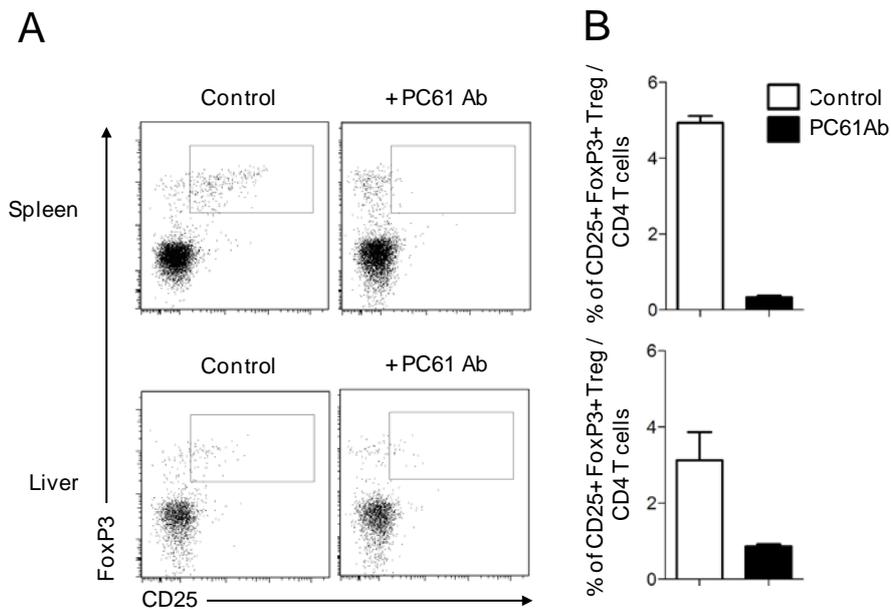


**Figure 6. Hepatic PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells suppress proliferation *in vitro* and improve pancreatic islet graft survival.**  $8 \cdot 10^5$  polyclonally activated T cells were co-cultured in duplicate and at ratio Effector: Suppressor cells indicated with PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells sorted from liver NPCs of AAV H-2K<sup>d</sup> treated mice by BD FACS Aria. After 48 hours, proliferation of effector T cells was analyzed by CPD dilution assay. (A) Representative histograms of CPD dilution profiles from effector T cells cultured without (in gray) or with suppressor cells (in black) at indicated ratio. Frequencies of divided cells were calculated and reported in (B). (C and D) In a similar experiment, the effect of blocking IL-10 signaling was tested by the addition of control isotypic or anti IL-10R antibody (clone 1B1.3A, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Diabetic naive mice (STZ, 200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , *i.p.*) were grafted with 300-500 pancreatic islets from Balb/c mice.  $3 \cdot 10^5$  to  $5 \cdot 10^5$  PD-1<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (dotted lines) or PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (black lines) isolated by BD FACS Aria from pools of liver NPCs from AAV H-2K<sup>d</sup> mice were adoptively transferred to grafted mice. (E) Blood glucose levels in individual mice after pancreatic islet grafts. (F) Pancreatic islet survival in the different groups were compared. After adoptive transfer of PD-1<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells, grafts were rejected with an MST of 25 day (n=4) whereas MST is statistically prolonged to 78.5 days ( $p < 0.01$ , n=4) after injection of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells. Histograms represent the mean ( $\pm$  s.e.m).

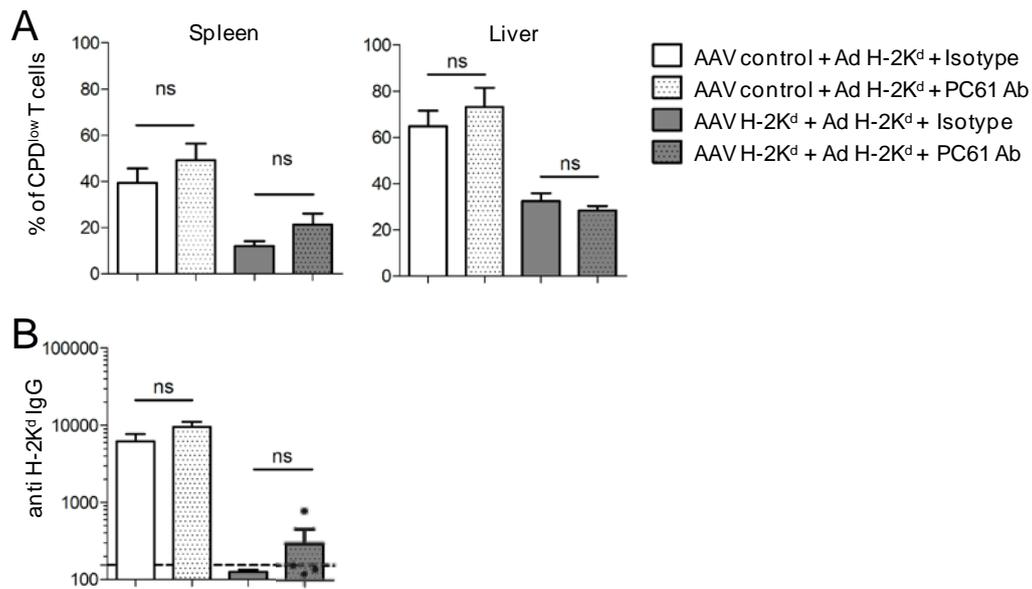
## Supplementary Data



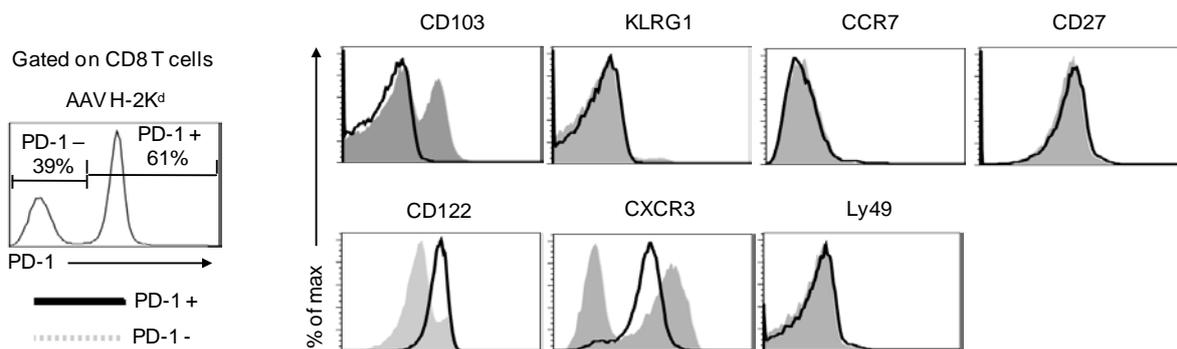
**Figure S1. Plasma levels of AST/ALT.** 8 weeks old C57Bl/6 mice received a single injection of AAV H-2K<sup>d</sup> ( $1.2 \times 10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup>, *i.v.*). Plasma samples were collected 2 and 4 weeks after for dosage of AST/ALT (n=4). Histograms represent the mean ( $\pm$  s.e.m).



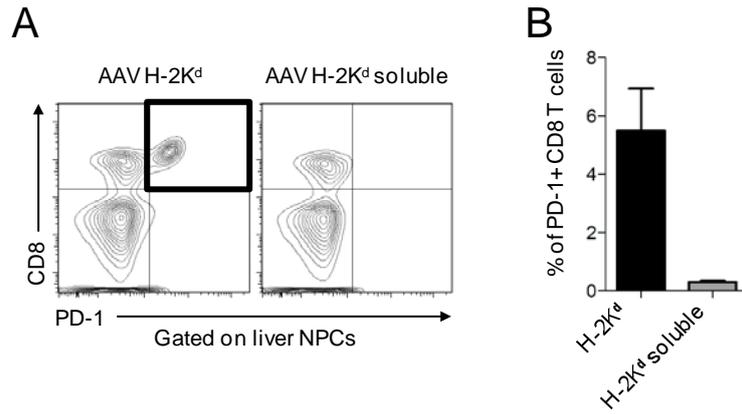
**Figure S2. Control of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg depletion.** Naive C57Bl/6 mice were injected with anti-CD25 antibodies (clone PC61, 250  $\mu$ g per injection at day -5 and -2 of end of experiment, *i.p.*). Splenocytes and liver NPCs were harvested and stained for analysis of CD4<sup>+</sup> Treg frequencies. (A) Representative CD25 and FoxP3 co-staining (gated on CD4<sup>+</sup> T cells). (B) Frequencies of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg were reported on histograms (n=3). Histograms represent the mean ( $\pm$  s.e.m).



**Figure S3. Effect of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg depletion on H-2K<sup>d</sup> specific immune response.** Two weeks after AAV control or AAV H-2K<sup>d</sup> injection ( $1.2 \times 10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup>, *i.v.*), CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs were depleted by injections of anti-CD25 antibodies (clone PC61, 250  $\mu$ g per injection on day -5, -2 and -1 of Ad vaccination, or isotype) and mice were vaccinated against H-2K<sup>d</sup> (Ad H-2K<sup>d</sup>,  $1.6 \times 10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup>, *i.p.*). (A) Two weeks later, splenocytes and liver NPCs were isolated and co-cultured 96 hours in presence of syngenic APCs H-2K<sup>d</sup>+ for CPD proliferation assay. Frequencies of CPD<sup>low</sup> T cells were reported on histograms for each condition (n=4). (B) Serum were diluted (1:20 in PBS) and assayed for determination of anti H-2K<sup>d</sup> IgG levels by flow cytometry (n=4). Histograms represent the mean ( $\pm$  s.e.m). *p* values were calculated by Mann-Whitney U test, ns = no significance.



**Figure S4. Additional markers analyzed on PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells.** Four weeks after injection of AAV H-2K<sup>d</sup> ( $1.2 \times 10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup>, *i.v.*), liver NPCs were isolated and stained for phenotypic analysis of indicated molecules by flow cytometry on PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (gray histogram) or PD-1<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (black histogram) from the same mice (n=3). Representative results are shown.



**Figure S5. Expression of a soluble form of H-2K<sup>d</sup> in the liver does not induce PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells.** Four weeks after injection of AAV H-2K<sup>d</sup> or AAV H-2K<sup>d</sup> sol, a mutant soluble version of H-2K<sup>d</sup>, deleted of its transmembrane domain ( $1.2 \times 10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup>, *i.v.*), liver NPCs were isolated and stained for FACS analysis. (A) Representative PD-1 and CD8 co-staining for liver NPCs. (B) Frequencies of hepatic PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells 4 weeks after AAV injection (n=3). Histograms represent the mean ( $\pm$  s.e.m).

# Discussion

## Discussion

### I- L'expression d'alloantigènes dans le foie est une stratégie qui induit la tolérance en transplantation chez la souris

#### 1- La tolérance allogénique a été observée dans différents modèles de greffe

Le projet élaboré avait pour objectif original de démontrer la possibilité d'induire l'expression d'une molécule de CMH I allogénique dans le foie de souris naïves afin d'améliorer la survie de greffe. Le laboratoire disposait d'une forte expertise dans les stratégies de transfert de gène *in vivo* dans le foie et notamment pour la thérapie génique des hépatopathies héréditaires, ce qui a permis de développer des vecteurs de transfert de gène AAV ciblant spécifiquement les cellules hépatiques et principalement les hépatocytes. L'injection d'une forte dose de vecteur scAAV 2/8mTTR H-2K<sup>d</sup> ( $1.10^{12}$  vg.kg<sup>-1</sup>) par voie intraveineuse induit une expression forte et stable au cours du temps dans le foie de souris C57Bl/6 (H-2b) naïves et immunocompétentes. H-2K<sup>d</sup> est exprimé à la membrane de plus de 90% des hépatocytes. Des résultats similaires ont été obtenus après injection d'un vecteur AAV H-2K<sup>b</sup> (AAV 2/8  $\alpha$ -1hAAT/ApoE H-2K<sup>b</sup>), permettant l'expression du transgène par l'ensemble des hépatocytes de souris B10.BR (H-2k). Ces résultats démontrent conjointement la possibilité d'exprimer une molécule allogénique de CMH I à long terme dans le foie alors qu'elles sont majoritairement impliquées dans l'alloreconnaissance et le rejet de greffe (c.f. Introduction Partie 1.II.3).

L'expression hépatique de H-2K<sup>b</sup> permet d'induire la survie à long terme (à plus de 100 jours) de greffe de peau de souris H-2k transgéniques et exprimant constitutivement H-2K<sup>b</sup> (souris 178.3) (Cunningham et al., 2013). Nos travaux démontrent qu'il est même possible d'étendre cette tolérance induite à des combinaisons d'haplotypes H-2 différentes (H-2d chez H-2b) dans un modèle de greffe d'îlots pancréatiques chez la souris. Ces résultats sont cependant dépendants du modèle de greffe utilisé, et des greffes de peau (résultats non présentés et (Cunningham et al., 2013) ou de cœur (Cunningham et al., 2013) de souris donneuses d'haplotypes H-2 différents sont rejetées. L'utilisation de la greffe d'îlots pancréatiques chez la souris a probablement contribué à la réussite de nos expériences. On peut évoquer 3 raisons :

(1) L'injection de STZ combinée avec l'hyperglycémie résultante du diabète provoque une lymphopénie (sang et rate), ainsi qu'une augmentation de la fréquence de  $L_{Treg}$  dans le sang, dépendamment de plus hauts niveaux de  $TGF\beta$ , et suffisante pour retarder le rejet de greffe d'îlots pancréatiques ou de peau de souris d'haplotypes H-2 différents (Muller et al., 2011). On peut donc se demander si l'injection de STZ favorise l'induction de mécanismes de tolérance spécifiques des alloantigènes du donneur.

(2) Les mécanismes immuns de rejet sont très dépendants du type de greffe réalisée. La tolérance est plus difficile à induire dans des modèles de greffes de cœur et de peau chez la souris. Les greffes de peau chez la souris naïve sont rejetées plus rapidement (après environ 2 semaines) que les greffes d'îlots pancréatiques, dans des combinaisons donneur-receveur identiques et au laboratoire.

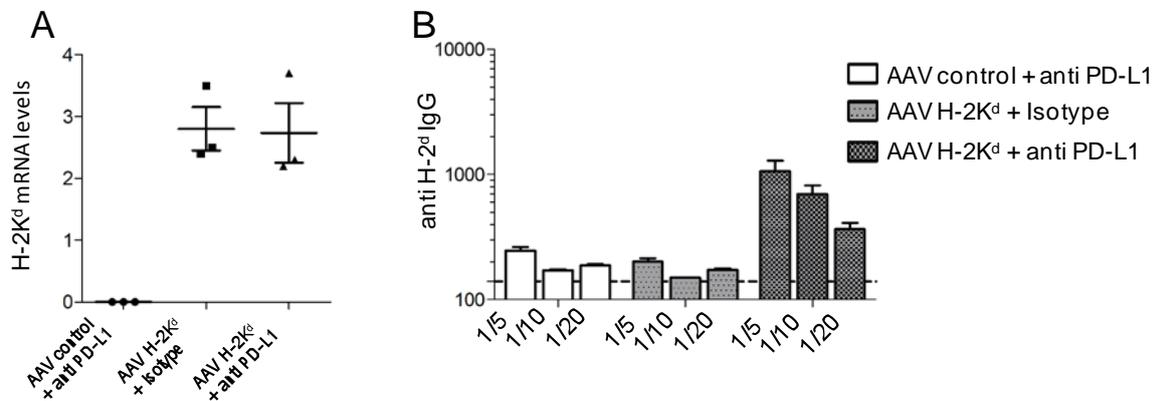
(3) En exprimant H-2K<sup>d</sup> dans le foie de souris C57Bl/6 nous avons démontré l'émergence de  $L_{Treg}$  CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'alloantigène. Or, le rejet d'allogreffes d'îlots pancréatiques de souris donneuses Balb/c chez la souris C57Bl/6 est particulièrement sensible à la présence de  $L_T$  CD8<sup>+</sup> reconnaissant directement les alloantigènes. La survie des greffons chez la souris naïve est largement prolongée en absence de  $L_T$  CD8<sup>+</sup>. La présence de  $L_{TH}$  accentue seulement le rejet mais les  $L_T$  CD4<sup>+</sup> seuls ne peuvent le provoquer (Makhlouf et al., 2003). En revanche, les  $L_T$  CD4<sup>+</sup> sont nécessaires et même suffisants pour induire le rejet d'allogreffes de cœur (Pietra et al., 2000) ou de peau (Rosenberg et al., 1987). La stratégie de transfert d'un CMH I allogénique n'a peut-être pas d'effets régulateurs suffisants sur les  $L_T$  CD4<sup>+</sup> allospécifiques pour retarder le rejet surtout dans des modèles de rejet hautement dépendants des  $L_T$  CD4<sup>+</sup>. Des expériences de déplétion des  $L_T$  CD4<sup>+</sup> combinées à l'injection d'AAV H-2K<sup>d</sup> pourraient favoriser la survie de greffe de cœur et de peau. Pour aller plus loin, on peut aussi se demander quels seraient les bénéfices d'une injection combinée ou seule d'un vecteur permettant le transfert d'une molécule de CMH II allogénique dans le foie sur la survie du greffon.

## 2- L'absence de DSA comme facteur facilitant la survie des greffons ?

En transplantation, la présence de DSA (anticorps spécifiques d'antigènes du donneur) chez le patient est hautement corrélée avec la perte de fonction de l'organe greffé. Ils sont aussi très impliqués dans les phases aiguës et chroniques de rejet du greffon (Smith and Colvin, 2012; Valenzuela and Reed, 2013). L'expression de H-2Kd dans le foie permet le développement de mécanismes de régulation de la réponse humorale de façon robuste et spécifique :

- absence de DSA malgré l'expression forte de l'antigène dans le foie
- absence de DSA chez ces animaux après vaccination (Ad H-2K<sup>d</sup>)
- absence de DSA chez des animaux AAV H-2K<sup>d</sup> chez qui nous avons observé une survie à plus de 100 jours à des greffes d'îlots pancréatiques (anti H-2d) et absence d'IgG anti H-2K<sup>d</sup> systématiquement chez des animaux traités et greffés.

La régulation de la réponse humorale spécifique d'antigènes exprimés dans le foie est méconnue. Des expériences préliminaires ont montré que le blocage de l'interaction PD-1 avec PD-L1 par administration d'un anticorps bloquant au moment de l'injection d'AAV H-2K<sup>d</sup> permettait de restaurer la sécrétion d'IgG spécifiques de l'antigène (Figure 12). H-2K<sup>d</sup> est toutefois toujours exprimé 2 semaines après le blocage (niveau d'ARNm H-2K<sup>d</sup> inchangé). Cette expérience n'a pour le moment pas été reproduite.



**Figure 12 :** Le blocage de PD-1/PD-L1 restaure la réponse humorale. Des souris C57Bl/6 sont injectées avec un Ac anti-PD-L1 (10F.9G2, 200 µg par injection, *i.p.*, n=3) ou Isotype (n=3, *i.p.*) 3 jours avant et le jour de l'administration d'AAV contrôle ou d'AAV H-2K<sup>d</sup> ( $1.10^{12}$  vg/kg), puis tous les 3 jours durant 2 semaines. (A) Après deux semaines, le niveau d'ARNm H-2K<sup>d</sup> extraits d'échantillons de foie est mesuré par RT-qPCR. Le niveau d'expression de H-2K<sup>d</sup> est inchangé malgré le blocage de PD-L1 chez des animaux AAV H-2K<sup>d</sup>. (B) Les DSA ont été titrés dans les sérums au même moment. Ils sont détectés lorsque la voie PD-1/PD-L1 est bloquée.

Des études chez la souris ont montré que les interactions PD-1/PD-L1 sont impliquées dans la régulation de la réponse humorale. Le blocage de PD-1/PD-L1 à l'aide d'anticorps accentue par exemple la réponse humorale après vaccination chez la souris, de façon dépendante de l'expansion de L<sub>TFH</sub> (Hams et al., 2011). Des souris avec le gène codant PD-1 invalidé développent de hauts niveaux d'auto-anticorps (Nishimura et al., 1998). Les L<sub>Treg</sub> ont aussi la capacité de réguler spécifiquement les L<sub>B</sub> autoréactifs exprimant PD-1 par engagement de PD-L1 (Gotot et al., 2012). Contrairement à ces différents résultats publiés, le blocage de la voie PD-1/PD-L1 chez des souris AAV H-2K<sup>d</sup> (avec expression de H-2K<sup>d</sup> établie) au moment de la vaccination (Ad H-2K<sup>d</sup>, *i.m.*) n'induit pas la production d'IgG anti H-2K<sup>d</sup> (résultats non montrés). La virulence de la réponse cellulaire cytotoxique observée chez ces animaux (dommages au niveau du tissu hépatique et forte infiltration leucocytaire – Figure 4 de l'article ; augmentation du niveau d'ARNm de la granzyme B et de la perforine dans des

échantillons de foie total - résultats non présentés) et l'élimination rapide des hépatocytes exprimant H-2K<sup>d</sup> (diminution importante du niveau d'ARNm H-2K<sup>d</sup> dans des échantillons de foie, Figure 4 de l'article) pourraient avoir interféré dans le développement d'une réponse humorale dans ce modèle.

Au sein de l'organisme, plusieurs voies de régulation de la différenciation des L<sub>B</sub> en plasmocytes (cellules sécrétrices d'anticorps) sont actuellement connues : absence de signaux « helper » apportés par les L<sub>TFH</sub> (principalement la sécrétion d'IL-21), présence de L<sub>T</sub> régulateurs localisés dans les follicules B (L<sub>TFR</sub>), élimination des L<sub>B</sub> par induction d'apoptose (voie Fas-FasL) dans les centres germinatifs (zone de maturation des L<sub>B</sub> en plasmocytes) (Goodnow et al., 2005). L'étude des mécanismes impliqués dans la régulation de la réponse humorale spécifique de H-2K<sup>d</sup> nécessite le développement de techniques d'identification et de caractérisation fonctionnelle des L<sub>B</sub> alloréactifs (à l'aide de polymères de molécules H-2K<sup>d</sup>, (Chen et al., 2013a; Panoskaltsis-Mortari et al., 2008) et des L<sub>TFH</sub> spécifiques de H-2K<sup>d</sup> (tétramères de classe II présentant un peptide immunogène décrit dérivé de H-2K<sup>d</sup>) chez des animaux vaccinés (Ad H-2K<sup>d</sup>) avec ou sans administration préalable d'AAV H-2K<sup>d</sup>. Cette étude a été initiée au cours d'un stage de Master 2 que j'ai encadré et nécessite davantage d'investigations. A notre connaissance, aucune étude ne s'est focalisée particulièrement sur les mécanismes de régulation de la réponse humorale spécifique d'antigènes dont l'expression est induite dans le foie.

### 3- La tolérance induite est spécifique, systémique et pourrait être « infectieuse »

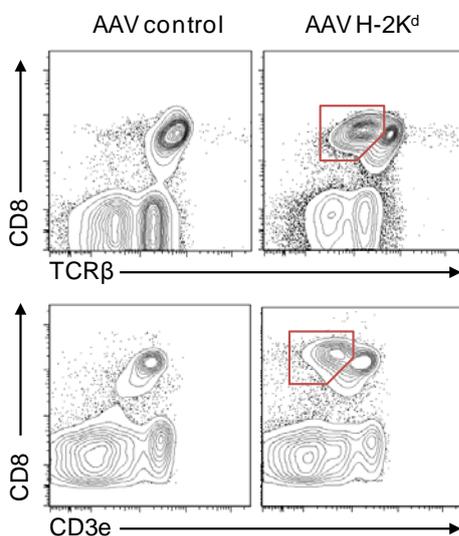
L'induction de tolérance à des allogreffes par expression de CMH I allogéniques H-2K<sup>d</sup> (et H-2K<sup>b</sup>, (Cunningham et al., 2013) dans le foie démontre la robustesse des phénomènes régulateurs induits et leur aspect systémique. Nos travaux nous ont permis en plus de montrer que l'expression de H-2K<sup>d</sup> dans le foie suffisait à inhiber la réponse cellulaire et humorale causée par une vaccination anti H-2K<sup>d</sup> (Ad H-2K<sup>d</sup>) (Figure 3 de l'article). De plus, les mécanismes de régulation sont spécifiques de l'antigène : la vaccination d'une souris AAV H-2K<sup>d</sup> contre un antigène tiers (Ad LacZ) provoque une réponse immunitaire comparable à celle observée chez une souris contrôle. Des greffes d'îlots pancréatiques de souris donneuses C3H (H-2k) sont rejetées aussi rapidement chez les animaux AAV H-2K<sup>d</sup> et contrôles. Les animaux traités restent donc pleinement immunocompétents. L'expression de H-2K<sup>d</sup> induite dans le foie permet une régulation systémique et spécifique ce qui est une des lacunes majeures des traitements immunosuppresseurs actuels.

Nous avons aussi démontré la possibilité de réguler des réponses allogéniques dans un modèle complet d'incompatibilité de CMH après injection d'AAV H-2K<sup>d</sup>. Il a déjà été démontré que l'administration par voie orale d'un seul antigène du donneur suffit à favoriser la survie à long terme d'allogreffes chez la souris (Niimi et al., 2000a, 2000b). Le potentiel tolérogène d'un seul alloantigène pouvant conférer un état de non réponse contre l'ensemble des alloantigènes du donneur de proche en proche est appelé en anglais « bystander suppression ». Les mécanismes de suppression dépendent de L<sub>Treg</sub> spécifiques, qui influencent négativement l'activation de L<sub>T</sub> alloréactifs de proche en proche (lorsqu'ils sont activés par la présentation d'autre alloantigènes par la même CPA on parle de « linked suppression » en anglais) et favorisent la différenciation en L<sub>Treg</sub>. Ce phénomène permet la propagation de la tolérance à un panel plus vaste d'antigènes du donneur (Davies et al., 1996). Dans la mesure où nous avons démontré l'émergence de populations de L<sub>Treg</sub> spécifiques de H-2K<sup>d</sup> dans notre modèle, il est tout à fait envisageable que de tels mécanismes participent à la prolongation de la survie des allogreffes d'îlots pancréatiques. L'importance de ces phénomènes de « linked suppression » dans la régulation allogénique par les L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> a d'ailleurs été démontrée par l'équipe de Bucy (Kapp et al., 2006). En activant des L<sub>T</sub> OT1 (spécifiques d'un peptide de l'ovalbumine restreint par un CMH I) en présence de CPAs exprimant l'ovalbumine et de TGFβ, environ 15% acquièrent des capacités suppressives et expriment FoxP3 (appelés L<sub>TS</sub> pour L<sub>T</sub> suppressives). *In vitro*, les L<sub>TS</sub> peuvent inhiber l'activation de L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> spécifiques de H-2K<sup>d</sup> (TCR75, peptide H-2K<sup>d</sup><sub>54-68</sub> présenté sur I-Ab) uniquement lorsque les CPAs co-expriment l'ovalbumine et H-2K<sup>d</sup>. *In vivo*, elles peuvent retarder le rejet dans un modèle de greffe hétérotopique de cœur chez la souris H-2b transgénique TCR75, à nouveau seulement si les cœurs proviennent de souris C57Bl/6 (H-2b) transgéniques et co-expriment H-2K<sup>d</sup> et l'ovalbumine. Dans ce modèle, l'activation des L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> TCR75 est limitée par inhibition des capacités de costimulation des CPAs du donneur par les L<sub>TS</sub>.

## II- Les $L_T$ $CD8^+$ hépatiques spécifiques de $H-2K^d$ : épuisés ou régulateurs ?

### 1- $L_T$ $CD8^+$ spécifiques de $H-2K^d$ sont régulateurs

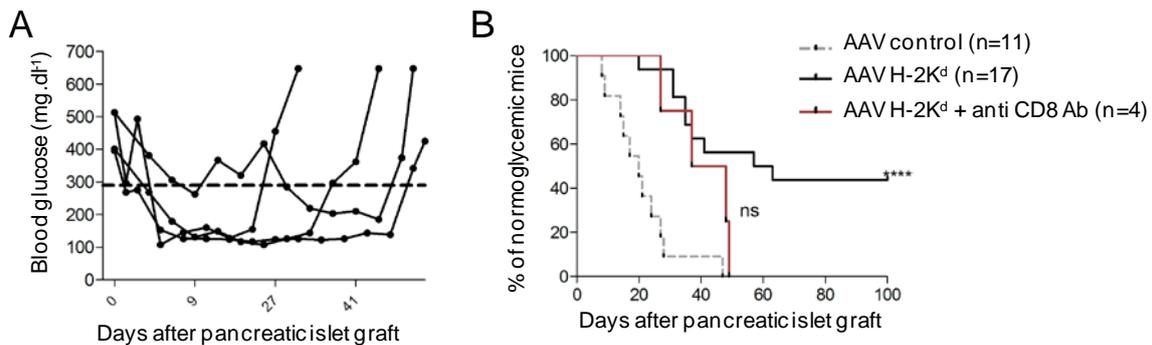
Nos travaux apportent des preuves expérimentales de l'acquisition de capacités suppressives par les  $L_T$   $CD8^+$  spécifiques de  $H-2K^d$  après transfert de gène dans le foie à l'aide d'un vecteur AAV. En effet, nous avons observé l'émergence d'une large population de  $L_T$   $CD8^+$  détectée uniquement dans le foie de souris AAV  $H-2K^d$  (non observé par injection d'AAV contrôle) et qui se distingue par la plus faible expression du complexe TCR-CD3 (Figure 13).



**Figure 13** : Les  $L_T$   $CD8^+$  hépatiques spécifiques de  $H-2K^d$  expriment plus faiblement le complexe TCR-CD3. Deux semaines après injection d'AAV  $H-2K^d$  ou contrôle ( $1.10^{12}$  vg/kg, *i.v.*), les NPCs sont isolés et co-marqués pour analyse de l'expression du TCR $\beta$  et CD8 ou CD3e et CD8 par cytométrie en flux. Les analyses sont représentatives.

Ce phénomène n'avait pas été mis en évidence par Cunningham et collaborateurs, probablement du fait de l'utilisation de l'immunohistochimie pour analyser les leucocytes présents dans le parenchyme hépatique (Cunningham et al., 2013). En plus de cette observation qui suggère d'emblée un engagement persistant du TCR et par conséquent une forte spécificité pour  $H-2K^d$  exprimé fortement par les hépatocytes dans le foie, ces cellules expriment de nombreux marqueurs d'activation précoces (CD69, NK1.1) et plus tardifs (CD44<sup>+</sup>, CD62L) et sont donc phénotypiquement catégorisées en cellules effectrices mémoires. Leur capacité à sécréter de l'IL-10 *in vitro* en réponse à l'expression spécifique de  $H-2K^d$  par des CPAs a rapidement suggéré leur potentialité à réguler la réponse immune. *In vitro*, les  $L_{Treg}$   $CD8^+$  inhibent la prolifération de  $L_T$  activés et *in vivo* le transfert adoptif de  $3.10^5$  cellules triées améliore la survie de greffes d'îlots pancréatiques de donneur Balb/c ( $H-2d$ ) chez la souris C57Bl/6 ( $H-2b$ ) naïve et immunocompétente. Nous avons aussi montré plus ré-

ce qui démontre que la déplétion des  $L_T$   $CD8^+$  totaux de souris AAV H-2K<sup>d</sup> avant la greffe d'îlots pancréatiques entraînait le rejet plus précoce (MS de 42,5 jours par rapport à 57 jours chez des animaux non déplétés) et empêchait la survie au long terme des greffons (Figure 14). Ces données démontrant l'importance de la présence des  $L_{Treg}$   $CD8^+$  dans l'induction de la survie au long terme doivent être confirmées au cours de nouveaux essais de greffes. La survie des greffons doit aussi être comparée à des animaux contrôles (AAV contrôle) déplétés en  $L_T$   $CD8^+$ .

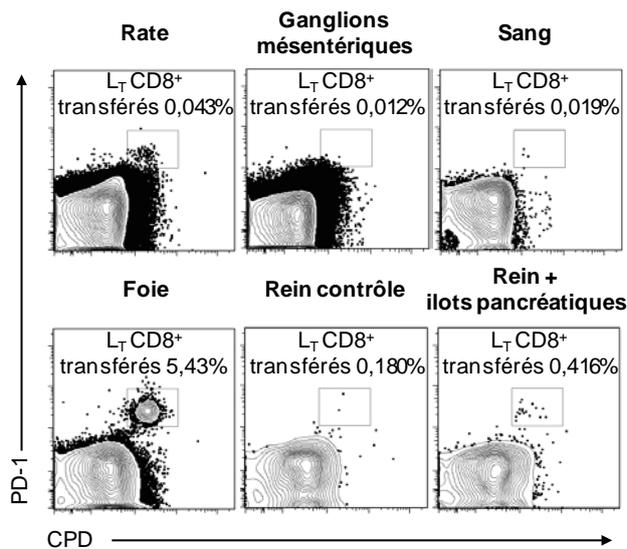


**Figure 14** : La déplétion des  $L_T$   $CD8^+$  empêche le développement de la survie à long terme. Des animaux AAV H-2K<sup>d</sup> diabétiques ont reçu des injections d'anti-CD8 (2.43, 200 $\mu$ g par injection, *i.v.*, n=4) 3 et 1 jours avant de recevoir une greffe d'îlots pancréatiques. (A) Suivi de la glycémie des 4 animaux au cours du temps. (B) Survie des animaux, en comparaison avec des animaux AAV contrôle et AAV H-2K<sup>d</sup>.

Ces résultats sont actuellement uniques et en contradiction avec la littérature. Les modèles d'expression de protéines spécifiquement dans le foie ont permis de mettre en évidence, pour le moment, l'importance des  $L_{Treg}$   $CD4^+$  et des mécanismes de tolérisation des  $L_T$   $CD8^+$  activés directement dans le foie. L'expression au long terme de protéines solubles (hFIX, hAAT, OVA, MBP, Insuline) ou cytosolique (GFP) dans le foie est corrélée avec la présence de  $L_{Treg}$   $CD4^+$  (c.f. Introduction Partie 3.III) alors que la présentation à la membrane des hépatocytes (mOVA, H-2K<sup>b</sup>) provoque la délétion clonale des  $L_T$   $CD8^+$  spécifiques, la dysfonction après activation ou l'épuisement (c.f. Introduction Partie 3.II.4).

Le transfert adoptif de  $3.10^5$   $L_{Treg}$   $CD8^+$  suffit à induire la survie à long terme de greffes d'îlots pancréatiques (Figure 6 de l'article). Nous pensons que l'efficacité observée du transfert adoptif de  $L_{Treg}$   $CD8^+$  sur la survie de greffons est liée à la forte spécificité antigénique de ces cellules, combinée à leur potentiel d'infiltration du parenchyme : expression de CXCR3 (Groom and Luster, 2011), profil d'activation (cellules effectrices mémoires) et absence d'expression de CD62L. Pour vérifier les capacités d'infiltration au niveau du greffon des  $L_{Treg}$   $CD8^+$ , nous réalisons actuellement des expériences visant à les localiser (par marquage au préalable au CPD, c.f. Article, Material and Methods) après transfert adoptif chez des animaux greffés. Douze heures après transfert adoptif, nous retrouvons une quantité impor-

tante de  $L_{Treg} CD8^+$  au niveau du foie de souris receveuses (environ  $5.10^4 L_{Treg} CD8^+$ ), une très faible proportion étant localisée au niveau des organes lymphoïdes (rate, ganglions mésentériques et rénaux), ce qui est en adéquation avec l'absence d'expression de CD62L. Enfin, même s'il est modeste, nous parvenons à détecter un enrichissement en  $L_{Treg} CD8^+$  au niveau du rein où sont localisés les îlots pancréatiques greffés par rapport au rein contralatéral (Figure 15). Globalement, l'infiltration observée à 12 heures est limitée et c'est pourquoi nous souhaitons répéter cette expérience à des temps plus tardifs (24 et 48 heures).



**Figure 15 :** Les  $L_{Treg} CD8^+$  transférés sont localisés dans le foie et détectés dans la zone de greffe.  $5.10^5 L_{Treg} CD8^+$  sont isolés puis transférés chez des souris C57Bl/6 naïves et diabétiques au moment de la greffe d'îlots pancréatique. 12 heures après, la rate, les ganglions, le sang, le foie et des échantillons de rein sont prélevés et la présence des cellules transférées analysée par cytométrie en flux. Les dotplots sont représentatifs de  $n=2$  souris et montrent un marquage CPD-PD-1 de  $L_T CD8^+$  présents dans les leucocytes totaux isolés.

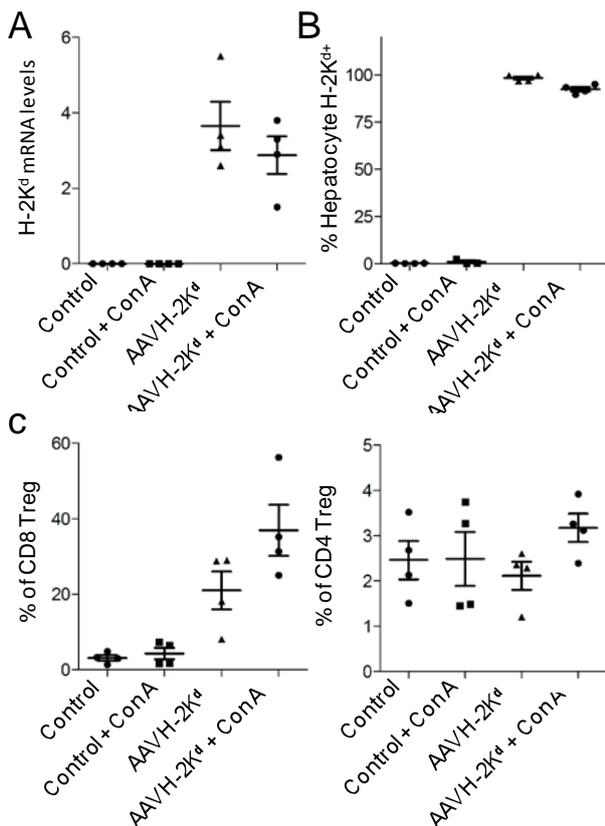
Bien que généralement associé à un rejet de greffe en clinique, une étude a montré le rôle crucial de  $L_{Treg} CD4^+$  infiltrant le greffon dans le maintien de la tolérance dans un modèle d'allogreffe rénale chez la souris. Ces  $L_{Treg}$  expriment des niveaux élevés de TGF $\beta$ , d'IL-10 et d'IFN $\gamma$  mais aussi de CXCR3 et de Blimp-1 (Hu et al., 2013). A ma connaissance de telles observations n'ont pas été faites au sujet des  $L_{Treg} CD8^+$ .

## 2- Caractérisation des $L_{Treg} CD8^+$ spécifiques de H-2K<sup>d</sup>

Nous avons évalué l'expression de nombreux marqueurs cellulaires par cytométrie, projet qui nous a permis d'établir une caractérisation assez précise des  $L_{Treg} CD8^+$  induits dans le foie. Certains marqueurs ont déjà été décrits comme étant exprimés par différentes populations de  $L_{Treg} CD8^+$  chez la souris. Il s'agit de marqueurs exprimés de façon homologue par les  $L_{Treg} CD4^+$  et  $CD8^+$  comme CD122, CTLA-4, GITR (résultat récent non montré) et l'absence d'expression de CD127 (Tableaux 5 et 6 ; (Wood and Sakaguchi, 2003). Tout comme la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (CD25) exprimée fortement par les  $L_{Treg} CD4^+$ , la chaîne beta, commune au récepteur à l'IL-2 et à l'IL-15 (CD122) semble être un marqueur important des  $L_{Treg} CD8^+$  (Li et al., 2014). Les fonctions suppressives des  $L_{Treg} CD8^+$  sont d'ailleurs fortement dépendantes de la présence d'IL-2 et d'IL-15 (Li et al., 2014). Au con-

traire, FoxP3 qui est un facteur de transcription clé dans le développement et la stabilisation des fonctions suppressives des  $L_{Treg} CD4^+$ , n'est cependant pas exprimé par les  $L_{Treg} CD8^+$  chez la souris (Tableaux 5 et 6). D'autres facteurs de transcription sont importants pour les fonctions suppressives des  $L_{Treg}$ . Nous avons mis en évidence l'expression de Helios, aussi exprimé par les  $L_{Treg} CD8^+$  restreint à Qa-1. Helios participe à leur survie et à la stabilisation de leurs fonctions suppressives (Kim et al., 2015). Il est relativement difficile de distinguer des populations précises de  $L_{Treg} CD8^+$  en fonction de l'expression de marqueurs principalement à cause de la diversité des modèles utilisés et de la précision des descriptions réalisées (Tableaux 5 et 6).

Au cours de notre étude, nous avons remarqué qu'après vaccination (Ad H-2K<sup>d</sup>, i.m.), le niveau d'expression de H-2K<sup>d</sup> dans le foie reste inchangé chez des animaux AAV H-2K<sup>d</sup> (Figure 3 de l'article). Par ailleurs, les  $L_{Treg} CD8^+$  pourraient aussi participer à la résolution de l'inflammation causée par l'injection de Concanavalin A (ConA). Chez la souris naïve, une telle injection provoque une hépatite aiguë associée à la destruction d'hépatocytes (Tiegs et al., 1992). Nous avons évalué les effets de la ConA injectée deux semaines après administration de l'AAV H-2K<sup>d</sup>. De façon surprenante, nous n'avons pas observé de perte d'expression de H-2k<sup>d</sup> (fréquence des hépatocytes H-2K<sup>d+</sup> inchangée, niveau d'ARNm comparables), suggérant un contrôle rapide de l'hépatite induite et une destruction plus modérée du tissu hépatique. Dans le foie, la fréquence des  $L_{Treg} CD8^+$  est en revanche largement augmentée, ce qui peut être associé à leur plus forte activation et prolifération en réponse à la ConA (Figure 16). Dans ce modèle, nous n'avons pas observé d'augmentation de la fréquence des  $L_{Treg} CD4^+$ .



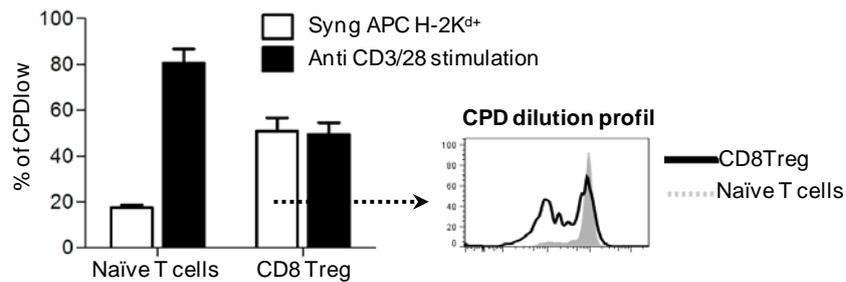
**Figure 16 :** L'hépatite aiguë induite par la ConA ne cause pas la perte d'expression de H-2K<sup>d</sup> dans le foie. Deux semaines après injection d'AAV H-2K<sup>d</sup> ou Contrôle ( $1.10^{12}$  vg/kg, *i.v.*, n=4), les souris C57Bl/6 reçoivent une injection de ConA (12mg/kg, *i.v.*) ou PBS. Les animaux sont euthanasiés 2 semaines après. (A) Le niveau d'ARNm H-2K<sup>d</sup> est mesuré par RT-qPCR, à partir d'échantillons de foie. Le niveau d'ARNm H-2K<sup>d</sup> reste fort après injection de ConA chez des souris AAV H-2K<sup>d</sup>. (B) La fréquence d'hépatocytes H-2K<sup>d</sup> positifs est au-delà de 90% dans les deux groupes d'animaux AAV H-2K<sup>d</sup>. (C) Après isolation des NPCs du foie, la fréquence des  $L_{Treg} CD8^+$  et des  $L_{Treg} CD4^+$  est évaluée. Seuls les  $L_{Treg} CD8^+$  sont augmentés dans le foie de souris AAV H-2K<sup>d</sup> en réponse à l'injection de ConA

La revue de la littérature met en évidence principalement l'origine thymique des  $L_{Treg}$   $CD8^+$  et une localisation préférentielle dans les organes lymphoïdes (Tableaux 5 et 6). Les  $L_{Treg}$   $CD8^+$  d'origine thymique sont impliqués majoritairement dans le contrôle de l'autoimmunité (Hu et al., 2004) et le maintien de l'homéostasie (Rifa'i et al., 2004). Il est possible que les  $L_{Treg}$   $CD8^+$  induits dans notre modèle aient un rôle protecteur et participent au maintien de l'intégrité du tissu hépatique, en limitant les réponses effectrices notamment lors d'inflammation.

Nous avons commencé à déterminer les mécanismes de suppression des  $L_{Treg}$   $CD8^+$  induits dans notre modèle. Le blocage du récepteur à l'IL-10 *in vitro* à l'aide d'un anticorps spécifique restaure en partie l'activité proliférative des  $L_T$  répondeurs (Figure 6 de l'article). La capacité à produire de l'IL-10 en réponse à l'engagement du TCR est accrue en présence d'IL-2 et d'IL-15. L'induction de la mort des  $L_T$  activés est un mécanisme majeur de suppression par les  $L_{Treg}$   $CD8^+$  décrit dans la littérature (c.f. Introduction Partie 2.IV.2). Il serait intéressant de vérifier si ce mécanisme participe à la tolérance dans notre modèle. Nous envisageons de réaliser des tests de cytotoxicité contre des  $L_T$  répondeurs *in vitro*. Les  $L_{Treg}$   $CD8^+$  expriment de nombreuses molécules inhibitrices. Certains mécanismes suppresseurs des  $L_{Treg}$   $CD4^+$  dépendent de l'expression de ces molécules : diminution de la présentation antigénique (interaction Lag3-CMH II) et de la costimulation par les CPAs (interaction CTLA-4-CD80/86). A notre connaissance, ces mécanismes de suppression n'ont pas été mis en évidence, pour le moment, chez des populations de  $L_{Treg}$   $CD8^+$  murines. Ils sont relativement importants en transplantation car ils permettent de limiter l'efficacité de la présentation d'alloantigènes par les CPAs du donneur. Ces mécanismes contribuent aussi à l'induction de  $L_{Treg}$  spécifiques d'antigènes du donneur (Huang et al., 2004; Wood and Sakaguchi, 2003).

### 3- Les $L_{Treg}$ $CD8^+$ spécifiques de H-2K<sup>d</sup>, proches voisines des $L_T$ $CD8^+$ épuisés ?

Dans notre modèle, les  $L_{Treg}$   $CD8^+$  induits dans le foie partagent de nombreux points communs avec les cellules épuisées en termes d'induction (forte expression de l'antigène, persistance de l'expression au cours du temps, environnement pro-toléro-gène hépatique) et de phénotype ( $L_T$  effecteurs mémoires, forte expression de PD-1, CTLA-4, Lag3, 2B4, faible expression de CD127). C'est en focalisant sur les différences (prolifération *in vitro* en réponse à l'alloantigène – Figure 17, expression de CD122) que nous avons investigué d'autres voies et notamment leur rôle dans la régulation.



**Figure 17 :** Les  $L_{Treg} CD8^+$  prolifèrent en présence de CPAs  $H-2K^{d+}$ . Les  $L_{Treg} CD8^+$  ou les  $L_T CD8^+ CD44^- PD-1^-$  ( $L_T$  naïfs) de foie de souris AAV  $H-2K^d$  sont isolés à l'ARIA puis cultivés 72h en présence de CPAs  $H-2K^{d+}$  ( $4 \cdot 10^4 L_T$  avec  $8 \cdot 10^3$  CPAs) ou d'Ac anti-CD3/28 ( $n=4$  par condition). La prolifération est évaluée par dilution du CPD. Les  $L_{Treg} CD8^+$ , contrairement aux  $L_T CD8^+$  naïfs, prolifèrent fortement en présence de CPAs  $H-2K^{d+}$ .

Au contraire, Cunningham et collaborateurs ont montré que des  $L_T CD8^+$  Des-TCR (spécifiques de  $H-2K^b$ ) injectés chez des animaux ayant reçu une injection d'AAV  $H-2K^b$  perdent rapidement leur capacité à sécréter de l'IFN $\gamma$ . L'épuisement des  $L_T CD8^+$  est un mécanisme majeur de régulation de la réponse immunitaire dans le foie (c.f. Introduction Partie 3.II.4). Ce phénomène est décrit dans des modèles d'activation de  $L_T CD8^+$  causée par un fort niveau d'expression d'antigènes par les hépatocytes. Il a aussi été décrit après induction de l'expression de l'ovalbumine à la membrane des hépatocytes par transfert de gène à l'aide d'un vecteur AAV mOVA (Tay et al., 2014). Dans ce modèle de transfert adoptif, les  $L_T CD8^+$  spécifiques de l'ovalbumine deviennent fonctionnellement épuisés (faible prolifération, absence de cytotoxicité, absence de sécrétion d'IFN $\gamma$ ) et expriment de forts niveaux de PD-1. Ces résultats ne concordent pas avec nos observations malgré des approches de transfert de gène comparables (forte expression à la membrane des hépatocytes de  $H-2K^b$  ou mOVA après transfert de gène à l'aide de vecteurs AAV). La différence majeure résulte des protocoles expérimentaux utilisés pour caractériser fonctionnellement et phénotypiquement les  $L_T CD8^+$  spécifiques : analyse du phénotype et de la fonction *in vitro* après transfert adoptif de  $L_T$  Des-TCR (spécifiques de  $H-2K^b$ ) ou de  $L_T$  OTI (spécifiques d'un peptide de l'Ova présenté sur un CMH I). Ces modèles ont l'avantage d'être très spécifiques mais ils ne reflètent pas le statut immunologique des souris et ils ne caractérisent pas le développement de la réponse immunologique des animaux transduits avec les AAV. Nos travaux se focalisent sur la réponse des  $L_T$  dans le foie suite à l'induction de l'expression de  $H-2K^d$ .

Les  $L_{Treg} CD8^+$  spécifiques de  $H-2K^d$  expriment aussi le facteur de transcription Blimp-1 (résultats non montrés), facteur de transcription majeur impliqué dans l'épuisement des  $L_T CD8^+$  lors d'infections chroniques virales (Shin et al., 2009). Blimp-1 est aussi impliqué dans le maintien de l'homéostasie des  $L_T$  et il est nécessaire à la différenciation des  $L_T CD8^+$  en CTL et en cellules mémoires (Martins and Calame, 2008). Il est aussi exprimé par les  $L_{Treg}$

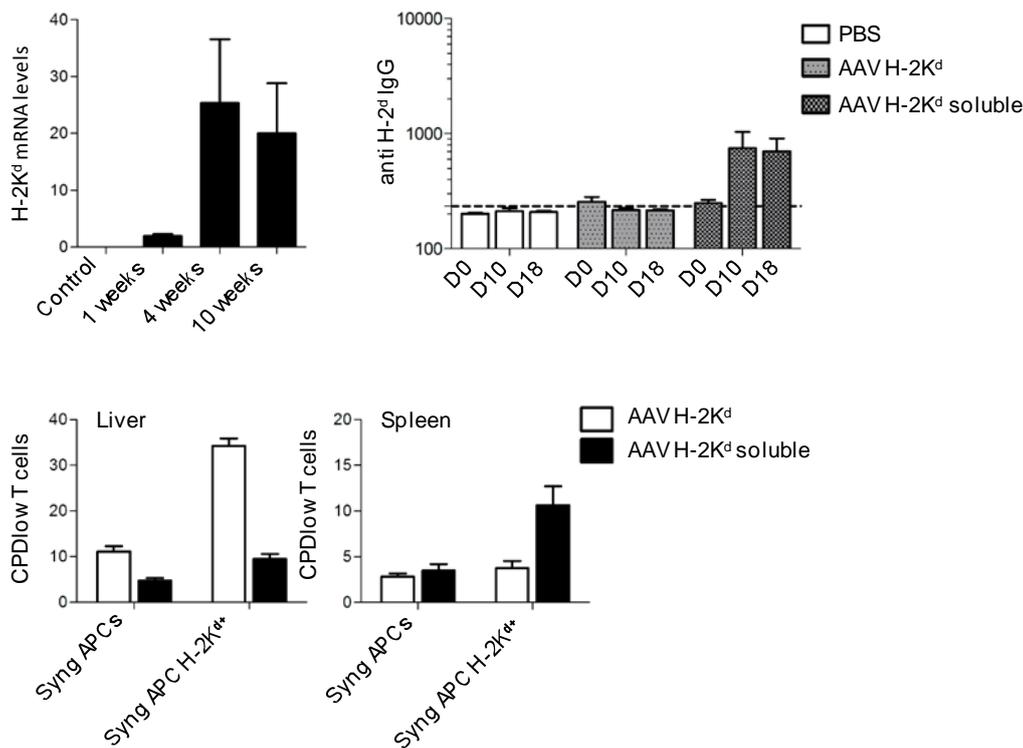
CD4<sup>+</sup> effecteurs et est requis pour la production d'IL-10 (Cretney et al., 2011). Lors d'infections chroniques virales, il est exprimé par les L<sub>TH1</sub> spécifiques du virus et il entraîne leur sécrétion d'IL-10 (Parish et al., 2014). Il serait intéressant de vérifier l'implication de Blimp-1 dans la production d'IL-10 par les L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> que nous décrivons. L'induction de Blimp-1 pourrait alors être un élément clé dans l'orientation préférentielle des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> en cellules régulatrices dans le foie. En accord avec la littérature citée précédemment, ce mécanisme favoriserait la protection tissulaire plutôt que l'élimination des cellules exprimant H-2K<sup>d</sup>, (la totalité des hépatocytes) permettant d'éviter la perte des fonctions hépatiques.

### III- Importance de l'expression de H-2K<sup>d</sup> à la membrane des hépatocytes dans l'induction des L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup>

Au cours du projet, nous avons développé un second vecteur AAV codant pour une version soluble de H-2K<sup>d</sup> (AAV H-2K<sup>d</sup> soluble - la séquence codant le domaine transmembranaire a été supprimée par des techniques de biologie moléculaire). L'injection de la même dose d'AAV H-2K<sup>d</sup> soluble permet une expression à long terme de l'antigène dans le foie (observé jusqu'à 10 semaines) (Figure 18). En revanche, nous avons détecté des IgG spécifiques de H-2K<sup>d</sup> dans le sérum des animaux (Figure 18), bien que le titre en IgG soit nettement plus faible que ce qu'on observe lors d'une immunisation par injection intramusculaire d'Ad H-2K<sup>d</sup> (résultat non montré). La réponse des L<sub>T</sub> est différente lors de stimulation *in vitro* (c.f. article, Material and Methods) : les L<sub>T</sub> hépatiques prolifèrent faiblement en présence de CPAs exprimant H-2K<sup>d</sup> et en comparaison avec des L<sub>T</sub> isolés de souris exprimant la forme membranaire de l'antigène. Dans la rate en revanche, une part des L<sub>T</sub> prolifèrent *in vitro* ce qui n'est pas le cas quand c'est la forme membranaire de l'antigène qui est exprimée (Figure 18). Nous avons développé en parallèle des modèles de rejet tumoraux d'hépatomes murins consistant à injecter directement dans le foie, et via la veine porte, des cellules tumorales Hepa 1.6 (d'origine C57L/J, H-2b) que nous avons modifié pour exprimer H-2K<sup>d</sup> (Hepa 1.6 K<sup>d</sup>). Les cellules Hepa 1.6 K<sup>d</sup> sont rapidement éliminées après injection chez la souris naïve mais elles entraînent le développement d'hépatomes chez les souris AAV H-2K<sup>d</sup> (en accord avec la prolongation de survie d'allogreffe). En revanche, lorsque c'est la forme soluble qui est exprimée, les cellules Hepa 1.6K<sup>d</sup> sont rejetées (absence d'hépatome ; Tableau 7).

	Injection intra-portale de cellules Hepa 1.6	Injection intra-portale de cellules Hepa 1.6 H-2K <sup>d</sup>
PBS	6/7	0/9 (100% de rejet)
AAV H-2K <sup>d</sup>	3/3	10/10 (0% de rejet)
AAV H-2K <sup>d</sup> soluble	4/4	0/4 (100% de rejet)

**Tableau 7** : Ratios des animaux développant un hépatome, en fonction du type de cellules tumorales injectées ou de l'expression hépatique de H-2K<sup>d</sup>

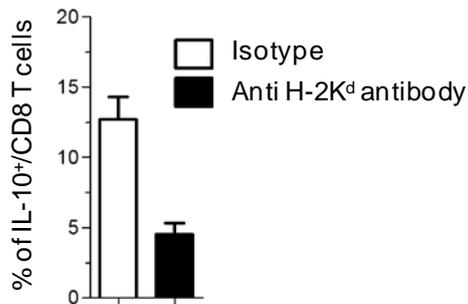


**Figure 18 :** L'injection d'AAV H-2K<sup>d</sup> soluble entraîne une réponse spécifique H-2K<sup>d</sup>. (A) Niveau d'ARNm H-2K<sup>d</sup> dans des échantillons de foie après injection d'AAV H-2K<sup>d</sup> soluble (scAAV 2/8 mTTR H-2K<sup>d</sup> soluble,  $1.10^{12}$  vg/kg, *i.v.*, n=5 par groupe). (B) Détection de DSA dans le sérum d'animaux AAV H-2K<sup>d</sup> soluble (n=5) alors qu'ils ne sont pas détectés chez des animaux AAV H-2K<sup>d</sup> (n=5). (C) Après 72h de co-culture en présence de CPAs syng ou CPA syng H-2K<sup>d</sup> (ratio CPA :L<sub>T</sub> 1 :5), les L<sub>T</sub> hépatiques d'animaux AAV H-2K<sup>d</sup> soluble prolifèrent moins que ceux provenant d'animaux AAV H-2K<sup>d</sup>. L'inverse est observé pour les L<sub>T</sub> spléniques (n=4 par conditions).

Ces résultats montrent le développement d'une réponse spécifique de H-2K<sup>d</sup> qui, dans un contexte inflammatoire peut conduire au développement de l'immunité et au rejet de cellules exprimant l'alloantigène. Ils suggèrent aussi que le maintien de l'expression à long terme de H-2K<sup>d</sup> sous sa forme membranaire ou soluble implique des mécanismes de régulation différents. Ils ne confirment d'ailleurs pas les effets tolérogènes supposés de l'administration d'alloantigènes solubles du donneur chez le receveur en transplantation, comme ce qui a été, par exemple, observé lors d'injection intra-péritonéale de CMH I solubles favorisant la survie d'allogreffes cardiaques chez le rat (Behrens et al., 2001).

L'expression de la forme soluble de l'antigène n'induit pas l'expansion de L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> dans le foie (Figure S5 de l'article). Ce résultat suggère l'importance de l'interaction entre la molécule H-2K<sup>d</sup> exprimée à la membrane des hépatocytes et le complexe TCR-CD3 des L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> dans l'induction et la prolifération des L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> dans le foie. La reconnaissance directe des molécules de CMH allogéniques par les L<sub>T</sub> de receveur domine dans les phases de rejet aigu en transplantation. Elle est liée principalement à la forte fréquence de précurseurs de L<sub>T</sub> capables d'interagir directement avec des molécules de CMH du donneur en périphérie (*c.f.* Introduction Partie 1.II.3). La forte présence de tels précurseurs est un argu-

ment en faveur d'une spécificité directe des  $L_{Treg} CD8^+$  pour la molécule H-2K<sup>d</sup> dans notre modèle. De plus, *in vitro*, la stimulation des  $L_{Treg} CD8^+$  en présence de CPAs H-2K<sup>d</sup> et d'un anticorps anti H-2K<sup>d</sup> bloquant potentiellement l'engagement directe du TCR sur H-2K<sup>d</sup> diminue la fréquence des cellules répondeuses (diminution de la sécrétion de l'IL-10, Figure 19).



**Figure 19 :** Le blocage de H-2K<sup>d</sup> à la membrane des CPAs à l'aide d'un anticorps inhibe la sécrétion d'IL-10 par les  $L_T CD8^+$  hépatiques. Les  $L_T CD8^+$  isolés du foie de souris AAV H-2K<sup>d</sup> sont stimulés 48h en présence de CPAs H-2K<sup>d</sup>, d'IL-2/15 et d'Ac anti-H-2K<sup>d</sup> (SF1-1.1, 50µg/mL) ou Isotype. Après restimulation 6 heures en présence de PMA (50 ng/mL), Iono (100 ng/mL) et BD GolgiPlug, les  $L_T CD8^+ IL-10^+$  sont détectés par marquage intracellulaire de l'IL-10 et analysés en cytométrie en flux.

Ce résultat appuie fortement notre idée d'une reconnaissance préférentiellement directe et doit être reproduit. L'induction de  $L_{Treg} CD8^+$  avec une spécificité directe pour une molécule de CMH I du donneur en transplantation pourrait être un atout majeur dans l'amélioration de la survie de greffe. Les  $L_{Treg} CD8^+$  pourraient : (1) réguler des réponses allogéniques mises en places rapidement chez le receveur et dirigées contre les cellules du parenchyme et de l'endothélium, cibles principales des CTLs lors des phases de rejet ; (2) favoriser l'immunorégulation des  $L_T$  allospécifiques en inhibant la présentation des alloantigènes par les CPAs du donneur et favoriser la régulation et l'induction de nouveaux  $L_{Treg}$ .

#### IV- Du développement préclinique à l'utilisation chez l'homme

Nous avons démontré la possibilité d'améliorer significativement la survie d'allogreffes par expression d'une molécule de CMH I du donneur dans le foie du receveur, et ces résultats sont d'ailleurs reproduits en utilisant d'autres combinaisons d'incompatibilité H-2 (Cunningham et al., 2013). Le transfert de gène dans le foie à l'aide de vecteurs AAV a connu un récent succès dans le traitement de l'hémophilie B chez l'homme (Nathwani et al., 2011, 2014). Ces résultats cliniques très encourageants dans le traitement de maladies héréditaires, et les nombreuses études précliniques actuellement menées et élargissant le champ d'investigation à l'autoimmunité (Akbarpour et al., 2015; Lüth et al., 2008) confortent notre idée de l'intérêt du développement de telles stratégies en transplantation.

En parallèle, nous avons montré le fort potentiel régulateur de  $L_{Treg} CD8^+$  induits dans le foie. Actuellement en clinique, l'intérêt se porte sur l'utilisation de  $L_{Treg} CD4^+$ , que ce soit en transplantation (Wood and Sakaguchi, 2003) ou dans le traitement de l'autoimmunité (Bluestone et al., 2010). Les  $L_{Treg} CD8^+$  ont aussi un fort potentiel régulateur et leur utilisation apportent d'importants bénéfices dans des modèles précliniques en transplantation (Dai et al., 2010, 2014; Guillonnet et al., 2007). La question principale résulte surtout de l'intérêt d'utiliser des  $L_{Treg} CD8^+$  plutôt que leurs homologues  $CD4^+$ . Bien qu'une étude préclinique démontre leur plus forte activité dans la suppression du rejet d'allogreffe chez la souris (Dai et al., 2014), le manque de caractérisation et de compréhension des mécanismes de suppression des réactions allogéniques limite pour le moment la transposition en utilisation clinique chez l'homme.

La génération de  $L_{Treg} CD8^+$  telle que nous la décrivons dans nos travaux précliniques n'est pas immédiatement transposable en clinique. Il est encore prématuré de statuer sur l'avantage que peut constituer une telle induction de  $L_{Treg} CD8^+$  *in vivo* par transfert de gène, par rapport à des stratégies (très lourdes) d'expansion *ex vivo* telles que celles qui sont actuellement testées pour les  $L_{Treg} CD4^+$ . Du fait du très fort potentiel suppresseur des  $L_{Treg} CD8^+$ , nous pensons qu'il est très intéressant de poursuivre dans la caractérisation de ces cellules et de leur mode d'action. Il serait aussi important d'étudier l'applicabilité de notre stratégie d'induction de tolérance à d'autres conditions pour lesquelles l'allogénéité demeure une limitation, comme la greffe allogénique d'organes solides vascularisés, mais aussi de tissus ou de cellules souches. La thérapie cellulaire est en plein essor et elle ouvre la porte à de nouvelles approches cliniques : transplantation de cellules souches hématopoïétiques, thérapie cellulaire régénératrice, pour lesquelles l'utilisation de cellules allogéniques, sans recours à des traitements immunosuppresseurs au long cours serait un réel avantage.

## Bibliographie

- Abel, M., Sène, D., Pol, S., Bourlière, M., Poynard, T., Charlotte, F., Cacoub, P., and Caillat-Zucman, S. (2006). Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* *44*, 1607–1616.
- Akane, K., Kojima, S., Mak, T.W., Shiku, H., and Suzuki, H. (2016). CD8+CD122+CD49dlow regulatory T cells maintain T-cell homeostasis by killing activated T cells via Fas/FasL-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 2460–2465.
- Akbarpour, M., Goudy, K.S., Cantore, A., Russo, F., Sanvito, F., Naldini, L., Annoni, A., and Roncarolo, M.G. (2015). Insulin B chain 9-23 gene transfer to hepatocytes protects from type 1 diabetes by inducing Ag-specific FoxP3+ Tregs. *Sci. Transl. Med.* *7*, 289ra81.
- Alex Bishop, G., Bertolino, P.D., Bowen, D.G., and McCaughan, G.W. (2012). Tolerance in liver transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *26*, 73–84.
- Alexander-Miller, M.A., Derby, M.A., Sarin, A., Henkart, P.A., and Berzofsky, J.A. (1998). Supraoptimal peptide-major histocompatibility complex causes a decrease in bc1-2 levels and allows tumor necrosis factor alpha receptor II-mediated apoptosis of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *188*, 1391–1399.
- Allison, M. (2009). Genzyme backs Osiris, despite Prochymal flop. *Nat. Biotechnol.* *27*, 966–967.
- Ando, K., Guidotti, L.G., Cerny, A., Ishikawa, T., and Chisari, F.V. (1994). CTL access to tissue antigen is restricted in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *153*, 482–488.
- André, F., Chaput, N., Scharz, N.E.C., Flament, C., Aubert, N., Bernard, J., Lemonnier, F., Raposo, G., Escudier, B., Hsu, D.-H., et al. (2004). Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 2126–2136.
- Angelosanto, J.M., Blackburn, S.D., Crawford, A., and Wherry, E.J. (2012). Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection. *J. Virol.* *86*, 8161–8170.
- Annoni, A., Brown, B.D., Cantore, A., Sergi, L.S., Naldini, L., and Roncarolo, M.-G. (2009). In vivo delivery of a microRNA-regulated transgene induces antigen-specific regulatory T cells and promotes immunologic tolerance. *Blood* *114*, 5152–5161.
- Ashton-Chess, J., Giral, M., Brouard, S., and Souillou, J.-P. (2007). Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation. *Transplantation* *84*, 1215–1219.
- Auchincloss, H., Lee, R., Shea, S., Markowitz, J.S., Grusby, M.J., and Glimcher, L.H. (1993). The role of “indirect” recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 3373–3377.
- Bandyopadhyay, K., Marrero, I., and Kumar, V. (2016). NKT cell subsets as key participants in liver physiology and pathology. *Cell. Mol. Immunol.* *13*, 337–346.
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* *439*, 682–687.

- Barnes, M.J., Griseri, T., Johnson, A.M.F., Young, W., Powrie, F., and Izcue, A. (2013). CTLA-4 promotes Foxp3 induction and regulatory T cell accumulation in the intestinal lamina propria. *Mucosal Immunol.* 6, 324–334.
- Behrens, D., Lange, K., Fried, A., Yoo-Ott, K.A., Richter, K., Fändrich, F., Krönke, M., and Zavazava, N. (2001). Donor-derived soluble MHC antigens plus low-dose cyclosporine induce transplantation unresponsiveness independent of the thymus by down-regulating T cell-mediated alloresponses in a rat transplantation model. *Transplantation* 72, 1974–1982.
- Benham, H., Nel, H.J., Law, S.C., Mehdi, A.M., Street, S., Ramnoruth, N., Pahau, H., Lee, B.T., Ng, J., Brunck, M.E.G., et al. (2015). Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. *Sci. Transl. Med.* 7, 290ra87.
- Benseler, V., Warren, A., Vo, M., Holz, L.E., Tay, S.S., Le Couteur, D.G., Breen, E., Allison, A.C., van Rooijen, N., McGuffog, C., et al. (2011). Hepatocyte entry leads to degradation of autoreactive CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16735–16740.
- Bertolino, P., Heath, W.R., Hardy, C.L., Morahan, G., and Miller, J.F. (1995). Peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells in transgenic mice expressing H-2Kb in the liver. *Eur. J. Immunol.* 25, 1932–1942.
- Bertolino, P., Trescol-Biémont, M.C., and Rabourdin-Combe, C. (1998). Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur. J. Immunol.* 28, 221–236.
- Bertolino, P., Trescol-Biémont, M.C., Thomas, J., Fazekas de St Groth, B., Pihlgren, M., Marvel, J., and Rabourdin-Combe, C. (1999). Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance. *Int. Immunol.* 11, 1225–1238.
- Bertolino, P., Bowen, D.G., McCaughan, G.W., and Fazekas de St Groth, B. (2001). Antigen-specific primary activation of CD8+ T cells within the liver. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 166, 5430–5438.
- Billingham, R.E., Brent, L., and Medawar, P.B. (2010). “Actively acquired tolerance” of foreign cells. 1953. 5–8.
- Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A.A., and Wherry, E.J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* 10, 29–37.
- Blackburn, S.D., Crawford, A., Shin, H., Polley, A., Freeman, G.J., and Wherry, E.J. (2010). Tissue-Specific Differences in PD-1 and PD-L1 Expression during Chronic Viral Infection: Implications for CD8 T-Cell Exhaustion. *J. Virol.* 84, 2078–2089.
- Bluestone, J.A., and Abbas, A.K. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 253–257.
- Bluestone, J.A., Thomson, A.W., Shevach, E.M., and Weiner, H.L. (2007). What does the future hold for cell-based tolerogenic therapy? *Nat. Rev. Immunol.* 7, 650–654.
- Bluestone, J.A., Auchincloss, H., Nepom, G.T., Rotrosen, D., St Clair, E.W., and Turka, L.A. (2010). The Immune Tolerance Network at 10 years: tolerance research at the bedside. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 797–803.
- Boor, P.P.C., Metselaar, H.J., Jonge, S. de, Mancham, S., van der Laan, L.J.W., and Kwekkeboom, J. (2011). Human plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ LAG-3+ Foxp3+ CTLA-4+ regulatory T cells that suppress allo-reactive memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 1663–1674.

- Bowen, D.G., Zen, M., Holz, L., Davis, T., McCaughan, G.W., and Bertolino, P. (2004). The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J. Clin. Invest.* *114*, 701–712.
- Breous, E., Somanathan, S., Vandenberghe, L.H., and Wilson, J.M. (2009). Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver. *612–621*.
- Brooks, D.G., McGavern, D.B., and Oldstone, M.B.A. (2006). Reprogramming of antiviral T cells prevents inactivation and restores T cell activity during persistent viral infection. *J. Clin. Invest.* *116*, 1675–1685.
- Callery, M.P., Ricordi, C., Scharp, D.W., Kamei, T., Swanson, C.J., Lacy, P.E., and Flye, M.W. (1989). Hepatic insufficiency after portacaval shunting is prevented by prior intraportal pancreatic islet autotransplantation. *Surgery* *106*, 257-265-266.
- Calne, R.Y., Sells, R.A., Pena, J.R., Davis, D.R., Millard, P.R., Herbertson, B.M., Binns, R.M., and Davies, D.A. (1969). Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* *223*, 472–476.
- Cantor, H.M., and Dumont, A.E. (1967). Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature* *215*, 744–745.
- Cao, O., Dobrzynski, E., Wang, L., Nayak, S., Mingle, B., Terhorst, C., and Herzog, R.W. (2007). Induction and role of regulatory CD4+CD25+ T cells in tolerance to the transgene product following hepatic in vivo gene transfer. *Blood* *110*, 1132–1140.
- Carambia, A., Freund, B., Schwinge, D., Heine, M., Laschtowitz, A., Huber, S., Wraith, D.C., Korn, T., Schramm, C., Lohse, A.W., et al. (2014). TGF- $\beta$ -dependent induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *J. Hepatol.* *61*, 594–599.
- Chappert, P., and Schwartz, R.H. (2010). Induction of T cell anergy: integration of environmental cues and infectious tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 552–559.
- Chattopadhyay, S., Theobald, M., Biggs, J., and Sherman, L.A. (1994). Conformational differences in major histocompatibility complex-peptide complexes can result in alloreactivity. *J. Exp. Med.* *179*, 213–219.
- Chen, J., Yin, H., Xu, J., Wang, Q., Edelblum, K.L., Sciammas, R., and Chong, A.S. (2013a). Reversing endogenous alloreactive B cell GC responses with anti-CD154 or CTLA-4Ig. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *13*, 2280–2292.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* *198*, 1875–1886.
- Chen, Z., Han, Y., Gu, Y., Liu, Y., Jiang, Z., Zhang, M., and Cao, X. (2013b). CD11c(high)CD8+ regulatory T cell feedback inhibits CD4 T cell immune response via Fas ligand-Fas pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 6145–6154.
- Chesneau, M., Michel, L., Degauque, N., and Brouard, S. (2013). Regulatory B cells and tolerance in transplantation: from animal models to human. *Front. Immunol.* *4*, 497.
- Choi, S., and Schwartz, R.H. (2007). Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. *Semin. Immunol.* *19*, 140–152.
- Chou, H.-S., Hsieh, C.-C., Charles, R., Wang, L., Wagner, T., Fung, J.J., Qian, S., and Lu, L.L. (2012). Myeloid-derived suppressor cells protect islet transplants by B7-H1 mediated enhancement of T regulatory cells. *Transplantation* *93*, 272–282.
- Cinqualbre, J. (2004). *Greffes d'organes (Issy-les-Moulineaux (Hauts-de-Seine): Masson)*.

- Colovai, A.I., Mirza, M., Vlad, G., Wang, S. u, Ho, E., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (2003). Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients. *Hum. Immunol.* *64*, 31–37.
- Conlon, T.M., Cole, J.L., Motallebzadeh, R., Harper, I., Callaghan, C.J., Bolton, E.M., Bradley, J.A., Saeb-Parsy, K., and Pettigrew, G.J. (2012). Unlinked Memory Helper Responses Promote Long-Lasting Humoral Alloimmunity. *J. Immunol.* *189*, 5703–5712.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* *204*, 1757–1764.
- Cretney, E., Xin, A., Shi, W., Minnich, M., Masson, F., Miasari, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Busslinger, M., Nutt, S.L., et al. (2011). The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *12*, 304–311.
- Crispe, I.N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 147–163.
- Cunningham, E.C., Tay, S.S., Wang, C., Rtshiladze, M., Wang, Z.Z., McGuffog, C., Cubitt, J., McCaughan, G.W., Alexander, I.E., Bertolino, P., et al. (2013). Gene therapy for tolerance: high-level expression of donor major histocompatibility complex in the liver overcomes naive and memory alloresponses to skin grafts. *Transplantation* *95*, 70–77.
- Dai, H., Wan, N., Zhang, S., Moore, Y., Wan, F., and Dai, Z. (2010). Cutting edge: programmed death-1 defines CD8+CD122+ T cells as regulatory versus memory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 803–807.
- Dai, Z., Zhang, S., Xie, Q., Wu, S., Su, J., Li, S., Xu, Y., and Li, X.C. (2014). Natural CD8+CD122+ T Cells Are More Potent in Suppression of Allograft Rejection Than CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *Am. J. Transplant.* *14*, 39–48.
- Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. (2007). Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 4022–4026.
- Davies, J.D., Leong, L.Y., Mellor, A., Cobbold, S.P., and Waldmann, H. (1996). T cell suppression in transplantation tolerance through linked recognition. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *156*, 3602–3607.
- Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., et al. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* *443*, 350–354.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* *204*, 1257–1265.
- Diehl, L., Schurich, A., Grochtmann, R., Hegenbarth, S., Chen, L., and Knolle, P.A. (2008). Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology. Baltim. Md* *47*, 296–305.
- Dierselhuis, M., and Goulmy, E. (2009). The relevance of minor histocompatibility antigens in solid organ transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* *14*, 419–425.
- Dikopoulos, N., Wegenka, U., Kröger, A., Hauser, H., Schirmbeck, R., and Reimann, J. (2004). Recently primed CD8+ T cells entering the liver induce hepatocytes to interact with naïve CD8+ T cells in the mouse. *Hepatology. Baltim. Md* *39*, 1256–1266.

- Dilek, N., Vuillefroy de Silly, R., Blancho, G., and Vanhove, B. (2012). Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Front. Immunol.* 3, 208.
- Dobrzynski, E., Mingozzi, F., Liu, Y.-L., Bendo, E., Cao, O., Wang, L., and Herzog, R.W. (2004). Induction of antigen-specific CD4+ T-cell anergy and deletion by in vivo viral gene transfer. *Blood* 104, 969–977.
- Dugast, A.-S., Haudebourg, T., Coulon, F., Heslan, M., Haspot, F., Poirier, N., Vuillefroy de Silly, R., Usal, C., Smit, H., Martinet, B., et al. (2008). Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 7898–7906.
- Dunham, R.M., Thapa, M., Velazquez, V.M., Elrod, E.J., Denning, T.L., Pulendran, B., and Grakoui, A. (2013). Hepatic stellate cells preferentially induce foxp3+ regulatory T cells by production of retinoic acid. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 2009–2016.
- Dunn, C., Brunetto, M., Reynolds, G., Christophides, T., Kennedy, P.T., Lampertico, P., Das, A., Lopes, A.R., Borrow, P., Williams, K., et al. (2007). Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *J. Exp. Med.* 204, 667–680.
- Durand, J., Huchet, V., Merieau, E., Usal, C., Chesneau, M., Remy, S., Heslan, M., Anegon, I., Cuturi, M.-C., Brouard, S., et al. (2015). Regulatory B Cells with a Partial Defect in CD40 Signaling and Overexpressing Granzyme B Transfer Allograft Tolerance in Rodents. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 195, 5035–5044.
- Earle, K.E., Tang, Q., Zhou, X., Liu, W., Zhu, S., Bonyhadi, M.L., and Bluestone, J.A. (2005). In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 115, 3–9.
- Ebrahimkhani, M.R., Mohar, I., and Crispe, I.N. (2011). Cross-presentation of antigen by diverse subsets of murine liver cells. *Hepatology. Baltim. Md* 54, 1379–1387.
- Ejrnaes, M., Filippi, C.M., Martinic, M.M., Ling, E.M., Togher, L.M., Crotty, S., and von Herrath, M.G. (2006). Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J. Exp. Med.* 203, 2461–2472.
- Erhardt, A., Wegscheid, C., Claass, B., Carambia, A., Herkel, J., Mittrücker, H.-W., Panzer, U., and Tiegs, G. (2011). CXCR3 deficiency exacerbates liver disease and abrogates tolerance in a mouse model of immune-mediated hepatitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 5284–5293.
- Euvrard, S., Morelon, E., Rostaing, L., Goffin, E., Brocard, A., Tromme, I., Broeders, N., del Marmol, V., Chatelet, V., Domp Martin, A., et al. (2012). Sirolimus and secondary skin-cancer prevention in kidney transplantation. *N. Engl. J. Med.* 367, 329–339.
- Ezzelarab, M.B., Lu, L., Guo, H., Zahorchak, A.F., Shufesky, W.F., Cooper, D.K.C., Morelli, A.E., and Thomson, A.W. (2016). Eomesodermin(lo) CTLA4(hi) Alloreactive CD8+ Memory T Cells Are Associated With Prolonged Renal Transplant Survival Induced by Regulatory Dendritic Cell Infusion in CTLA4 Immunoglobulin-Treated Nonhuman Primates. *Transplantation* 100, 91–102.
- Fantini, M.C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P.R., and Neurath, M.F. (2004). Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 5149–5153.
- Fejer, G., Freudenberg, M., Greber, U.F., and Gyory, I. (2011). Adenovirus-triggered innate signalling pathways. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 1, 279–288.

- Felix, N.J., and Allen, P.M. (2007). Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 942–953.
- Felix, N.J., Donermeyer, D.L., Horvath, S., Walters, J.J., Gross, M.L., Suri, A., and Allen, P.M. (2007). Alloreactive T cells respond specifically to multiple distinct peptide-MHC complexes. *Nat. Immunol.* 8, 388–397.
- Filaci, G., Fenoglio, D., Fravega, M., Ansaldo, G., Borgonovo, G., Traverso, P., Villaggio, B., Ferrera, A., Kunkl, A., Rizzi, M., et al. (2007). CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 4323–4334.
- First, M.R., Schroeder, T.J., Hurtubise, P.E., Mansour, M.E., Penn, I., Munda, R., Balistreri, W.F., Alexander, J.W., Melvin, D.B., and Fidler, J.P. (1989). Successful retreatment of allograft rejection with OKT3. *Transplantation* 47, 88–91.
- Fishman, J.A. (2007). Infection in solid-organ transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 357, 2601–2614.
- Fisicaro, P., Valdatta, C., Massari, M., Loggi, E., Biasini, E., Sacchelli, L., Cavallo, M.C., Sili- ni, E.M., Andreone, P., Missale, G., et al. (2010). Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 138, 682–693, 693-4.
- Flecken, T., Schmidt, N., Hild, S., Gostick, E., Drognitz, O., Zeiser, R., Schemmer, P., Bruns, H., Eiermann, T., Price, D.A., et al. (2014). Immunodominance and functional alterations of tumor-associated antigen-specific CD8+ T-cell responses in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 59, 1415–1426.
- Follenzi, A., Battaglia, M., Lombardo, A., Annoni, A., Roncarolo, M.G., and Naldini, L. (2004). Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. 3700–3709.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330–336.
- Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Sharpe, A.H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206, 3015–3029.
- Franco, L.M., Sun, B., Yang, X., Bird, A., Zhang, H., Schneider, A., Brown, T., Young, S.P., Clay, T.M., Amalfitano, A., et al. (2005). Evasion of immune responses to introduced human acid alpha-glucosidase by liver-restricted expression in glycogen storage disease type II. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 12, 876–884.
- Fröhlich, A., Kisielow, J., Schmitz, I., Freigang, S., Shamshiev, A.T., Weber, J., Marsland, B.J., Oxenius, A., and Kopf, M. (2009). IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science* 324, 1576–1580.
- Gallimore, A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A.C., Plückthun, A., Elliott, T., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. (1998). Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J. Exp. Med.* 187, 1383–1393.
- Garidou, L., Heydari, S., Gossa, S., and McGavern, D.B. (2012). Therapeutic blockade of transforming growth factor beta fails to promote clearance of a persistent viral infection. *J. Virol.* 86, 7060–7071.
- Giannoukakis, N., Phillips, B., Finegold, D., Harnaha, J., and Trucco, M. (2011). Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 34, 2026–2032.

- Golden-Mason, L., Palmer, B., Klarquist, J., Mengshol, J.A., Castelblanco, N., and Rosen, H.R. (2007). Upregulation of PD-1 Expression on Circulating and Intrahepatic Hepatitis C Virus-Specific CD8+ T Cells Associated with Reversible Immune Dysfunction. *J. Virol.* *81*, 9249–9258.
- Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., and Vinuesa, C.G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* *435*, 590–597.
- Gorer, P.A. (1948). The significance of studies with transplanted tumours. *Br. J. Cancer* *2*, 103–107.
- Gotot, J., Gottschalk, C., Leopold, S., Knolle, P.A., Yagita, H., Kurts, C., and Ludwig-Portugall, I. (2012). Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 10468–10473.
- de Graav, G.N., Dieterich, M., Hesselink, D.A., Boer, K., Clahsen-van Groningen, M.C., Kraaijeveld, R., Litjens, N.H.R., Bouamar, R., Vanderlocht, J., Tilanus, M., et al. (2015). Follicular T helper cells and humoral reactivity in kidney transplant patients. *Clin. Exp. Immunol.* *180*, 329–340.
- Graca, L., Cobbold, S.P., and Waldmann, H. (2002). Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J. Exp. Med.* *195*, 1641–1646.
- Grande, A.G., and Bevan, M.J. (1992). Single-residue changes in class I major histocompatibility complex molecules stimulate responses to self peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 2794–2798.
- Groom, J.R., and Luster, A.D. (2011). CXCR3 in T cell function. *Exp. Cell Res.* *317*, 620–631.
- Guillonneau, C., Hill, M., Hubert, F.-X., Chiffoleau, E., Hervé, C., Li, X.-L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Ménoret, S., et al. (2007). CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* *117*, 1096–1106.
- Hams, E., McCarron, M.J., Amu, S., Yagita, H., Azuma, M., Chen, L., and Fallon, P.G. (2011). Blockade of B7-H1 (programmed death ligand 1) enhances humoral immunity by positively regulating the generation of T follicular helper cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 5648–5655.
- Held, P.J., Kahan, B.D., Hunsicker, L.G., Liska, D., Wolfe, R.A., Port, F.K., Gaylin, D.S., Garcia, J.R., Agodoa, L.Y., and Krakauer, H. (1994). The impact of HLA mismatches on the survival of first cadaveric kidney transplants. *N. Engl. J. Med.* *331*, 765–770.
- Herkel, J., Jagemann, B., Wiegand, C., Lazaro, J.F.G., Lueth, S., Kanzler, S., Blessing, M., Schmitt, E., and Lohse, A.W. (2003). MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatol. Baltim. Md* *37*, 1079–1085.
- Hermonat, P.L., and Muzyczka, N. (1984). Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 6466–6470.
- Heymann, F., Peusquens, J., Ludwig-Portugall, I., Kohlhepp, M., Ergen, C., Niemietz, P., Martin, C., van Rooijen, N., Ochando, J.C., Randolph, G.J., et al. (2015). Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatol. Baltim. Md* *62*, 279–291.
- Höchst, B., Schildberg, F.A., Böttcher, J., Metzger, C., Huss, S., Türler, A., Overhaus, M., Knoblich, A., Schneider, B., Pantelis, D., et al. (2012). Liver sinusoidal endothelial

- cells contribute to CD8 T cell tolerance toward circulating carcinoembryonic antigen in mice. *Hepatology*. Baltim. Md 56, 1924–1933.
- Hoffmann, P., Eder, R., Kunz-Schughart, L.A., Andreesen, R., and Edinger, M. (2004). Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood* 104, 895–903.
- Hogquist, K.A., Baldwin, T.A., and Jameson, S.C. (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 772–782.
- Holz, L.E., Benseler, V., Bowen, D.G., Bouillet, P., Strasser, A., O'Reilly, L., d'Avigdor, W.M.H., Bishop, A.G., McCaughan, G.W., and Bertolino, P. (2008). Intrahepatic murine CD8 T-cell activation associates with a distinct phenotype leading to Bim-dependent death. *Gastroenterology* 135, 989–997.
- Honjo, K., Xu, X. yan, and Bucy, R.P. (2004). CD4+ T-cell receptor transgenic T cells alone can reject vascularized heart transplants through the indirect pathway of alloantigen recognition. *Transplantation* 77, 452–455.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.
- Horst, A.K., Neumann, K., Diehl, L., and Tiegs, G. (2016). Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. *Cell. Mol. Immunol.* 13, 277–292.
- Hsieh, C.-S., Lee, H.-M., and Lio, C.-W.J. (2012). Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 157–167.
- Hu, D., Ikizawa, K., Lu, L., Sanchirico, M.E., Shinohara, M.L., and Cantor, H. (2004). Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat. Immunol.* 5, 516–523.
- Hu, M., Wang, C., Zhang, G.Y., Saito, M., Wang, Y.M., Fernandez, M.A., Wang, Y., Wu, H., Hawthorne, W.J., Jones, C., et al. (2013). Infiltrating Foxp3(+) regulatory T cells from spontaneously tolerant kidney allografts demonstrate donor-specific tolerance. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 13, 2819–2830.
- Huang, C.-T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., et al. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21, 503–513.
- Hutchinson, J.A., Brem-Exner, B.G., Riquelme, P., Roelen, D., Schulze, M., Ivens, K., Grabensee, B., Witzke, O., Philipp, T., Renders, L., et al. (2008a). A cell-based approach to the minimization of immunosuppression in renal transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 21, 742–754.
- Hutchinson, J.A., Riquelme, P., Brem-Exner, B.G., Schulze, M., Matthäi, M., Renders, L., Kunzendorf, U., Geissler, E.K., and Fändrich, F. (2008b). Transplant acceptance-inducing cells as an immune-conditioning therapy in renal transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 21, 728–741.
- Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 36–49.
- Iwai, Y., Terawaki, S., Ikegawa, M., Okazaki, T., and Honjo, T. (2003). PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J. Exp. Med.* 198, 39–50.
- Jankowski, R.A., and Ildstad, S.T. (1997). Chimerism and tolerance: from freemartin cattle and neonatal mice to humans. *Hum. Immunol.* 52, 155–161.
- Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 165, 302–319.

- Jiang, S., Herrera, O., and Lechler, R.I. (2004). New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* *16*, 550–557.
- Jin, H.-T., Anderson, A.C., Tan, W.G., West, E.E., Ha, S.-J., Araki, K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Ahmed, R. (2010). Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 14733–14738.
- Joffre, O., Santolaria, T., Calise, D., Al Saati, T., Hudrisier, D., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P.M. (2008). Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat. Med.* *14*, 88–92.
- Joosten, S.A., van Meijgaarden, K.E., Savage, N.D.L., de Boer, T., Triebel, F., van der Wal, A., de Heer, E., Klein, M.R., Geluk, A., and Ottenhoff, T.H.M. (2007). Identification of a human CD8+ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 8029–8034.
- Kalekar, L.A., Schmiel, S.E., Nandiwada, S.L., Lam, W.Y., Barsness, L.O., Zhang, N., Stritesky, G.L., Malhotra, D., Pauken, K.E., Linehan, J.L., et al. (2016). CD4(+) T cell anergy prevents autoimmunity and generates regulatory T cell precursors. *Nat. Immunol.* *17*, 304–314.
- Kamada, N., and Wight, D.G. (1984). Antigen-specific immunosuppression induced by liver transplantation in the rat. *Transplantation* *38*, 217–221.
- Kamada, N., Brons, G., and Davies, H.S. (1980). Fully allogeneic liver grafting in rats induces a state of systemic nonreactivity to donor transplantation antigens. *Transplantation* *29*, 429–431.
- Kamada, N., Müller, G.H., Katami, M., Tamaki, T., Baguerizo, A., and Shinomiya, T. (1985). Sensitization of rats for rejection of heart allografts by heterotopic auxiliary liver grafting or administration of liver cell suspensions. *Transplantation* *40*, 106–108.
- Kapp, J.A., Honjo, K., Kapp, L.M., Xu, X. yan, Cozier, A., and Bucy, R.P. (2006). TCR transgenic CD8+ T cells activated in the presence of TGFbeta express FoxP3 and mediate linked suppression of primary immune responses and cardiac allograft rejection. *Int. Immunol.* *18*, 1549–1562.
- Kawai, T., Cosimi, A.B., Spitzer, T.R., Tolkoff-Rubin, N., Suthanthiran, M., Saidman, S.L., Shaffer, J., Preffer, F.I., Ding, R., Sharma, V., et al. (2008). HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N. Engl. J. Med.* *358*, 353–361.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 677–704.
- Kim, H.-J., and Cantor, H. (2011). Regulation of self-tolerance by Qa-1-restricted CD8(+) regulatory T cells. *Semin. Immunol.* *23*, 446–452.
- Kim, H.-J., Verbinnen, B., Tang, X., Lu, L., and Cantor, H. (2010). Inhibition of follicular T-helper cells by CD8(+) regulatory T cells is essential for self tolerance. *Nature* *467*, 328–332.
- Kim, H.-J., Barnitz, R.A., Kreslavsky, T., Brown, F.D., Moffett, H., Lemieux, M.E., Kaygusuz, Y., Meissner, T., Holderried, T.A.W., Chan, S., et al. (2015). Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science* *350*, 334–339.
- Knoechel, B., Lohr, J., Kahn, E., and Abbas, A.K. (2005). The link between lymphocyte deficiency and autoimmunity: roles of endogenous T and B lymphocytes in tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 21–26.
- Knolle, P.A. (2016). Staying local-antigen presentation in the liver. *Curr. Opin. Immunol.* *40*, 36–42.

- Knolle, P.A., Schmitt, E., Jin, S., Germann, T., Duchmann, R., Hegenbarth, S., Gerken, G., and Lohse, A.W. (1999). Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 116, 1428–1440.
- Kobashigawa, J.A., and Patel, J.K. (2006). Immunosuppression for heart transplantation: where are we now? *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 3, 203–212.
- Kruse, N., Neumann, K., Schrage, A., Derkow, K., Schott, E., Erben, U., Kühl, A., Loddenkemper, C., Zeitz, M., Hamann, A., et al. (2009). Priming of CD4+ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25<sup>low</sup> forkhead box protein 3- regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatology* 50, 1904–1913.
- Lang, M., Neumann, U., Kahl, A., Steinmüller, T., Settmacher, U., and Neuhaus, P. (2001). Long-term outcome of 27 patients after combined liver-kidney transplantation. *Transplant. Proc.* 33, 1440–1441.
- Larsen, C.P., Morris, P.J., and Austyn, J.M. (1990). Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J. Exp. Med.* 171, 307–314.
- Latchman, Y.E., Liang, S.C., Wu, Y., Chernova, T., Sobel, R.A., Klemm, M., Kuchroo, V.K., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2004). PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10691–10696.
- Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., et al. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet Lond. Engl.* 371, 1579–1586.
- Lee, R.S., Grusby, M.J., Glimcher, L.H., Winn, H.J., and Auchincloss, H. (1994). Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 179, 865–872.
- Lenschow, D.J., Zeng, Y., Thistlethwaite, J.R., Montag, A., Brady, W., Gibson, M.G., Linsley, P.S., and Bluestone, J.A. (1992). Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science* 257, 789–792.
- Lerret, N.M., and Luo, X. (2014). IL-15 Expanded CD8+CD122+ Cells: When Do They Suppress? *Am. J. Transplant.* 14, 7–8.
- Leventhal, J., Abecassis, M., Miller, J., Gallon, L., Ravindra, K., Tollerud, D.J., King, B., Elliott, M.J., Herzig, G., Herzig, R., et al. (2012). Chimerism and tolerance without GVHD or engraftment syndrome in HLA-mismatched combined kidney and hematopoietic stem cell transplantation. *Sci. Transl. Med.* 4, 124ra28.
- Levitsky, J. (2011). Operational tolerance: past lessons and future prospects. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* 17, 222–232.
- Li, S., Xie, Q., Zeng, Y., Zou, C., Liu, X., Wu, S., Deng, H., Xu, Y., Li, X.C., and Dai, Z. (2014). A naturally occurring CD8(+)CD122(+) T-cell subset as a memory-like Treg family. *Cell. Mol. Immunol.* 11, 326–331.
- Li, X.L., Ménoret, S., Bezie, S., Caron, L., Chabannes, D., Hill, M., Halary, F., Angin, M., Heslan, M., Usal, C., et al. (2010). Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 823–833.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., et al. (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic

- cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *180*, 5916–5926.
- Ligocki, A.J., and Niederkorn, J.Y. (2015). Advances on Non-CD4 + Foxp3+ T Regulatory Cells: CD8+, Type 1, and Double Negative T Regulatory Cells in Organ Transplantation. *Transplantation* *99*, 1553–1559.
- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H.G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P.A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat. Med.* *6*, 1348–1354.
- Limmer, A., Ohl, J., Wingender, G., Berg, M., Jüngerkes, F., Schumak, B., Djandji, D., Scholz, K., Klevenz, A., Hegenbarth, S., et al. (2005). Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur. J. Immunol.* *35*, 2970–2981.
- Lindahl, K.F., and Wilson, D.B. (1977). Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors. *J. Exp. Med.* *145*, 508–522.
- Liu, J., Chen, D., Nie, G.D., and Dai, Z. (2015). CD8(+)/CD122(+) T-Cells: A Newly Emerging Regulator with Central Memory Cell Phenotypes. *Front. Immunol.* *6*, 494.
- Liu, Y.-L., Mingozi, F., Rodríguez-Colón, S.M., Joseph, S., Dobrzynski, E., Suzuki, T., High, K.A., and Herzog, R.W. (2004). Therapeutic levels of factor IX expression using a muscle-specific promoter and adeno-associated virus serotype 1 vector. *Hum. Gene Ther.* *15*, 783–792.
- Liu, Z., Tugulea, S., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (1998). Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int. Immunol.* *10*, 775–783.
- Liu, Z., Fan, H., and Jiang, S. (2013). CD4(+) T-cell subsets in transplantation. *Immunol. Rev.* *252*, 183–191.
- Lohr, J., Knoechel, B., and Abbas, A.K. (2006). Regulatory T cells in the periphery. *Immunol. Rev.* *212*, 149–162.
- Lopes, A.R., Kellam, P., Das, A., Dunn, C., Kwan, A., Turner, J., Peppas, D., Gilson, R.J., Gehring, A., Bertolotti, A., et al. (2008). Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection. *J. Clin. Invest.* *118*, 1835–1845.
- Lu, L., and Cantor, H. (2008). Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells. *Cell. Mol. Immunol.* *5*, 401–406.
- Lu, L., Kim, H.-J., Werneck, M.B.F., and Cantor, H. (2008). Regulation of CD8+ regulatory T cells: Interruption of the NKG2A-Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 19420–19425.
- Lüth, S., Huber, S., Schramm, C., Buch, T., Zander, S., Stadelmann, C., Brück, W., Wraith, D.C., Herkel, J., and Lohse, A.W. (2008). Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. 3403–3410.
- MacPhee, P.J., Schmidt, E.E., and Groom, A.C. (1995). Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am. J. Physiol.* *269*, G692–698.
- Mahic, M., Henjum, K., Yaqub, S., Bjørnbeth, B.A., Torgersen, K.M., Taskén, K., and Aandahl, E.M. (2008). Generation of highly suppressive adaptive

- CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur. J. Immunol.* **38**, 640–646.
- Makhlouf, L., Yamada, A., Ito, T., Abdi, R., Ansari, M.J.I., Khuong, C.Q., Winn, H.J., Auchincloss, H., and Sayegh, M.H. (2003). Allorecognition and effector pathways of islet allograft rejection in normal versus nonobese diabetic mice. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **14**, 2168–2175.
- Marcén, R. (2009). Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection. *Drugs* **69**, 2227–2243.
- Martinez, X., Kruwel, H.T.C., Redmond, W.L., Trenney, R., Hunter, K., Rosen, H., Sarvetnick, N., Wicker, L.S., and Sherman, L.A. (2005). CD8+ T cell tolerance in nonobese diabetic mice is restored by insulin-dependent diabetes resistance alleles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 1677–1685.
- Martin-Orozco, N., Wang, Y.-H., Yagita, H., and Dong, C. (2006). Cutting Edge: Programmed death (PD) ligand-1/PD-1 interaction is required for CD8+ T cell tolerance to tissue antigens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 8291–8295.
- Martins, G., and Calame, K. (2008). Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 133–169.
- Matloubian, M., Concepcion, R.J., and Ahmed, R. (1994). CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J. Virol.* **68**, 8056–8063.
- McCarty, D.M., Monahan, P.E., and Samulski, R.J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *J. Virol.* **75**, 1248–1254.
- Mescher, A.L., and Junqueira, L.C.U. (2013). *Junqueira's basic histology: text and atlas* (New York, NY: McGraw-Hill Medical).
- Mingozzi, F., and Büning, H. (2015). Adeno-Associated Viral Vectors at the Frontier between Tolerance and Immunity. *Front. Immunol.* **6**, 120.
- Mingozzi, F., Liu, Y.-L., Dobrzynski, E., Kaufhold, A., Liu, J.H., Wang, Y., Arruda, V.R., High, K.A., and Herzog, R.W. (2003). Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer. *J. Clin. Invest.* **111**, 1347–1356.
- Molloy, M.J., Zhang, W., and Usherwood, E.J. (2011). Suppressive CD8+ T cells arise in the absence of CD4 help and compromise control of persistent virus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 6218–6226.
- Montes de Oca, M., Kumar, R., de Labastida Rivera, F., Amante, F.H., Sheel, M., Faleiro, R.J., Bunn, P.T., Best, S.E., Beattie, L., Ng, S.S., et al. (2016). Correction: Blimp-1-Dependent IL-10 Production by Tr1 Cells Regulates TNF-Mediated Tissue Pathology. *PLoS Pathog.* **12**, e1005460.
- Morahan, G., Brennan, F.E., Bhathal, P.S., Allison, J., Cox, K.O., and Miller, J.F. (1989). Expression in transgenic mice of class I histocompatibility antigens controlled by the metallothionein promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 3782–3786.
- Morris, G.P., Ni, P.P., and Allen, P.M. (2011). Alloreactivity is limited by the endogenous peptide repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3695–3700.
- Mount, J.D., Herzog, R.W., Tillson, D.M., Goodman, S.A., Robinson, N., McClelland, M.L., Bellinger, D., Nichols, T.C., Arruda, V.R., Lothrop, C.D., et al. (2002). Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood* **99**, 2670–2676.

- Muhanna, N., Horani, A., Doron, S., and Safadi, R. (2007). Lymphocyte-hepatic stellate cell proximity suggests a direct interaction. *Clin. Exp. Immunol.* *148*, 338–347.
- Mühlbauer, M., Fleck, M., Schütz, C., Weiss, T., Froh, M., Blank, C., Schölmerich, J., and Hellerbrand, C. (2006). PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J. Hepatol.* *45*, 520–528.
- Muller, Y.D., Golshayan, D., Ehrchiou, D., Wyss, J.C., Giovannoni, L., Meier, R., Serre-Beinier, V., Puga Yung, G., Morel, P., Bühler, L.H., et al. (2011). Immunosuppressive effects of streptozotocin-induced diabetes result in absolute lymphopenia and a relative increase of T regulatory cells. *Diabetes* *60*, 2331–2340.
- Mumprecht, S., Schürch, C., Schwaller, J., Solenthaler, M., and Ochsenbein, A.F. (2009). Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* *114*, 1528–1536.
- Najafian, N., Chitnis, T., Salama, A.D., Zhu, B., Benou, C., Yuan, X., Clarkson, M.R., Sayegh, M.H., and Khoury, S.J. (2003). Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J. Clin. Invest.* *112*, 1037–1048.
- Nakai, H., Herzog, R.W., Hagstrom, J.N., Walter, J., Kung, S.H., Yang, E.Y., Tai, S.J., Iwaki, Y., Kurtzman, G.J., Fisher, K.J., et al. (1998). Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of human blood coagulation factor IX into mouse liver. *Blood* *91*, 4600–4607.
- Nakamoto, N., Cho, H., Shaked, A., Olthoff, K., Valiga, M.E., Kaminski, M., Gostick, E., Price, D.A., Freeman, G.J., Wherry, E.J., et al. (2009). Synergistic Reversal of Intrahepatic HCV-Specific CD8 T Cell Exhaustion by Combined PD-1/CTLA-4 Blockade. *PLoS Pathog* *5*, e1000313.
- Nathwani, A.C., Tuddenham, E.G.D., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D.C., Chowdary, P., Riddell, A., Pie, A.J., Harrington, C., et al. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2357–2365.
- Nathwani, A.C., Reiss, U.M., Tuddenham, E.G.D., Rosales, C., Chowdary, P., McIntosh, J., Della Peruta, M., Lheriteau, E., Patel, N., Raj, D., et al. (2014). Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* *371*, 1994–2004.
- Niimi, M., Ikeda, Y., Shirasugi, N., Shatari, T., Takami, H., Kodaira, S., Matsumoto, K., Hamano, K., Esato, K., Hara, M., et al. (2000a). Oral delivery of alloantigen combined with non-depleting anti-CD4 monoclonal antibody induces indefinite survival of cardiac allografts and generates CD4(+) regulatory T cells. *Transplant. Proc.* *32*, 2035.
- Niimi, M., Witzke, O., Bushell, A., Hara, M., Morris, P.J., and Wood, K.J. (2000b). Nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody enhances the ability of oral alloantigen delivery to induce indefinite survival of cardiac allografts: oral tolerance to alloantigen. *Transplantation* *70*, 1524–1528.
- Nishimura, H., Minato, N., Nakano, T., and Honjo, T. (1998). Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int. Immunol.* *10*, 1563–1572.
- Odorizzi, P.M., Pauken, K.E., Paley, M.A., Sharpe, A., and Wherry, E.J. (2015). Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* *212*, 1125–1137.
- Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S. (2008). Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 10113–10118.

- Orlando, G., Hematti, P., Stratta, R.J., Burke, G.W., Di Cocco, P., Cocco, P.D., Pisani, F., Soker, S., and Wood, K. (2010). Clinical operational tolerance after renal transplantation: current status and future challenges. *Ann. Surg.* *252*, 915–928.
- Page, E.K., Dar, W.A., and Knechtle, S.J. (2012). Tolerogenic therapies in transplantation. *Front. Immunol.* *3*, 198.
- Paley, M.A., Kroy, D.C., Odorizzi, P.M., Johnnidis, J.B., Dolfi, D.V., Barnett, B.E., Bikoff, E.K., Robertson, E.J., Lauer, G.M., Reiner, S.L., et al. (2012). Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* *338*, 1220–1225.
- Panoskaltis-Mortari, A., Taylor, P.A., Riddle, M.J., Shlomchik, M.A., and Blazar, B.R. (2008). In situ identification of allospecific B cells using pentamers. *Blood* *111*, 3904–3905.
- Parish, I.A., and Heath, W.R. (2008). Too dangerous to ignore: self-tolerance and the control of ignorant autoreactive T cells. *Immunol. Cell Biol.* *86*, 146–152.
- Parish, I.A., Marshall, H.D., Staron, M.M., Lang, P.A., Brüstle, A., Chen, J.H., Cui, W., Tsui, Y.-C., Perry, C., Laidlaw, B.J., et al. (2014). Chronic viral infection promotes sustained Th1-derived immunoregulatory IL-10 via BLIMP-1. *J. Clin. Invest.* *124*, 3455–3468.
- Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., and Riley, J.L. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 9543–9553.
- Pascual, M., Theruvath, T., Kawai, T., Tolkoff-Rubin, N., and Cosimi, A.B. (2002). Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* *346*, 580–590.
- Passini, M.A., Bu, J., Fidler, J.A., Ziegler, R.J., Foley, J.W., Dodge, J.C., Yang, W.W., Clarke, J., Taksir, T.V., Griffiths, D.A., et al. (2007). Combination brain and systemic injections of AAV provide maximal functional and survival benefits in the Niemann-Pick mouse. *9505–9510*.
- Pelanda, R., and Torres, R.M. (2012). Central B-cell tolerance: where selection begins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a007146.
- Penaloza-MacMaster, P., Kamphorst, A.O., Wieland, A., Araki, K., Iyer, S.S., West, E.E., O'Mara, L., Yang, S., Konieczny, B.T., Sharpe, A.H., et al. (2014). Interplay between regulatory T cells and PD-1 in modulating T cell exhaustion and viral control during chronic LCMV infection. *J. Exp. Med.* *211*, 1905–1918.
- Peng, H., Wisse, E., and Tian, Z. (2016). Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cell. Mol. Immunol.* *13*, 328–336.
- Perez, V.L., Van Parijs, L., Biuckians, A., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Abbas, A.K. (1997). Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* *6*, 411–417.
- Picarda, E., Bézie, S., Venturi, V., Echasserieu, K., Mérieau, E., Delhumeau, A., Renaudin, K., Brouard, S., Bernardeau, K., Anegon, I., et al. (2014). MHC-derived allopeptide activates TCR-biased CD8+ Tregs and suppresses organ rejection. *J. Clin. Invest.* *124*, 2497–2512.
- Pietra, B.A., Wiseman, A., Bolwerk, A., Rizeq, M., and Gill, R.G. (2000). CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J. Clin. Invest.* *106*, 1003–1010.
- Poirier, N., Dilek, N., Mary, C., Ville, S., Coulon, F., Branchereau, J., Tillou, X., Charpy, V., Pengam, S., Nerriere-Daguin, V., et al. (2015). FR104, an antagonist anti-CD28

- monovalent fab' antibody, prevents alloimmunization and allows calcineurin inhibitor minimization in nonhuman primate renal allograft. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 15, 88–100.
- Quill, H., and Schwartz, R.H. (1987). Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 138, 3704–3712.
- Rana, A., Robles, S., Russo, M.J., Halazun, K.J., Woodland, D.C., Witkowski, P., Ratner, L.E., and Hardy, M.A. (2008). The combined organ effect: protection against rejection? *Ann. Surg.* 248, 871–879.
- Rasmussen, A., Davies, H.F., Jamieson, N.V., Evans, D.B., and Calne, R.Y. (1995). Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival. *Transplantation* 59, 919–921.
- Reignat, S., Webster, G.J.M., Brown, D., Ogg, G.S., King, A., Seneviratne, S.L., Dusheiko, G., Williams, R., Maini, M.K., and Bertoletti, A. (2002). Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J. Exp. Med.* 195, 1089–1101.
- Rifa'i, M., Kawamoto, Y., Nakashima, I., and Suzuki, H. (2004). Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J. Exp. Med.* 200, 1123–1134.
- Riley, J.L. (2009). PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol. Rev.* 229, 114–125.
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34, 2480–2488.
- Rosenberg, A.S., Mizuochi, T., Sharrow, S.O., and Singer, A. (1987). Phenotype, specificity, and function of T cell subsets and T cell interactions involved in skin allograft rejection. *J. Exp. Med.* 165, 1296–1315.
- Sagoo, P., Ali, N., Garg, G., Nestle, F.O., Lechler, R.I., and Lombardi, G. (2011). Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* 3, 83ra42.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 1151–1164.
- Scandling, J.D., Busque, S., Dejbakhsh-Jones, S., Benike, C., Sarwal, M., Millan, M.T., Shizuru, J.A., Lowsky, R., Engleman, E.G., and Strober, S. (2012). Tolerance and withdrawal of immunosuppressive drugs in patients given kidney and hematopoietic cell transplants. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 12, 1133–1145.
- Schmitt, E.G., and Williams, C.B. (2013). Generation and function of induced regulatory T cells. *Front. Immunol.* 4, 152.
- Schurich, A., Böttcher, J.P., Burgdorf, S., Penzler, P., Hegenbarth, S., Kern, M., Dolf, A., Endl, E., Schultze, J., Wiertz, E., et al. (2009). Distinct kinetics and dynamics of cross-presentation in liver sinusoidal endothelial cells compared to dendritic cells. *Hepatology. Baltim. Md* 50, 909–919.
- Schurich, A., Berg, M., Stabenow, D., Böttcher, J., Kern, M., Schild, H.-J., Kurts, C., Schulte, V., Burgdorf, S., Diehl, L., et al. (2010). Dynamic regulation of CD8 T cell toler-

- ance induction by liver sinusoidal endothelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *184*, 4107–4114.
- Schurich, A., Khanna, P., Lopes, A.R., Han, K.J., Peppas, D., Micco, L., Nebbia, G., Kennedy, P.T.F., Geretti, A.-M., Dusheiko, G., et al. (2011). Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection. *Hepatology* *53*, 1494–1503.
- Sharpe, A.H., Wherry, E.J., Ahmed, R., and Freeman, G.J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat. Immunol.* *8*, 239–245.
- Shi, Z., Okuno, Y., Rifa'i, M., Endharti, A.T., Akane, K., Isobe, K.-I., and Suzuki, H. (2009). Human CD8+CXCR3+ T cells have the same function as murine CD8+CD122+ Treg. *Eur. J. Immunol.* *39*, 2106–2119.
- Shin, H., and Wherry, E.J. (2007). CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 408–415.
- Shin, H., Blackburn, S.D., Intlekofer, A.M., Kao, C., Angelosanto, J.M., Reiner, S.L., and Wherry, E.J. (2009). A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* *31*, 309–320.
- Shreffler, D.C. (1974). Genetic fine structure of the H-2 gene complex. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* *29*, 83–100.
- Sivaganesh, S., Harper, S.J., Conlon, T.M., Callaghan, C.J., Saeb-Parsy, K., Negus, M.C., Motallebzadeh, R., Bolton, E.M., Bradley, J.A., and Pettigrew, G.J. (2013). Copresentation of intact and processed MHC alloantigen by recipient dendritic cells enables delivery of linked help to alloreactive CD8 T cells by indirect-pathway CD4 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *190*, 5829–5838.
- Smith, R.N., and Colvin, R.B. (2012). Chronic alloantibody mediated rejection. *Semin. Immunol.* *24*, 115–121.
- Snell, G.D. (1976). Recognition structures determined by the H-2 complex. *Transplant. Proc.* *8*, 147–156.
- Spencer, S.C., and Fabre, J.W. (1987). Bulk purification of a naturally occurring soluble form of RT1-A class I major histocompatibility complex antigens from DA rat liver, and studies of specific immunosuppression. *Transplantation* *44*, 141–148.
- Starzl, T.E., Tzakis, A., Makowka, L., Banner, B., Demetrius, A., Ramsey, G., Duquesnoy, R., and Griffin, M. (1987). The definition of ABO factors in transplantation: relation to other humoral antibody states. *Transplant. Proc.* *19*, 4492–4497.
- Starzl, T.E., Demetris, A.J., Trucco, M., Zeevi, A., Ramos, H., Terasaki, P., Rudert, W.A., Kocova, M., Ricordi, C., and Ildstad, S. (1993a). Chimerism and donor-specific non-reactivity 27 to 29 years after kidney allotransplantation. *Transplantation* *55*, 1272–1277.
- Starzl, T.E., Demetris, A.J., Trucco, M., Murase, N., Ricordi, C., Ildstad, S., Ramos, H., Todo, S., Tzakis, A., and Fung, J.J. (1993b). Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology* *17*, 1127–1152.
- Steger, U., Denecke, C., Sawitzki, B., Karim, M., Jones, N.D., and Wood, K.J. (2008). Exhaustive differentiation of alloreactive CD8+ T cells: critical for determination of graft acceptance or rejection. *Transplantation* *85*, 1339–1347.
- Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J., and Enk, A.H. (2002). CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* *99*, 2468–2476.

- Stephens, R.J., Li, W., Fu, F., O'Connell, P.J., and Thomson, A.W. (1999). Trafficking of APC from liver allografts of Flt3L-treated donors: augmentation of potent allostimulatory cells in recipient lymphoid tissue is associated with a switch from tolerance to rejection. *Transpl. Immunol.* *7*, 51–57.
- Suchin, E.J., Langmuir, P.B., Palmer, E., Sayegh, M.H., Wells, A.D., and Turka, L.A. (2001). Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 973–981.
- Sumimoto, R., and Kamada, N. (1990). Specific suppression of allograft rejection by soluble class I antigen and complexes with monoclonal antibody. *Transplantation* *50*, 678–682.
- Sun, C.-M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* *204*, 1775–1785.
- Tang, X., Maricic, I., Purohit, N., Bakamjian, B., Reed-Loisel, L.M., Beeston, T., Jensen, P., and Kumar, V. (2006). Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8alphaalpha+TCRalphabeta+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 7645–7655.
- Tay, S.S., Wong, Y.C., McDonald, D.M., Wood, N.A.W., Roediger, B., Sierro, F., McGuffog, C., Alexander, I.E., Bishop, G.A., Gamble, J.R., et al. (2014). Antigen expression level threshold tunes the fate of CD8 T cells during primary hepatic immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E2540-2549.
- Teijaro, J.R., Ng, C., Lee, A.M., Sullivan, B.M., Sheehan, K.C.F., Welch, M., Schreiber, R.D., de la Torre, J.C., and Oldstone, M.B.A. (2013). Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* *340*, 207–211.
- Terasaki, P.I., and Cai, J. (2008). Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. *Transplantation* *86*, 377–383.
- Théry, C., Duban, L., Segura, E., Véron, P., Lantz, O., and Amigorena, S. (2002). Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* *3*, 1156–1162.
- Thomson, A.W., and Knolle, P.A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *753–766*.
- Thomson, A.W., Turnquist, H.R., Zahorchak, A.F., and Raimondi, G. (2009). Tolerogenic dendritic cell-regulatory T-cell interaction and the promotion of transplant tolerance. *Transplantation* *87*, S86-90.
- Tiegs, G., Hentschel, J., and Wendel, A. (1992). A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J. Clin. Invest.* *90*, 196–203.
- Tinoco, R., Alcalde, V., Yang, Y., Sauer, K., and Zuniga, E.I. (2009). Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8+ T cell deletion and viral persistence in vivo. *Immunity* *31*, 145–157.
- Todo, S., Yamashita, K., Goto, R., Zaitzu, M., Nagatsu, A., Oura, T., Watanabe, M., Aoyagi, T., Suzuki, T., Shimamura, T., et al. (2016). A Pilot Study of Operational Tolerance with a Regulatory T Cell-Based Cell Therapy in Living Donor Liver Transplantation. *Hepatol. Baltim. Md.*
- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E.A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M.-R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R.S., et al. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med.* *12*, 1198–1202.

- Urbani, S., Boni, C., Missale, G., Elia, G., Cavallo, C., Massari, M., Raimondo, G., and Ferrari, C. (2002). Virus-specific CD8<sup>+</sup> lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J. Virol.* 76, 12423–12434.
- Uss, E., Rowshani, A.T., Hooibrink, B., Lardy, N.M., van Lier, R.A.W., and ten Berge, I.J.M. (2006). CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 2775–2783.
- Valenzuela, N.M., and Reed, E.F. (2013). Antibodies in transplantation: the effects of HLA and non-HLA antibody binding and mechanisms of injury. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1034, 41–70.
- Vanasek, T.L., Nandiwada, S.L., Jenkins, M.K., and Mueller, D.L. (2006). CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells facilitate CD4<sup>+</sup> T cell clonal anergy induction during the recovery from lymphopenia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 5880–5889.
- Vendetti, S., Chai, J.G., Dyson, J., Simpson, E., Lombardi, G., and Lechler, R. (2000). Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 165, 1175–1181.
- Vincenti, F., Blanco, G., Durrbach, A., Friend, P., Grinyo, J., Halloran, P.F., Klempnauer, J., Lang, P., Larsen, C.P., Mühlbacher, F., et al. (2010). Five-year safety and efficacy of belatacept in renal transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 21, 1587–1596.
- Waaga, A.M., Gasser, M., Kist-van Holthe, J.E., Najafian, N., Müller, A., Vella, J.P., Womer, K.L., Chandraker, A., Khoury, S.J., and Sayegh, M.H. (2001). Regulatory functions of self-restricted MHC class II allopeptide-specific Th2 clones in vivo. *J. Clin. Invest.* 107, 909–916.
- Warren, A., Le Couteur, D.G., Fraser, R., Bowen, D.G., McCaughan, G.W., and Bertolino, P. (2006). T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 44, 1182–1190.
- Wei, S., Kryczek, I., Zou, L., Daniel, B., Cheng, P., Mottram, P., Curiel, T., Lange, A., and Zou, W. (2005). Plasmacytoid dendritic cells induce CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 65, 5020–5026.
- Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 486–499.
- Wherry, E.J., Ha, S.-J., Kaech, S.M., Haining, W.N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J.N., Barber, D.L., and Ahmed, R. (2007). Molecular signature of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27, 670–684.
- Win, T.S., and Pettigrew, G.J. (2010). Humoral autoimmunity and transplant vasculopathy: when allo is not enough. *Transplantation* 90, 113–120.
- Winau, F., Hegasy, G., Weiskirchen, R., Weber, S., Cassan, C., Sieling, P.A., Modlin, R.L., Liblau, R.S., Gressner, A.M., and Kaufmann, S.H.E. (2007). Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 26, 117–129.
- Wood, K.J., and Goto, R. (2012). Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation* 93, 1–10.
- Wood, K.J., and Sakaguchi, S. (2003). Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 199–210.
- Wuensch, S.A., Spahn, J., and Crispe, I.N. (2010). Direct, help-independent priming of CD8<sup>+</sup> T cells by adeno-associated virus-transduced hepatocytes. *Hepatology* 52, 1068–1077.

- Xystrakis, E., Dejean, A.S., Bernard, I., Druet, P., Liblau, R., Gonzalez-Dunia, D., and Saou-di, A. (2004). Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and anal-ysis of its mechanism of regulation. *Blood* 104, 3294–3301.
- Youngblood, B., Oestreich, K.J., Ha, S.-J., Duraiswamy, J., Akondy, R.S., West, E.E., Wei, Z., Lu, P., Austin, J.W., Riley, J.L., et al. (2011). Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells. *Immunity* 35, 400–412.
- Yu, M.-C., Chen, C.-H., Liang, X., Wang, L., Gandhi, C.R., Fung, J.J., Lu, L., and Qian, S. (2004). Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7-H1–mediated T-cell apoptosis in mice. *Hepatology* 40, 1312–1321.
- Zajac, A.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J., Suresh, M., Altman, J.D., and Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 188, 2205–2213.
- Zhang, J., Xu, L., Haskins, M.E., and Parker Ponder, K. (2004). Neonatal gene transfer with a retroviral vector results in tolerance to human factor IX in mice and dogs. *Blood* 103, 143–151.
- Zhang, P., Sun, B., Osada, T., Rodriguiz, R., Yang, X.Y., Luo, X., Kemper, A.R., Clay, T.M., and Koeberl, D.D. (2012). Immunodominant liver-specific expression suppresses transgene-directed immune responses in murine pompe disease. *Hum. Gene Ther.* 23, 460–472.
- Zhang, Z., Zhang, J., Wherry, E.J., Jin, B., Xu, B., Zou, Z., Zhang, S., Li, B., Wang, H., Wu, H., et al. (2008). Dynamic Programmed Death 1 Expression by Virus-Specific CD8 T Cells Correlates With the Outcome of Acute Hepatitis B. *Gastroenterology* 134, 1938–1949.e3.
- Zheng, Y., and Rudensky, A.Y. (2007). Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol.* 8, 457–462.
- Zheng, S.G., Wang, J.H., Stohl, W., Kim, K.S., Gray, J.D., and Horwitz, D.A. (2006). TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 3321–3329.

## Thèse de Doctorat

Valentin LE GUEN

### Induction de la tolérance allogénique par transfert de gène dans le foie

Induction of allogeneic tolerance by liver gene transfer

#### Résumé

L'induction de la tolérance immune spécifique du donneur est une bonne alternative à la prise d'immunosuppresseurs au long terme, classiquement utilisés pour limiter le rejet de greffe. Les molécules de Complexe Majeur d'Histocompatibilité du Donneur (CMH) sont les principales cibles de la réponse allogénique chez le receveur en transplantation. Le transfert de gène ciblant le foie à l'aide de vecteurs viraux induit la tolérance au produit du transgène. Pour déterminer si l'expression d'un alloantigène par les hépatocytes induit la tolérance et favorise l'acceptation de la greffe, des souris C57Bl/6 (H-2b) ont été traitées à l'aide d'un vecteur AAV (pour Adeno Associated Virus) permettant l'expression du CMH I H-2K<sup>d</sup> par les hépatocytes. Les souris sont tolérantes à l'alloantigène et l'expriment à leur membrane à long terme, même après vaccination à l'aide d'un adénovirus. Après induction d'un diabète, des souris traitées avec l'AAV rejettent plus tardivement des greffes d'îlots pancréatiques de souris Balb/c (H-2d), et 40% d'entre elles sont tolérantes (survie >100 jours). L'expression de H-2K<sup>d</sup> dans le foie induit l'expansion localement de L<sub>T</sub> CD8<sup>+</sup> allospécifiques et suppresseurs. Leur transfert adoptif chez des souris naïves diabétiques améliore la survie de greffe allogéniques d'îlots pancréatiques. Nous avons démontré pour la première fois que l'expression à long terme d'une molécule de CMH I induit la génération d'un sous-type de L<sub>Treg</sub> CD8<sup>+</sup> allospécifiques favorisant la tolérance à des allogreffes. Le transfert de gène dans le foie est une stratégie prometteuse pour l'induction de la tolérance spécifique du donneur *in vivo*.

#### Mots clés

AAV ; Foie ; Lymphocyte T CD8<sup>+</sup> Régulateurs ; Tolérance ; Transplantation ; Transfert de gène

#### Abstract

Induction of donor-specific immune tolerance is a good alternative to chronic life-long immunosuppression for the avoidance of allograft rejection. Donor major histocompatibility complex (MHC) molecules represent the main targets of the allogeneic immune response of transplant recipients. Liver-targeted gene transfer with viral vectors induces tolerance toward the encoded antigen. To determine whether alloantigen gene transfer to hepatocytes induces tolerance and promotes graft acceptance, C57Bl/6 (H-2b) mice were treated with adeno-associated viral (AAV) vector targeting the expression of the MHC I molecule H-2K<sup>d</sup> to hepatocytes. AAV H-2K<sup>d</sup> treated mice were tolerant to the alloantigen, as demonstrated by its long-term expression at the membrane of the hepatocytes, even after a highly immunogenic challenge with an adenoviral vector. In addition, after induction of diabetes, the AAV treated mice had significantly delayed rejection of fully allogeneic pancreatic islet grafts from Balb/c mice (H-2d), with more than 40% recipients tolerant (>100 days). AAV mediated expression of H-2K<sup>d</sup> in the liver induced the local expansion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes with allo-specific suppressive properties. The adoptive transfer of these liver-generated CD8<sup>+</sup> Tregs into naive diabetic mice promoted the long-term survival of allogeneic pancreatic islet grafts. We demonstrate for the first time that AAV-mediated long-term expression of a single MHC I molecule in the liver induces the generation of a subset of allospecific CD8<sup>+</sup> Treg cells, which promotes tolerance toward fully allogeneic graft. Liver gene transfer represents a promising strategy for *in vivo* induction of donor-specific tolerance.

#### Key Words

AAV ; CD8+ Regulatory T Cell ; Gene Transfer ; Liver ; Tolerance ; Transplantation