

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à Mia qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et de son équipe. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir formée et guidée dans cette thèse.

Merci au Dr Federico Mingozzi, au Dr Anna Salvetti et au Dr Ignacio Anegon d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je les remercie également pour leur analyse et leurs commentaires avisés de mon manuscrit.

Je remercie également le Dr Bernard Vanhove et le Dr Roger Legrand d'avoir participé à mes comités de suivi de thèse ainsi que pour leurs conseils et leurs encouragements.

Merci au Dr Xavier Saulquin et à Jeanne Perroteau pour leur aide sur la technologie des tétramères, sur la génération des lignées de lymphocytes T.

Merci à Nathalie Holic qui m'a proposé mon premier stage et fait découvrir le monde de la recherche et également à Sophie Frin qui m'a encadrée. Elles ont fait de cette première expérience de recherche un très bon souvenir.

Parce que sans eux cette thèse ne se serait sûrement pas aussi bien passé, un très très très grand merci à toute la team Immuno !

-Un grand merci à Mickael qui m'a aidé dans à peu près tous les domaines. Merci pour tes précieux conseils, ta patience, ton aide pour les manips (on l'a eu ce test de cytotox !) et surtout pour ta bonne humeur.

-Merci à Céline pour m'avoir fait découvrir le monde très flou de l'immuno, pour m'avoir formée, préparée le terrain, lancée dans cette thèse et surtout pour avoir continué à me fournir une aide précieuse depuis la Finlande.

-Merci à Marie de m'avoir fait découvrir les joies de l'ELISpot, d'avoir partagé ses potins et ses grands éclats de rire dans les couloirs et surtout merci pour ce merveilleux surnom qui m'a été attribué grâce à toi.

-Merci à Nicolas (même si tu fais rien que de m'embêter) pour ton aide et tes conseils ainsi que pour m'avoir appris à dompter les cytomètres et particulièrement le Trieur Aria.

-Merci à Alicia pour sa participation au projet et pour m'avoir permis de découvrir qu'encadrer des étudiants c'était pas si mal en faite.

Merci également à tout le reste de l'équipe immuno pour m'avoir écouté parler de TEMRA et de tétramères pendant plus de 3 ans , pour leurs conseils et pour les nombreuses réunions immuno délirantes: Virginie, Célia, Malo, Sam, Johanne, Estelle, à tous les stagiaires que j'ai pu voir défiler et surtout à notre chère mascotte Martine !

Merci au personnel de l'animalerie Sandrine, Eva et Aurélie, cela a toujours été un plaisir de travailler avec vous.

Merci au personnel des plateformes de la SFR, en particulier à la plateforme Cytocell, Juliette et Nadège, la plateforme P2R, mais également Micropicell pour leur aide et leurs conseils. Merci également au CPV qui a produits nos lots de vecteurs AAVr.

Merci à toute les membres de l'UMR1089 (les actuels et les anciens !) et particulièrement à Anita et Manuela pour toute la gestion administrative mais aussi à Charlène et Cynthia qui nous permettent au quotidien de manipuler dans les meilleurs conditions (et surtout pour avoir fortement contribué à notre collection de Monsieur Madame).

Merci à tous ceux qui m'ont aidé dans la rédaction de ce manuscrit pour leurs commentaires, leurs conseils, leurs suggestions et leurs corrections : Céline, Mickaël, Magalie, Virginie et Mia.

Merci à mes compères de thèses (et d'afterwork !), Audrey et Malo, qui ont été en première ligne pour m'écouter râler. Bon courage pour votre rédaction, vous allez voir c'est génial ! Un énorme merci à Audrey pour ces 3 années de vie commune et de symbiose dans le bureau 404. Grâce à toi cette thèse est surtout remplie de plein plein de très bons souvenirs (que je ne listerai pas sinon il faudrait un chapitre en plus). Encore merci pour le soutien que tu m'as apporté.

Merci également à notre nouvelle coloc de bureau, Marianne qui a su apporté de la bonne humeur (et des gaufrettes) au sein du bureau des thésardes aigries.

Merci à ma famille et à mes amis pour m'avoir soutenu tout au long de cette thèse et même de m'avoir supportée sur la fin : Merci à mes parents, Bren, mes cousines, Nini, Manu, Cindy, Marine, Chloé, Julie, Victoire, Alex, Guigui et. tous les autres !

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	5
Illustrations	9
Figures	9
Tableaux.....	11
Abréviations	13
Avant-propos	17
INTRODUCTION	21
Partie 1 : La thérapie génique et les stratégies de vectorologie	21
Partie 2 : Le virus adéno-associé et ses vecteurs dérivés.....	25
I. L'AAV sauvage.....	25
A. Le génome de l'AAV sauvage.....	26
B. Les sérotypes naturels de l'AAV.....	29
C. L'infection par l'AAV sauvage	31
1) Internalisation et transport du virus dans la cellule	31
2) Latence et réplication de l'AAV sauvage.....	33
3) Voies d'infection	37
II. L'AAV recombinant.....	38
A. Le génome de l'AAVr	39
B. La capsid de l'AAVr	40
C. La production de l'AAVr.....	42
D. Succès et limitations de l'AAVr	44
Partie 3: La réponse immunitaire dirigée contre l'AAV	47
I. L'immunité Innée	48
A. Généralités et reconnaissance virale	48

B.	L'immunité innée et l'AAV	51
1)	Reconnaissance du génome virale	52
2)	Reconnaissance de la capside virale	54
II.	L'immunité adaptative	55
A.	Capture des antigènes et présentation aux lymphocytes	56
1)	Généralités	56
2)	Capture et présentation des antigènes de l'AAV	58
B.	L'immunité adaptative humorale	59
1)	Généralités	59
2)	L'immunité adaptative humorale anti-AAV	61
a.	Principaux outils d'analyse de l'immunité adaptative humorale chez l'Homme	61
b.	Prévalence de l'immunité adaptative humorale anti-AAV chez l'Homme	63
c.	Impact de l'immunité humorale préexistante anti-AAV en essai clinique	66
C.	L'immunité adaptative cellulaire	68
1)	Généralités	68
2)	L'immunité adaptative cellulaire anti-AAV	75
a.	Principaux outils d'analyse de l'immunité adaptative cellulaire anti-AAV chez l'Homme	75
b.	La réponse cellulaire anti-AAV : une limitation apparue en essai clinique	78
c.	Prévalence et caractérisation de la réponse cellulaire préexistante anti-AAV	83
d.	Développement de modèles animaux pour l'étude de l'immunité cellulaire spécifique de l'AAV	87
III.	Les stratégies d'immunomodulation	88

Partie 4 : Contexte et objectifs de la thèse	93
I. Contexte.....	93
II. Objectifs.....	94
III. Choix expérimentaux	95
A. Etude I : Etude de la prévalence de la réponse immunitaire cellulaire anti-AAV.....	95
B. Etude II : Caractérisation des LT IFN- γ anti-AAV	96
C. Etude II : Enrichissement médié par les tétramères.....	96
D. Etude III : Modèle animal	99
RESULTATS	101
Etude I : “ <i>Cellular AAV serotype prevalence study in healthy humans reveals particular features for AAV9 serotype</i> ”	101
Etude I : Résultats préliminaires supplémentaires: Enrichissement et phénotypage des cellules sécrétant l’IFN- γ en réponse à l’AAV8	129
A. Contexte et objectifs	129
B. Matériel et méthodes.....	129
C. Résultats.....	130
D. Discussion.....	132
Etude II : “ <i>Tetramer-based enrichment of preexisting anti-AAV8 CD8⁺ T cells in human donors allows the detection of a TEMRA subpopulation</i> ”	135
Etude III : Développement d’un modèle murin de transfert de gène pour l’étude de l’impact des lymphocytes T CD8 ⁺ anti-AAV <i>in vivo</i>	173
I. Contexte et stratégie de l’étude	173
II. Matériel et méthodes.....	174
A. Production de vecteurs	174
B. Animaux et administration du vecteur.....	174
C. Extraction d’ADN et PCR quantitative.....	175
D. Isolement des splénocytes.....	175

E. Marquage des PBMC et splenocytes	176
F. Dosage du transgène dans le plasma.....	176
III. Résultats.....	176
A. Validation de la fonctionnalité du vecteur	176
B. Etude de l'impact du transfert adoptif de PBMC d'un donneur positif en ELISpot IFN- γ anti-AAV8 sur le transfert de gène via un AAV8r.	177
C. Etude de l'impact du transfert adoptif de lignée primaire de LT CD8 ⁺ spécifiques de l'AAV8 sur le transfert de gène via un AAV8r.....	179
D. Etude de l'impact du transfert adoptif de LT CD8 ⁺ anti-AAV8 co injectées avec des PBMC totaux sur le transfert de gène via un AAV8r.....	180
IV. Conclusion et discussion.....	181
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	185
L'immunité préexistante anti-AAV : une prévalence difficile à évaluer.....	185
Le TAME : une alternative à l'ELISpot IFN- γ ?	187
L'évaluation fonctionnelle et multiparamétrique : un outil de prédiction plus pertinent ?	189
L'immunité innée anti-AAV : quel impact sur l'immunité adaptative ?.....	191
L'immunité anti-AAV en périphérie : un bon indicateur de la réponse <i>in situ</i> ?	193
L'immunosuppression : la meilleure solution?.....	195
Les modèles animaux : les pistes à explorer.....	198
CONCLUSION GENERALE	201
BIBLIOGRAPHIE	203
ANNEXES	233

Illustrations

Figures

<i>Figure 1 : Essais cliniques de thérapie génique en 2018</i>	<i>22</i>
<i>Figure 2 : Agrégats cristallisés d'AAV dans le noyau cellulaire d'une culture cellulaire.....</i>	<i>26</i>
<i>Figure 3 : Organisation du génome de l'AAV.....</i>	<i>27</i>
<i>Figure 4 : Structure secondaire des ITR de l'AAV2.</i>	<i>28</i>
<i>Figure 5 : Phylogénie des différents variants de l'AAV.....</i>	<i>30</i>
<i>Figure 6 : Modélisation de l'entrée de l'AAV et de son trafic intracellulaire.</i>	<i>31</i>
<i>Figure 7 : Cycle de vie de l'AAV.....</i>	<i>34</i>
<i>Figure 8 : Schéma du modèle de replication de l'ADN de l'AAV.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 9: Représentation schématique de l'utilisation des sérotypes d'AAVr dans divers modèles animaux et chez l'Homme.</i>	<i>40</i>
<i>Figure 10 : Schéma de différentes méthodes de production d'AAVr et des impuretés générées.</i>	<i>43</i>
<i>Figure 11: Schéma de la structure et des principales voies de signalisation des PRR.....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 12: Schéma du système du complément</i>	<i>51</i>
<i>Figure 13 : Activation de la réponse immunitaire innée après transfert de gène à l'aide d'AAVr.</i>	<i>53</i>
<i>Figure 14: Phases des réponses immunitaires adaptatives</i>	<i>56</i>
<i>Figure 15 : Voies d'apprêtement intracellulaire des antigènes dans les CPA.</i>	<i>58</i>
<i>Figure 16: Outils de détection de la réponse humorale préexistante anti-AAV.....</i>	<i>62</i>
<i>Figure 17 : Récepteurs costimulateurs et co-inhibiteurs dans la synapse immunitaire.</i>	<i>69</i>
<i>Figure 18: Différenciation de LT CD4⁺ naïfs en sous-ensembles de LT CD4⁺.....</i>	<i>70</i>
<i>Figure 19 : Sous-ensembles de LT mémoire</i>	<i>73</i>
<i>Figure 20: Schéma du principe de l'Elispot.....</i>	<i>76</i>
<i>Figure 21: Construction et utilisation de tétramères peptide-CMH I pour la détection des cellules CD8⁺ T spécifiques de l'antigène.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 22 : Expansion d'une population de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la capsid après injection d'un vecteur AAV2r.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 23 : Modèle du traitement des capsides dans les hépatocytes et présentation aux LT CD8⁺ mémoire spécifiques de l'AAV.....</i>	<i>80</i>
<i>Figure 24 : Immunité cellulaire en réponse à la capsid dans un essai clinique avec un AAV8-F.IX.....</i>	<i>81</i>

<i>Figure 25: Proportion de LT CD4⁺ et CD8⁺ répondant à la capsid de l'AAV2 chez l'Homme et AAV8 chez le primate.</i>	<i>86</i>
<i>Figure 26 : Méthode d'enrichissement magnétique par capture des cytokines.....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 27 : Enrichissement par tétramère de peptide-CMH utilisant des particules magnétiques.....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 28: Détection, enrichissement et phénotypage des LT IFN-γ⁺ dans les PBMC après stimulation du pool peptidique AAV8.....</i>	<i>131</i>
<i>Figure 29: Aperçu du déroulement des expérimentations du modèle murin.</i>	<i>174</i>
<i>Figure 30 : Validation du transfert de gène via l'AAVr2/8-CAG-mSEAP</i>	<i>176</i>
<i>Figure 31: Exemple représentatif de détection des cellules humaines par cytométrie en flux dans le sang et les splénocytes des souris à jour 30, après euthanasie.</i>	<i>178</i>
<i>Figure 32: Exemple représentatif de coupes de foie en coloration Hémalun, Phloxine, Safran (HPS) pour détecter la présence d'infiltrats immuns (x10).....</i>	<i>179</i>

Tableaux

<i>Tableau 1 : Caractéristiques principales des vecteurs viraux les plus utilisés en essai clinique de thérapie génique.</i>	23
<i>Tableau 2 : Récapitulatif des récepteurs cellulaires des sérotypes d'AAV les plus décrits.</i>	32
<i>Tableau 3 : Synthèse des études de prévalence des facteurs neutralisants anti-AAV chez l'Homme dans la population générale.</i>	65
<i>Tableau 4 : Prévalence des réponses médiées par les lymphocytes T spécifiques de l'AAV chez les donneurs sains.</i>	84
<i>Tableau 5: Principales approches actuellement à l'étude pour moduler les réponses des lymphocytes B et T spécifiques de l'AAV.</i>	89
<i>Tableau 6 : Tableau récapitulatif des résultats des souris injectées avec des PBMC humaines.</i>	178
<i>Tableau 7 : Tableau récapitulatif des résultats des souris injectées avec les lignées primaires de LT CD8⁺.</i>	180
<i>Tableau 8 : Tableau récapitulatif des résultats des souris injectées avec les LT CD8⁺ et les PBMC.</i>	180

Abréviations

AAP : *Assembly-Activated Protein*

AAT : Alpha1-antitrypsine

AAV : Virus Adéno-associé

AAVr : Virus Adéno-associé recombinant

AAVR : Récepteur à l'AAV

Ad : Adénovirus

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BCR : Récepteur des cellules B

BEVS : Système de vecteur d'expression de baculovirus

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

CD : Cluster de différenciation

cDC : Cellules dendritiques conventionnelles

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CTL : Lymphocyte T cytotoxique

DC : Cellules dendritiques

DMD : Dystrophie musculaire de Duchenne

db : double brin

EFS : Etablissement français du sang

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ELISpot : *Enzyme-linked immunosorbent spot*

F.IX : Facteur IX

FAS : *Apoptosis-stimulating fragment*

FAS-L : FAS ligand

FDA : *Food and Drug Administration*

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

Foxp3: *Forkhead box P3*

HCC : Carcinome hépatocellulaire

HCV : Virus de l'hépatite C

HEK : *Human embryonic Kidney*

HLA : *Human Leukocyte Antigen*

HRP : *horseradish peroxidase*

HSV : Herpes simplex virus

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IM : Intramusculaire

IP : Intrapéritonéale

IRF : *Interferon-Regulatory Factor*

ITR : *Inverted-terminal repeat*

IV : Intraveineuse

I κ B : Inhibiteur de NF kappaB

KO : *Knock-out*

LB : Lymphocyte B

LDH : Lactate déshydrogénase

LPL : Lipoprotéine lipase

LT : Lymphocyte T

MAAP : *Membrane-associated accessory protein*

MAC : Complexe d'attaque membranaire

MCP : *Monocyte chemoattractant protein*

MIP : *Macrophage inflammatory protein*

moDC : DC dérivés des monocytes

mSEAP : *murine secreted alkaline phosphatase*

Nab : Anticorps neutralisants

NF- κ B : *Nuclear factor κ B*

NHEJ : *Non homologous end joining*

NK : *Natural Killer*

ORF : *Open reading frame*

PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Pattern*

PBMC : *Peripheral blood mononuclear cell*

pCMH : *Complexe peptide CMH*

pDC : *Cellules dendritiques plasmoides*

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

RBE : *Rep binding element*

RMK : *Rhesus-monkey kidney*

Sc : *Self-complementary*

SMA : *Amyotrophie spinale*

Ss : *Simple brin*

TAME : *Tetramer-associated magnetic enrichment*

TCM : *Lymphocyte T centrale mémoire*

TCR : *Récepteur des cellules T*

TEM : *Lymphocyte T effecteur mémoire*

T_{EMRA} : *Lymphocyte T Effecteur Mémoire réexprimant le CD45RA*

Th: *Lymphocyte T helper*

TLR : *Toll Like Receptor*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

Treg: *Lymphocyte T régulateur*

TRIF : *TIR domain containing adaptor inducing interferon β*

Trs : *Site de résolution terminale*

VIH : *Virus de l'immunodéficience humaine*

Avant-propos

En Europe, les maladies rares touchent 30 millions de personnes et sont, pour une grande majorité, des maladies génétiques. Ces maladies, héréditaires ou acquises, sont généralement définies comme des altérations du matériel génétique et, dans le cas des maladies monogéniques, d'un gène en particulier. La défaillance d'un gène peut entraîner la perturbation complète de la fonctionnalité des tissus. Les patients souffrant d'une maladie génétique font souvent l'objet d'un suivi médical contraignant, comprenant la physiothérapie, la thérapie pharmacologique substitutive lorsqu'elle est disponible, ou même des procédures chirurgicales lorsqu'elles sont nécessaires. Il est important de noter que ces mesures médicales, qui doivent être répétées fréquemment, ne sont pas des traitements curatifs, et jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle, des alternatives thérapeutiques plus durables restaient à trouver. Un traitement permanent des maladies génétiques héréditaires monogéniques est, en théorie, assez simple de conception : il suffit d'apporter une copie fonctionnelle du gène défectueux dans les cellules cibles. La réalité est beaucoup plus compliquée. De l'identification du gène défectueux à l'administration *in vivo* du transgène thérapeutique, les difficultés sont nombreuses.

En 1966, suite à de nombreuses études sur la transformation cellulaire par des virus, apparaît l'idée que les techniques de génie génétique pourraient conduire à une nouvelle approche pour traiter les maladies génétiques. C'est le début de la thérapie génique, même si celle-ci n'est alors qu'un concept en raison du manque d'outils nécessaires pour la génération de virus thérapeutiques. Le premier protocole clinique de thérapie génique n'est donc officiellement approuvé qu'en 1988 par le Comité consultatif sur l'ADN recombinant. L'équipe de Rosenberg lance alors un essai basé sur l'injection de lymphocytes T (LT) génétiquement modifiés chez des patients atteints de cancer. La thérapie génique rentre alors dans une période d'expansion rapide avec de nombreux essais cliniques pour diverses applications comme les maladies monogéniques et le cancer. La recherche autour de la thérapie génique est alors très médiatisée. Cependant, malgré quelques succès thérapeutiques, les premières études donnent des résultats décevants, et mènent même à la mort d'un patient, Jesse Gelsinger en 1999, due à une forte réponse immune contre le traitement. L'emballement initial pour la thérapie génique retombe.

Vingt ans après les premiers essais cliniques et les revers subis par la thérapie génique, une recherche plus approfondie, plus consciente et moins médiatisée a permis à ce domaine de

connaître un nouvel essor. A l'heure actuelle, plus de 1800 essais cliniques ont été approuvés dans le monde entier, dont certains ont donné des résultats très concluants notamment pour des pathologies comme l'amaurose congénitale de Leber, le syndrome de Wiskott-Aldrich ou l'amyotrophie spinale. Des traitements de thérapie génique ont même été mis sur le marché. Le premier (Gencidine®), destiné au traitement de tumeurs du cou et de la tête a été autorisé en Chine en 2003. Le second (Glybera®) a été approuvé en Europe fin 2012, pour traiter un déficit héréditaire en lipoprotéine lipase (LPL). En 2016, le premier traitement de thérapie génique *ex vivo* pour le traitement d'un déficit immunitaire sévère génétique lié à un déficit en adénosine déaminase ou ADA (Strimvelis®) a été approuvé en Europe. En décembre 2017, la *Food and Drug Administration* (FDA) autorise la mise sur le marché américain du premier traitement de thérapie génique *in vivo*, Luxturna® qui permet de traiter l'amaurose congénitale de Leber, une dystrophie rétinienne. Enfin, tout récemment, la FDA a également approuvé Zolgensma®, un traitement pour l'amyotrophie spinale de type 1, une maladie neuromusculaire.

A l'heure actuelle, le paysage de la thérapie génique est en pleine évolution. De nouveaux outils comme le duo CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) et nucléase Cas9 ont fait leur apparition permettant d'augmenter le champ d'utilisation de la thérapie génique par l'intermédiaire de stratégies d'édition de gène. Le début de la commercialisation des traitements a également entraîné l'arrivée du secteur privé dans ce domaine et donc d'une plus grande confidentialité des données mais aussi d'investissements plus importants qui ont considérablement accéléré l'avancée de la recherche en thérapie génique.

Les essais cliniques ont, pour certains, été de grands succès et nous ont beaucoup appris mais ont également mis en lumière des zones de préoccupations. La première étant le coût de ces traitements, le Luxturna® et le Zolgensma® sont les 2 traitements les plus chers au monde avec un coût respectif d'environ 1 million et 2 millions de dollars. Ces coûts exorbitants posent des problèmes d'accès et d'éthique. Pour cette raison ainsi que son manque d'efficacité, le renouvellement de l'autorisation de mise sur le marché du Glybera® (1M de dollars) n'a pas été demandé, il n'est donc plus disponible sur le marché à l'heure actuelle.

Afin de diminuer le coût de ces traitements plusieurs paramètres sont ciblés comme l'optimisation de production de vecteurs viraux et le design de vecteurs viraux plus efficaces et plus spécifiques.

Un autre problème majeur apparu lors des essais cliniques est à prendre en compte dans l'optimisation des vecteurs : la réponse immunitaire de l'hôte contre le vecteur viral. En effet, notre système immunitaire est spécifiquement conçu pour nous protéger contre les menaces internes et externes, et dans ces conditions, les virus sont généralement considérés comme des ennemis. En injectant un virus même modifié, il y a donc un fort risque d'activation voire de réactivation du système immunitaire. Parmi les stratégies de thérapie génique *in vivo*, celles qui utilisent le virus adéno-associés (AAV) comme vecteur sont les plus courantes. C'est notamment le cas de Luxturna® et Zolgensma®. Ce virus est faiblement immunogène, le problème majeur vient du fait que les virus adéno-associés infectent naturellement l'homme, et bien qu'ils ne causent pas de pathologie, ils peuvent encore être considérés comme corps étranger dans la mémoire de notre système immunitaire. L'immunité humorale anti-AAV est assez bien appréhendée aujourd'hui : nous disposons désormais d'un système de détection efficace de l'état des réponses humorales anti-AAV préexistantes chez les patients mais elles restent toutefois un problème puisque les patients possédant une immunité humorale neutralisante ne peuvent, à l'heure actuelle, pas être traités. Concernant la réponse cellulaire, au contraire, en l'absence de modèle animal préclinique prédictif disponible, il n'existe aucun moyen suffisamment efficace pour déterminer son impact puisqu'il varie d'une personne à l'autre, selon un ensemble de paramètres encore mal compris. L'immunité cellulaire contre l'AAV recombinant (AAVr) reste un véritable frein pour l'efficacité et la sécurité de la thérapie génique à médiation AAVr. Ce problème est d'autant plus d'actualité qu'aujourd'hui des traitements de thérapie génique sont injectés *in vivo* par voie systémique et donc à des doses de plus en plus élevées et sont donc plus susceptibles d'entraîner une réponse immune cellulaire. L'étude de la réponse immune contre ces vecteurs est donc nécessaire afin d'optimiser le design des vecteurs, mettre en place des stratégies d'immunomodulation et ainsi de pouvoir inclure un plus grand nombre de patients dans les essais cliniques. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans cette thématique.

Cette thèse a pour objectif d'apporter des éléments nouveaux dans la caractérisation de l'immunité cellulaire préexistante afin de mieux prédire son évolution et son impact sur le transfert de gène *via* l'AAVr. Une identification plus précise des risques de réaction permettrait une amélioration de l'immunosurveillance du patient et une optimisation du traitement de thérapie génique. Cette étude s'inscrit également à plus long terme dans l'objectif de permettre la mise au point de traitements d'immunomodulation ciblés et ainsi optimiser la thérapie génique tout en réduisant les risques.

INTRODUCTION

Partie 1 : La thérapie génique et les stratégies de vectorologie

La thérapie génique désigne une stratégie thérapeutique qui consiste à transférer un acide nucléique exogène dans le noyau de cellules cibles d'un patient. Elle a pour but de pallier à un défaut d'expression génique des cellules cibles notamment dans le cadre de maladies génétiques. Cette stratégie peut également être utilisée dans le cas de maladies acquises nécessitant la modification de l'expression de certains gènes endogènes ou l'expression *de novo* d'un gène étranger (ex : gène suicide). Une insertion efficace du matériel génétique dans les cellules nécessite l'utilisation de vecteurs qui permettent de protéger et de guider le transgène depuis son lieu d'administration jusqu'aux cellules cibles, facilitant également son entrée et son trafic intracellulaire jusqu'au noyau. Ces vecteurs peuvent être viraux ou non viraux.

Les vecteurs non-viraux sont divisés en 2 catégories : les vecteurs dits physiques et ceux dits chimiques. Ils sont globalement considérés comme plus sûrs que les vecteurs viraux notamment car ils sont beaucoup moins immunogènes (Yin et al., 2014). La stratégie utilisant les vecteurs physiques consiste à altérer de manière transitoire la membrane cellulaire afin de transférer de l'ADN (acide désoxyribonucléique) à l'intérieur des cellules. Afin de permettre cette altération temporaire, des méthodes d'électroporation (Neumann et al., 1982), de sonoporation (Fechheimer et al., 1987) ou encore de bombardement de particules (Klein et al., 1992; Yang et al., 1990) sont utilisées. Ces techniques aboutissent, certes, à une augmentation de l'expression du transgène d'intérêt mais celle-ci est souvent faible, et souvent associée à des lésions au site d'injection liées notamment au choc électrique induit pour faire entrer l'ADN dans les cellules (Hartikka et al., 2001). Les vecteurs chimiques quant à eux regroupent les vecteurs basés sur des polymères et ceux basés sur des lipides, ils vont former un complexe avec l'ADN d'intérêt et faciliter son entrée dans la cellule (Putnam, 2006; Ramamoorth and Narvekar, 2015). En plus d'être faiblement immunogènes, les vecteurs non-viraux peuvent être produits en large quantité et possède une capacité d'encapsulation importante, mais ils sont actuellement peu efficaces pour la thérapie génique (Putnam, 2006; Yin et al., 2014). En effet, ils aboutissent dans la plupart des cas à une expression transitoire du transgène. C'est pourquoi, peu de ces vecteurs non-viraux ont jusqu'à présent été développés cliniquement.

Dans ce contexte, les vecteurs viraux apparaissent aujourd’hui comme des vecteurs de choix pour le traitement par thérapie génique. Ils sont dérivés de virus sauvages par modification génétique (élimination des gènes viraux nécessaires à la réplication du virus) et sont aujourd’hui utilisés dans 70% des essais cliniques de thérapie génique pour diverses applications, comme certains types de cancers, des maladies cardiovasculaires, des maladies infectieuses mais aussi les maladies monogéniques (Wang and Gao, 2014) (**Figure 1A**). Les plus utilisés en thérapie génique sont les adénovirus (Ad), les lentivirus (appartenant à la famille des rétrovirus) et les AAV (**Figure 1B**).

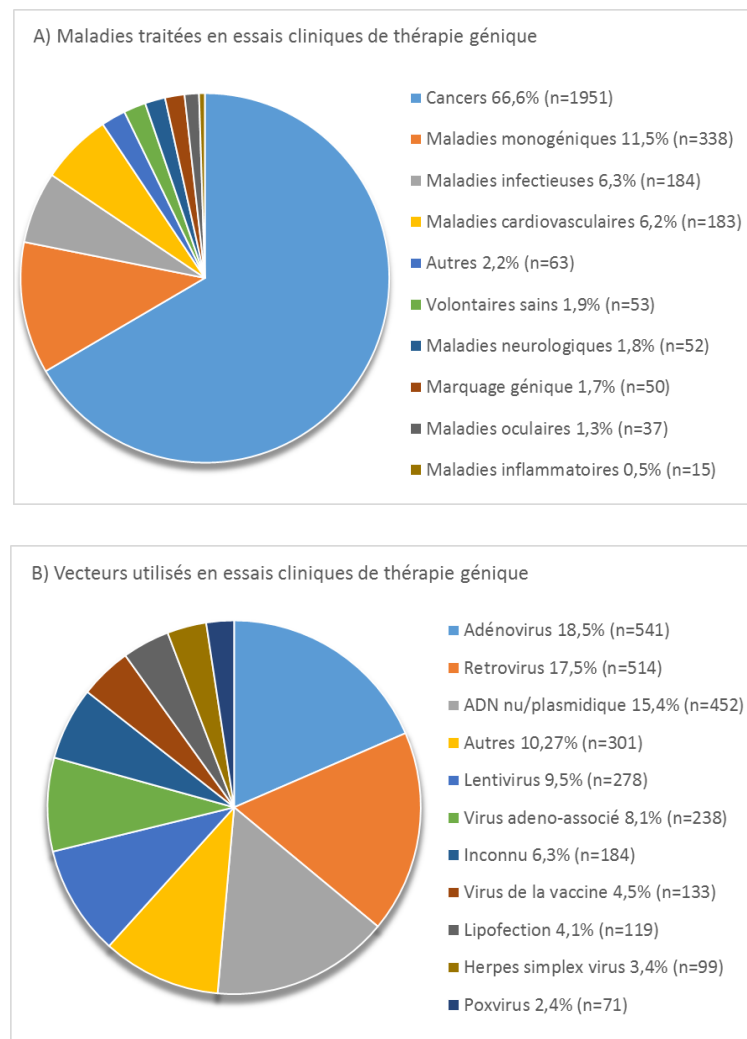


Figure 1 : Essais cliniques de thérapie génique en 2018

A) Maladies actuellement traitées en essai clinique de thérapie génique. B) Types de vecteurs actuellement utilisés en essai clinique de thérapie génique (d’après *The Journal of Gene Medicine, Gene Therapy Clinical Trials Worldwide*)

Chaque vecteur viral présente ses avantages et ses inconvénients et sera donc plus ou moins adapté à la stratégie thérapeutique envisagée pour une pathologie donnée (**Tableau 1**).

Caractéristiques	Rétrovirus	Lentivirus	Adénovirus	AAV
Génome	ARNsb	ARNsb	ADNdb	ADNsb
Capacité d'encapsidation	9kb	9kb	7 à 35kb	<5kb
Infection des cellules	En division	En division ou quiescentes	En division ou quiescentes	En division ou quiescentes
Intégration	Oui	Oui	Non	Non
Durée d'expression	Long terme	Long terme	Court terme	Long terme
Immunogénéicité	Faible	Faible	Importante	Faible
Application clinique	Cancer, maladies monogéniques	Cancer, maladies monogéniques	Cancer	Cancer, vaccination, maladies monogéniques
Nombre d'essais cliniques enregistrés dans le monde en 2018	478 (17,9%)	196 (7,3%)	547 (20,5%)	204 (7,6%)

Tableau 1 : Caractéristiques principales des vecteurs viraux les plus utilisés en essai clinique de thérapie génique.

ARN, Acide ribonucléique ; Sb, simple brin ; db, double brin ; kb, kilobase

Le principal atout des vecteurs viraux, est que la plupart d'entre eux ont la propriété de maintenir l'expression d'un transgène à long terme chez un individu grâce à la persistance du génome soit sous forme intégrée soit sous forme épisomale. Parmi les vecteurs viraux actuellement utilisés, ceux dérivés de l'AAV constituent aujourd'hui une des plateformes de vectorologie les plus prometteuses pour le transfert de gène *in vivo* (Samulski and Muzyczka, 2014). En effet, elle remplit en grande partie les critères fondamentaux pour la sélection d'un vecteur viral de thérapie génique: la sûreté, l'efficacité et la possibilité de production à grande échelle. Un des atouts majeurs de l'AAV comme vecteur est sa sûreté : il n'est associé à aucune pathologie (Blacklow et al., 1968a; Hoggan et al., 1966) et c'est un vecteur majoritairement non intégratif et dont le génome persiste sous forme épisomale (Nowrouzi et al., 2012; Penaud-Budloo et al., 2008) ce qui réduit les risques de mutagenèse insertionnelle tout en permettant une persistance du génome. Il a été montré dans plusieurs modèles animaux précliniques (Guilbaud et al., 2019; Kaplitt et al., 1996; Monahan et al., 2015; Xiao et al., 1996) et également chez l'homme (Kessler et al., 1996; Nathwani et al., 2014; Simonelli et al., 2010), que ces vecteurs permettent une expression à long terme du transgène de plusieurs mois à plusieurs années après une seule administration. Enfin, il a l'avantage d'être

productible en grande quantité et des méthodes ont également été développées pour caractériser au mieux les lots de vecteurs produits (Penaud-Budloo et al., 2018). Des médicaments de thérapie génique basée sur l'AAV sont d'ailleurs déjà commercialisés, le Luxturna® et le Zolgensma®. Malgré tous ces avantages, l'AAV possède tout de même une capacité d'encapsidation réduite (<5 kb), ce qui peut paraître critique pour le traitement de certaines pathologies pour lesquelles il faut apporter une copie intègre et complète du gène.

Partie 2 : Le virus adéno-associé et ses vecteurs dérivés

I. L'AAV sauvage

Petit virus d'environ 20 à 25 nm, le « virus adéno-associé » tient son nom de sa découverte en 1964 par l'équipe d'Atchison dans une préparation d'adénovirus simien 15 produite *in vitro* dans des cellules RMK (*Rhesus-Monkey Kidney*) (Atchison et al., 1965, 1966) (**Figure 2**). Il a ensuite été retrouvé dans de multiples espèces de vertébrés, comme l'humain et le primate non humain. Selon le *International Committee on Taxonomy of viruses*, il appartient à la famille des Parvovirus, à la sous-famille des *Parvovirinae* et au genre *Dependoparvovirus*. Selon la classification de Baltimore, il appartient au Groupe II des virus, soit les virus ADN simple brin. A ce jour, une dizaine de sérotypes et une centaine de variants ont été décrits, mais il n'a été associé à aucune pathologie humaine (Blacklow et al., 1968a; Hoggan et al., 1966). En revanche, son implication potentielle dans les complications de grossesses, l'infertilité et le carcinome hépatocellulaire n'a pas été écartée. En effet, des études portant sur les avortements naturels ont montré que les fréquences d'ADN d'AAV sont particulièrement élevées dans les produits d'avortement, chez les femmes présentant des complications de grossesses (Arechavaleta-Velasco et al., 2006; Kiehl et al., 2002; Pereira et al., 2010; Tobiasch et al., 1994) ainsi que dans le sperme de donneurs infertiles comparé à celui de donneurs sains (Erles et al., 2001; Rohde et al., 1999). L'AAV a également été suspecté d'être responsable de carcinomes hépatocellulaires (HCC) suite à l'analyse de tissus tumoraux et à la détection d'insertion d'ADN d'AAV2 dans des gènes proto-oncogènes (La Bella et al., 2019; Logan et al., 2017; Nault et al., 2015). Dans ces 3 cas, les résultats suggèrent que l'AAV pourrait être impliqué mais aucune preuve formelle n'a été obtenue jusqu'à maintenant.

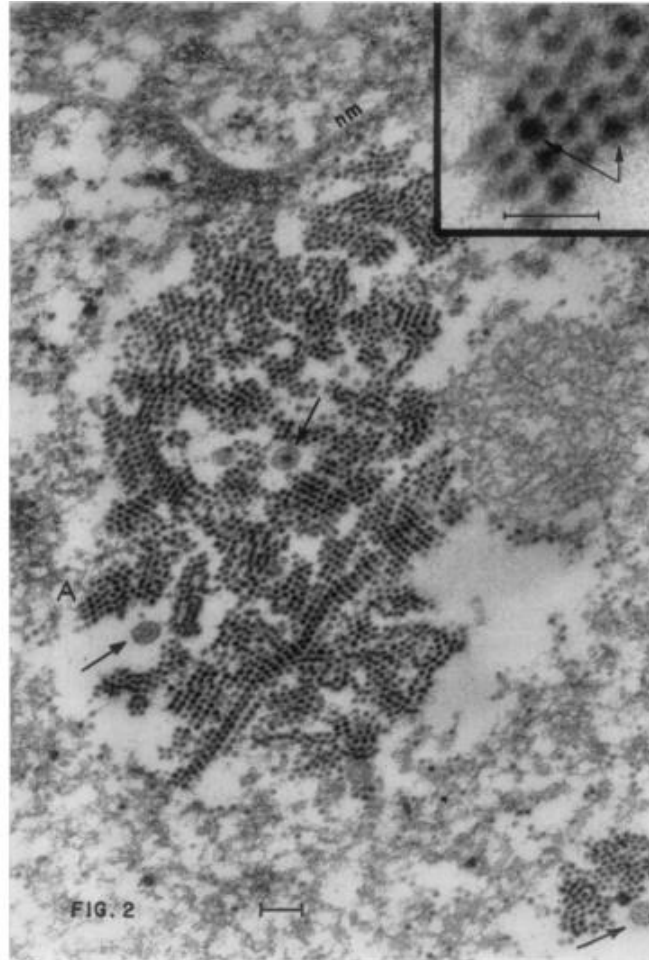


Figure 2 : Agrégats cristallisés d'AAV dans le noyau cellulaire d'une culture cellulaire. D'un diamètre de 60 à 90 nm, les particules d'adénovirus simien 15 sont indiquées par une flèche dans l'image principale. nm : membrane nucléaire. Echelle, 1000 Å. Des particules d'AAV sont montrées à plus fort grossissement en haut à droite. Des noyaux denses d'AAV entourés de protéines de capsid moins denses (flèches) sont observés. Échelle, 500 Å. (Atchinson et al, 1966)

L'AAV est un virus non-enveloppé possédant une capsid icosaédrique. Sa structure cristallographique a été décrite en 2002 (Xie et al., 2002). Ce virus a besoin de l'aide d'un virus auxiliaire pour se répliquer (Atchison et al., 1965).

A. Le génome de l'AAV sauvage

Le génome de l'AAV est une molécule d'ADN simple brin linéaire d'environ 4,7 kb de longueur (Rose et al., 1969). Il contient 2 séquences terminales répétées inversées (ITR) de 145 nucléotides (Lusby et al., 1980) qui encadrent 3 cadres de lecture (ORF : *Open reading Frame*): *rep*, *cap* et *AAP* (*assembly-activating protein*) ainsi que 4 promoteurs viraux identifiés par leur position dans le génome : p5, p19, p40 et p81 (**Figure 3**).

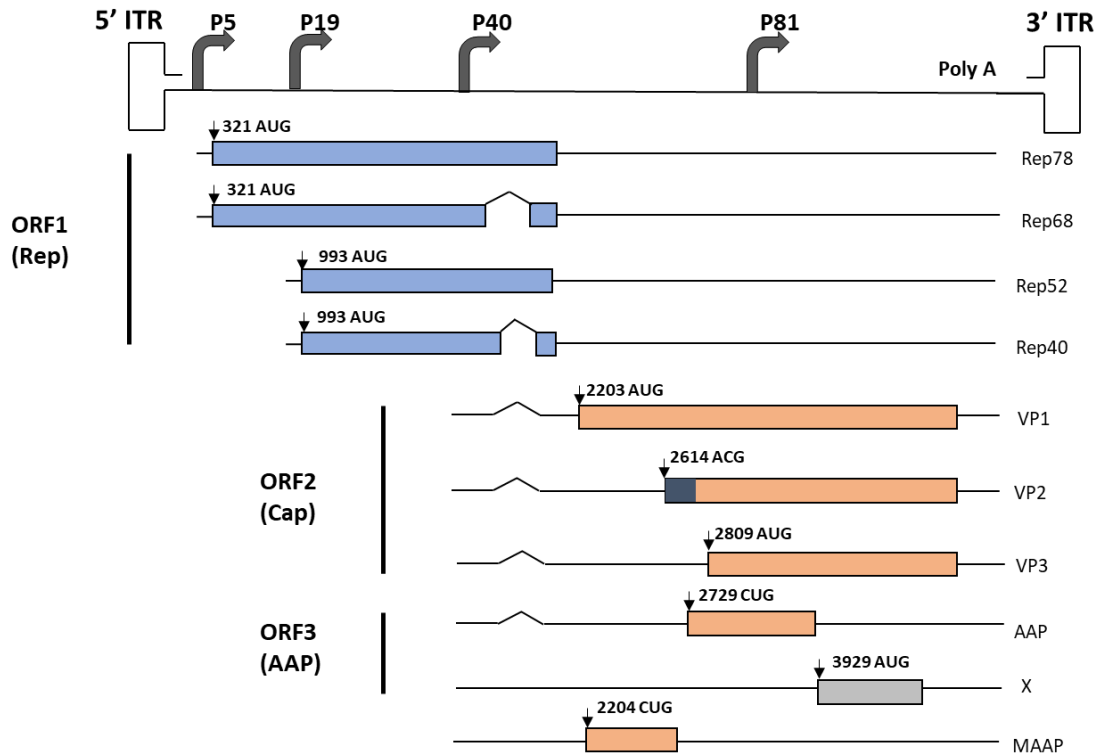


Figure 3 : Organisation du génome de l'AAV

Le génome est composé de 3 cadres de lecture encadrés par 2 ITR. L'un code pour les protéines Rep, l'autre pour les protéines de capsides et le dernier pour l'AAP. Les ITR sont des séquences palindromiques de 145 pb qui forment des structures en épingle à cheveux par appariement de paires de bases. Le gène *rep* à gauche encode 4 protéines non-structurales nommées Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40. Le promoteur interne p5 régule la transcription de Rep78 et Rep68 alors que p19 contrôle celle de Rep40 et Rep52. Le gène *cap* est transcrit depuis le promoteur interne p40 pour donner les protéines VP1, VP2 et VP3. Un cadre de lecture alternatif code pour l'AAP et le gène X. MAAP : *Membrane-associated accessory protein* (d'après Balakrishnan et Jayandharan 2014).

Les ITR sont composées de séquences palindromiques (A-A', B-B' et C-C') de 125 bases formant des structures en « épingle à cheveux » par appariement de bases complémentaires (Berns and Kelly, 1974; Koczot et al., 1973; Lusby et al., 1980, 1981; Spear et al., 1977) (**Figure 4**). Les 20 bases restantes non appariées sont appelées séquence D (X. S. Wang et al. 1997). Les ITR possèdent également un site de fixation de la protéine rep (RBE) ainsi qu'un site de clivage appelé site de résolution terminale (trs). Il est important de noter que la séquence D de l'AAV2 contient un site de fixation putatif pour un facteur de répression de la voie NF- κ B (*nuclear factor κ B*) (Ling et al., 2015a) (cf. p48). Les ITR sont les seuls éléments *cis* nécessaires à la réplication du génome et à son encapsidation. Lors de l'empaquetage de l'ADN viral dans la capsid, aussi bien des brins sens et anti-sens sont encapsidés, et ce avec la même efficacité (Zhou and Muzyczka, 1998). Les ITR et les

séquences adjacentes sont également impliquées dans l'intégration du génome viral et dans la réactivation du génome intégré (cf. p33).

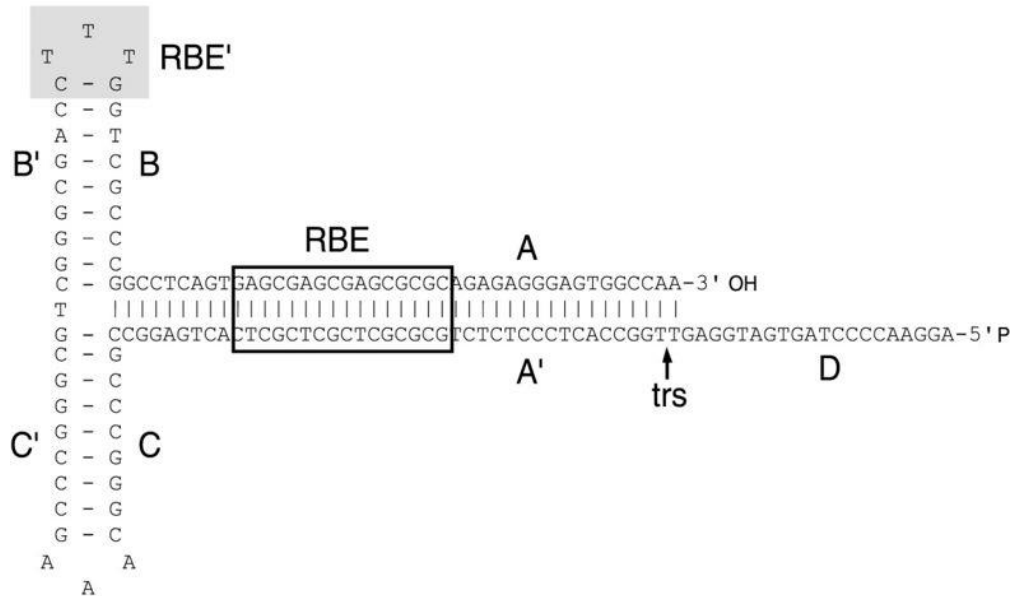


Figure 4 : Structure secondaire des ITR de l'AAV2.

Les ITR servent d'origine de répllication et sont composés de parties palindromiques (A-A', B-B' et C-C'). La séquence D est présente en un seul exemplaire à chaque extrémité du génome et reste donc sous-forme simple brin. La séquence encadrée correspond au site de fixation de Rep, RBE (Gonçalves, 2005).

Le gène *rep* code 4 protéines non structurales nécessaires à la répllication du virus et nommées en fonction de leur poids moléculaire: Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40 (**Figure 3**) (Im and Muzyczka, 1992). Les protéines Rep78 et Rep68 sont impliquées dans différentes étapes du cycle de l'AAV (cf. p33):

- la répllication de l'ADN (Balakrishnan and Jayandharan, 2014; Gonçalves, 2005);
- l'intégration site-spécifique du génome viral dans le génome de l'hôte et son excision (Linden et al., 1996; Young et al., 2000; Zarate-Perez et al., 2013);
- la régulation de l'expression des gènes viraux (Pereira et al., 1997)
- la mise en place de la latence virale (Berns and Giraud, 1996; Im and Muzyczka, 1992; Saudan et al., 2000; Yoon-Robarts and Linden, 2003).

Les protéines Rep52 et Rep40 sont des hélicases ADN (Collaco et al., 2003; Smith and Kotin, 1998). Elles participent à la production et l'accumulation de génomes viraux simple

brin à partir des intermédiaires de réplication double brins (Chejanovsky and Carter, 1990). Elles sont également impliquées dans l'encapsidation du génome viral dans les capsides formées (King et al., 2001), les génomes viraux sens comme anti-sens sont encapsidés avec la même efficacité (Berns and Adler, 1972; Rose et al., 1969).

Cap code 3 protéines de structures formant la capside virale icosaédrique : VP1 (87 kDa), VP2 (72 kDa) and VP3 (61 kDa) (**Figure 3**). Leur transcription est initiée à partir du promoteur p40 qui génère 2 transcrits : le transcrit non épissé donnera la protéine VP1 et le variant d'épissage donnera VP2 via le codon d'initiation conventionnel (ATG) et VP3 via un codon *start* alternatif (ACG). Il faut 60 copies des protéines VP1, VP2 et VP3 assemblées avec un ratio moléculaire d'environ 1 : 1 : 10 respectivement pour former une capside virale.

Un cadre de lecture alternatif en amont de VP3 codant l'AAP par le biais d'un codon de début de traduction non conventionnel (CTG) a également été décrit. L'AAP est requise pour l'assemblage de la capside de certains sérotypes d'AAV (Sonntag et al., 2010). Un autre gène, nommé gène X a été identifié à l'extrémité 3' du génome de l'AAV. Il serait régulé par le promoteur p81 et une protéine d'environ 18 kDa dont le rôle reste inconnu (Cao et al., 2014; Hermonat et al., 1999). Très récemment, un nouveau cadre de lecture conservé entre les différents serotypes a été identifié. Cet ORF code une protéine nommée Protéine Accessoire Associée à la Membrane (MAAP) qui serait impliquée dans la production des virus (ASGCT 2019).

B. Les sérotypes naturels de l'AAV

La capside virale a pour rôle de protéger le génome mais c'est également elle qui va interagir avec les éléments de l'environnement du virus comme les anticorps et les cellules. C'est donc un facteur clé dans l'infection des cellules et notamment dans le tropisme cellulaire.

Les AAV sont classés par sérotype selon leur propriété antigénique. Un nouveau sérotype est un virus qui ne réagit pas avec les sérums neutralisants spécifiques des autres sérotypes déjà existants. A ce jour, 13 sérotypes naturels différents ont été identifiés et plus de 100 variants isolés dans divers espèces (Srivastava, 2016). Les AAV 2, 3, 5 et 6 ont été découverts dans des cellules humaines alors que les sérotypes 1, 4 et 7 à 12 sont issus de primates non-humains. Ces derniers sont néanmoins capable de transduire les mêmes cellules chez l'Homme en raison de la forte homologie entre l'Homme et le primate non-humain (Gao et al., 2002). Basées sur la séquence VP1 de la capside, les analyses phylogénétiques réalisées

ont permis de regrouper par ensemble (*clade*) les différents sérotypes (Gao et al., 2004) (Figure 5).

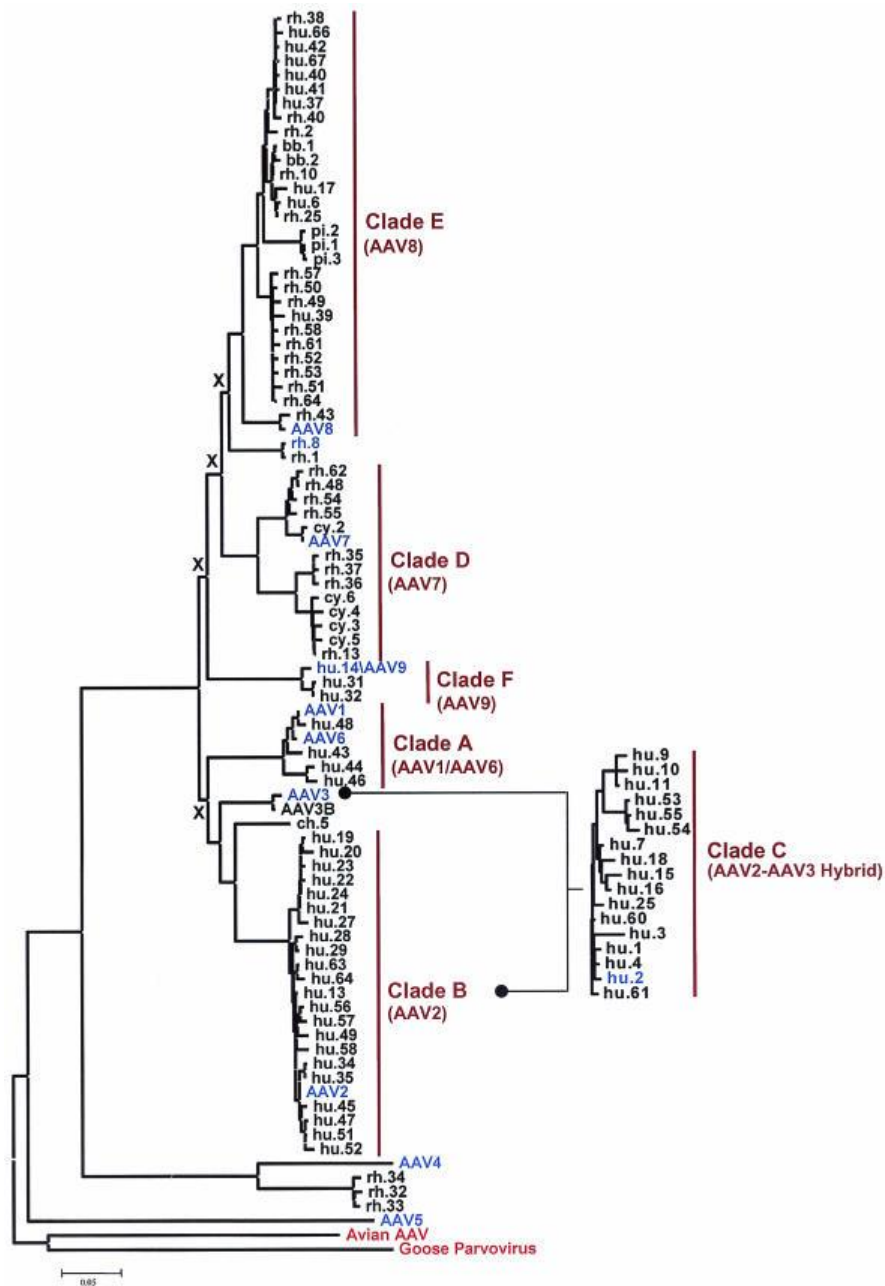


Figure 5 : Phylogénie des différents variants de l'AAV.

Phylogénie de la séquence protéique VP1 des AAV de primates. Les ensembles sont indiqués par leur nom et par des lignes verticales à droite des taxons dont elles sont issues. La nomenclature des taxons est soit le nom du sérotype, soit une référence à la source de l'espèce (hu, humain ; rh, macaque rhesus ; cy, macaque cynomolgus ; bb, babouin ; pi, macaque nemestrina ; ch, chimpanzé), suivi par un numéro indiquant l'ordre dans lequel ils ont été classés. Le *Clade C* a été identifié et il a été déterminé avec certitude qu'il provenait de la recombinaison d'ensembles connus. L'ensemble hybride AAV2-AAV3 est né après un événement de recombinaison (Gao et al., 2004).

La capside permet la fixation du virus aux récepteurs de surface de la cellule cible et facilite le trafic intracellulaire. Par conséquent, les protéines qui la composent déterminent le tropisme du virus : chaque sérotype possède donc un tropisme préférentiel pour un organe, un tissu ou un type cellulaire en fonction des récepteurs et corécepteurs cellulaires avec lesquels il interagit. La capacité naturelle de l'AAV à cibler des tissus spécifiques est un avantage exploité en thérapie génique lors de l'élaboration de la stratégie thérapeutique pour une maladie donnée (cf. p40).

C. L'infection par l'AAV sauvage

1) Internalisation et transport du virus dans la cellule

L'infection ou la transduction d'une cellule par l'AAV se décompose en plusieurs étapes : l'attachement du virus à la cellule, l'internalisation, le trafic intracellulaire et l'import nucléaire (**Figure 6**) (Balakrishnan and Jayandharan, 2014).

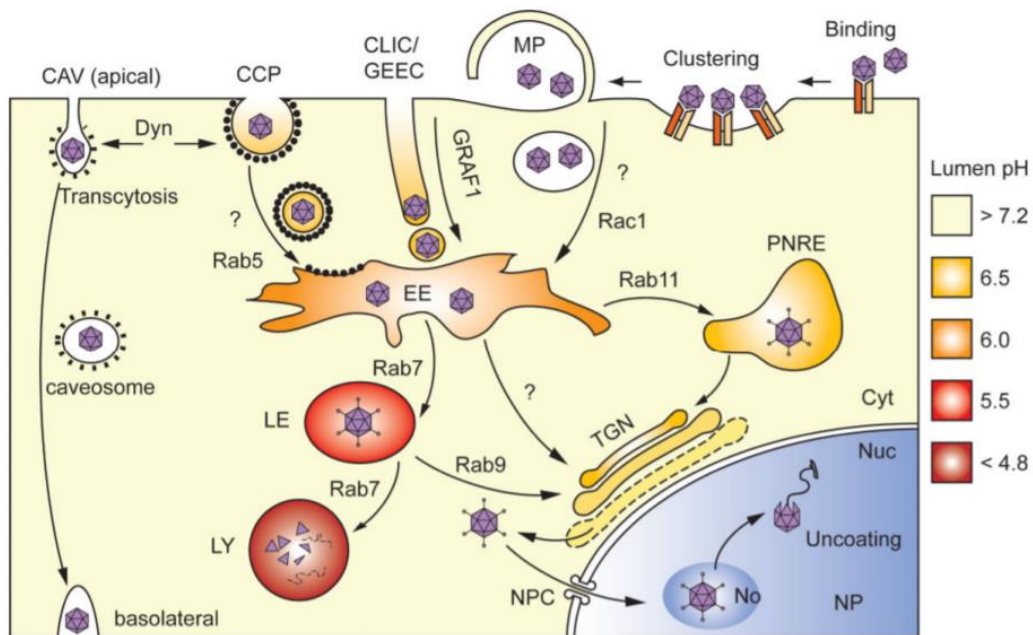


Figure 6 : Modélisation de l'entrée de l'AAV et de son trafic intracellulaire.

Après sa liaison aux récepteurs et corécepteurs, l'AAV entre dans la cellule par macropinocytose (MP) ou par endocytose médiée par l'une des voies suivantes : dépendante de la clathrine (CCP), de la cavéoline (CAV) ou indépendante de la clathrine (CLIC/GEEC). Les virions sont ensuite adressés à l'appareil de Golgi après avoir transité par les endosomes précoces (EE) puis tardifs (LE) ou les endosomes de recyclage (PNRE). Ce transit induit un changement de conformation de la capside qui permet à l'AAV d'échapper aux endosomes ou au Golgi et de pénétrer dans le noyau par l'intermédiaire du pore nucléaire (NPC). Le génome viral est ensuite relargué dans le noyau. (Nonnenmacher and Weber, 2012).

Divers récepteurs primaires et secondaires ont été identifiés pour différents sérotypes d'AAV (Balakrishnan and Jayandharan, 2014) (**Tableau 2**). En général, les AAV semblent utiliser des protéoglycanes comme récepteurs primaires et des protéines O- ou N-glycosylées comme corécepteurs (Akache et al., 2006; Di Pasquale et al., 2003; Kaludov et al., 2001; Qing et al., 1999; Shen et al., 2011; Summerford and Samulski, 1998; Summerford et al., 1999; Wu et al., 2006). Récemment, une étude a également montré, *in vitro* et *in vivo*, l'existence d'un récepteur (AAVR) facilitant l'entrée de plusieurs sérotypes d'AAV (AAV1, 2, 3, 5, 6 et 9) dans la cellule. Ce récepteur est une protéine transmembranaire de type I nommée KIAA0319L qui permettrait une endocytose rapide de l'AAV et un transport jusqu'au trans-Golgi (Pillay et al., 2016) (**Tableau 2**).

Sérotipe	Récepteurs	Co-récepteurs
AAV1	Acide sialique lié au α 2-3 et α 2-6 N	Inconnu, AAVR
AAV2	HSPG	LamR, integrines, FGFR1, HGFR, AAVR
AAV3	HSPG	LamR, FGFR1, HGFR, AAVR
AAV4	Acide sialique lié au α 2-3 O	Inconnu
AAV5	Acide sialique lié au α 2-3 N	PDGFR, AAVR
AAV6	HSPG, Acide sialique lié au α 2-3 et α 2-6 N	EGFR, AAVR
AAV7	Inconnu	Inconnu
AAV8	Inconnu	LamR
AAV9	N-linked galactose	LamR, AAVR
AAVrh10	Inconnu	Inconnu
AAV11po1	Inconnu	Inconnu
AAV12	Inconnu	Inconnu
AAV13	HSPG	Inconnu

Tableau 2 : Récapitulatif des récepteurs cellulaires des sérotypes d'AAV les plus décrits. EGFR: Récepteur de facteur de croissance épidermique; FGFR1: Récepteur du facteur de croissance des fibroblastes 1; HGFR : Récepteur du facteur de croissance des hépatocytes ; HSPG : Protéoglycane héparine sulfate; LamR : Récepteur de la laminine; PDGFR : Récepteur du facteur de croissance des dérivés de plaquettes. (D'après Herrmann et Grimm 2018; Balakrishnan et Jayandharan 2014)

La fixation de l'AAV à son récepteur entraîne ensuite un changement de structure de la capsid qui permet l'entrée du virus dans la cellule par invagination de la membrane plasmique (Levy et al., 2009). Plusieurs mécanismes d'entrée ont été proposés et sont encore débattus. Le premier mécanisme élucidé décrit la formation de vésicules associées à la clathrine (Bartlett et al., 2000). Une deuxième alternative décrit l'endocytose associée à la

dynamine (Bartlett et al., 2000; Duan et al., 1999) et une troisième alternative décrit la voie de la macropinocytose indépendante de la clathrine et de la dynamine (Doherty and McMahon, 2009; Sanlioglu et al., 2000). Mais plus récemment une étude a montré que la principale voie d'entrée de l'AAV2 serait la voie endocytose CLIC/GEEC (Nonnenmacher and Weber, 2012).

Une fois dans la cellule, le virus circule *via* les endosomes et l'appareil de Golgi jusqu'au noyau, cependant les mécanismes de régulation du trafic intracellulaire, de libération et d'entrée dans le noyau restent encore que partiellement élucidés et ont principalement été étudiés pour l'AAV2 et l'AAV2r (celui-ci ayant la même capsidie que l'AAV2 sauvage les mécanismes jusqu'à la désencapsidation devraient être les mêmes) (Johnson et al., 2010; Nonnenmacher et al., 2015; Xiao and Samulski, 2012). L'efficacité du transport jusqu'au noyau dépend de l'échappement des particules d'AAV des endosomes. L'acidification endosomale (pH=5.5 à 6) induit le changement conformationnel de la capsidie et permet l'exposition du domaine de N-terminal de la phospholipase A2 et le signal de relocalisation nucléaire de la protéine VP1 (Sonntag et al. 2006; Nam et al. 2011; Popa-Wagner et al. 2012). Ce changement structural facilite l'échappement de l'endosome par formation de pores dans les endosomes, la translocation du génome viral dans le noyau et l'initiation de l'expression des gènes viraux. L'étape d'entrée de l'AAV dans le noyau est encore sujette à débat. Certaines études ont montré que des particules AAV s'accumulent autour du noyau, ce qui suggère que la désencapsidation se produit juste avant ou pendant l'entrée du noyau (Bartlett et al., 2000; Hansen et al., 2000; Lux et al., 2005; Nonnenmacher and Weber, 2011; Xiao and Samulski, 2012), tandis que d'autres ont montré des signes de désencapsidation complète dans le nucléoplasme, ce qui suggère que le relargage de l'ADN se produit dans le noyau (Johnson and Samulski, 2009; Johnson et al., 2010; Keiser et al., 2011; Sanlioglu et al., 2000; Xiao and Samulski, 2012; Xiao et al., 2002). L'activité protéase de VP1u pourrait également être impliquée (Kurian et al., 2019). Le mécanisme d'entrée de l'AAV dans le noyau proposé implique une interaction entre l'AAV et des importines- β , puis une fixation au complexe de pores nucléaires ce qui induirait une désencapsidation de l'AAV dans le noyau (Nicolson and Samulski, 2014).

2) Latence et réplication de l'AAV sauvage

Une fois l'entrée dans le noyau et la désencapsidation effectuée, le génome viral simple brin de l'AAV est converti en ADN double brin pour permettre sa réplication et

l'expression des gènes viraux. Le génome de l'AAV utilise la machinerie et les polymérases cellulaires pour cette conversion. Ensuite le cycle d'infection de l'AAV est découpé en deux phases distinctes: la phase de latence et la phase répliquative (Atchison et al., 1965; Berns et al., 1975; Hoggan et al., 1966) (**Figure 7**).

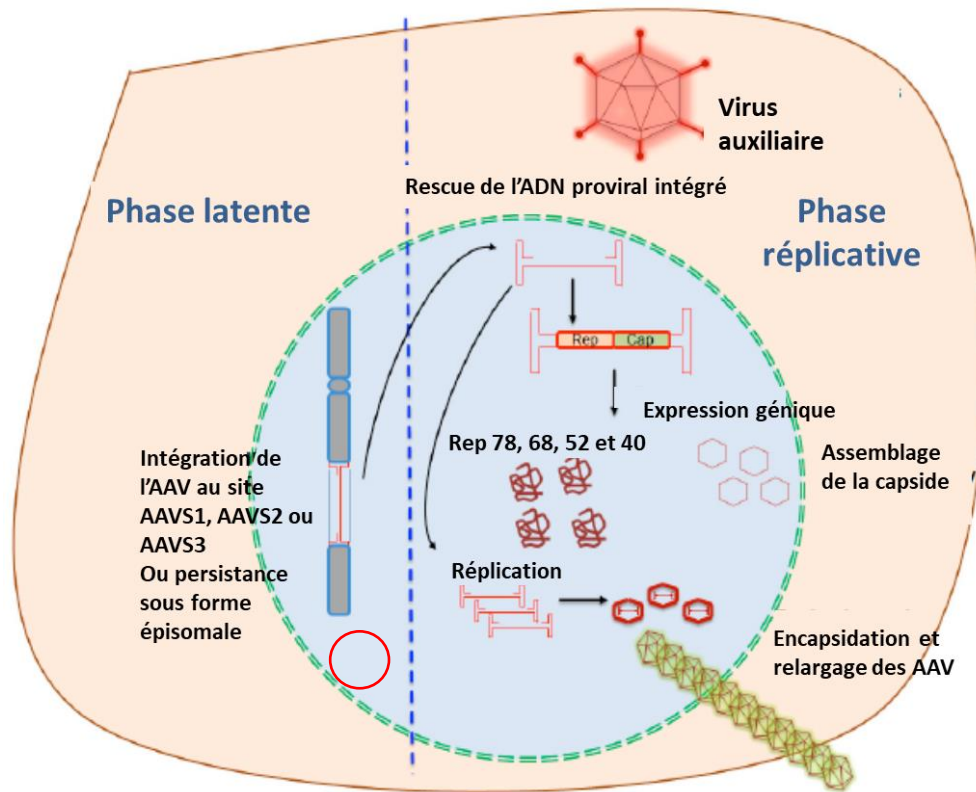


Figure 7 : Cycle de vie de l'AAV

L'AAV a 2 phases distinctes durant son cycle de vie : (1) la phase latente et (2) la phase répliquative. En l'absence d'une infection parallèle avec un virus auxiliaire, l'AAV entre en latence en intégrant son génome dans le génome de l'hôte. La phase répliquative est initiée quand les cellules contenant le génome de l'AAV intégré sont infectées par un virus auxiliaire. Cette phase se caractérise par une série d'évènements comme l'excision du provirus du génome de l'hôte, la répliquation et l'expression des gènes viraux et la production de virions par encapsidation du génome virale. Les virus auxiliaires activent p5 et p40 pour initier la transcription des protéines Rep et Cap. Rep52 et Rep40 participe à l'accumulation et à l'encapsidation du génome simple brin. Les virions AAV sont libérés lors de la lyse de la cellule induite par le virus auxiliaire (Balakrishnan and Jayandharan, 2014).

Comme indiqué précédemment l'AAV est un dependovirus et va donc dépendre d'un virus auxiliaire pour se répliquer. En absence de virus auxiliaire, la répliquation est limitée et l'AAV peut rester en phase de latence en formant des concatémères épisomiques (Schnepp et al., 2005, 2009) ou en intégrant son génome dans certains sites spécifiques du génome de l'hôte (Berns et al., 1975; Cheung et al., 1980; Dutheil et al., 2000; Hüser et al., 2010; Kotin et al., 1990, 1992; Mehrle et al., 2004) tels que:

- AAVS1 au locus 19q13.4 (le premier découvert et le plus fréquent)
- AAVS2 au locus 5p13.3
- AAVS3 au locus 3p24.3.

Le locus AAVS1 est reconnu comme sans risque pour le patient. Néanmoins comme expliquer précédemment l'intégration du génome de l'AAV avoir un rôle dans l'hépatocarcinogénèse (cf p. 25). Ces sites d'intégration correspondent à des séquences RBE conservées dans le génome de l'hôte. Il est donc possible que d'autres sites d'intégration soient découverts dans les prochaines années (Hüser et al., 2010). Les régions de l'ADN où s'intègre le génome AAV sont caractérisées par la présence d'îlots CpG et de tandems GCTC répétés. Le mécanisme d'intégration serait Rep dépendant, en effet ces éléments agissent comme sites de liaison des protéines Rep78/68 impliquées dans la formation des complexes AAVS1-ITR nécessaires à l'intégration *in situ* de l'ADN viral (Balagúe et al., 1997). Par conséquent, compte tenu de la rupture à double brin opérée par les protéines Rep au site d'intégration et du faible degré d'homologie entre l'ADN de l'AAV et la séquence AAVS1, le mécanisme généralement admis pour décrire l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire implique le mécanisme NHEJ (*Non homologous end joining*) (Daya et al., 2009). Néanmoins, toutes les protéines impliquées dans l'intégration des AAV dans le génome de l'hôte n'ont pas encore été répertoriées.

En présence d'un virus auxiliaire, l'AAV passe en phase répllicative. Le virus auxiliaire apporte des gènes qui permettent l'initiation de la réplication de l'ADN viral du génome de la cellule hôte, son encapsidation puis le relargage des virions. L'AAV a plusieurs virus auxiliaires connus : l'adénovirus (Atchison et al., 1965), le virus de l'herpès (HSV) (Buller et al., 1981; Georg-Fries et al., 1984; La Bella et al., 2019), le virus de la vaccine (Schlehofer et al., 1986), le bocavirus 1 humain (Wang et al., 2017), le cytomegalovirus (McPherson et al., 1985), ou encore le papillomavirus (Cao et al., 2012; Ogston et al., 2000). La co-infection par des virus auxiliaires va permettre l'activation des promoteurs de l'AAV (p5, p19 et p40) et la transcription des gènes Rep et Cap. Les promoteurs p5 et p19 sont les premiers à être activés, conduisant à la synthèse des protéines Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40. L'activation ultérieure du promoteur p40 permet la synthèse des protéines de capsid VP1, VP2 et VP3. Le génome viral de l'AAV ne code pour aucune polymérase.

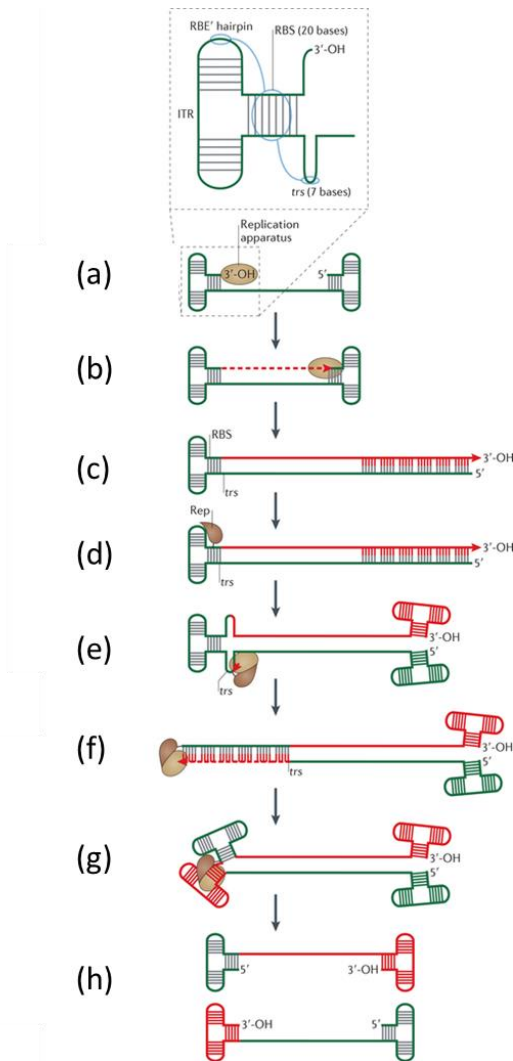


Figure 8 : Schéma du modèle de replication de l'ADN de l'AAV.

(a) Initiation. L'encart montre une organisation schématique de l'ITR, et les cercles bleus indiquent les régions ITR qui interagissent avec les protéines Rep. La réplication est initiée en utilisant la machine de réplication hôte et le groupe 3'-OH libre de l'ITR 3' comme amorce. (b) Réplication. L'ADN polymérase de l'hôte poursuit la réplication de l'ADN AAV jusqu'à la fin du génome. (c) Duplication de la structure ITR terminale 5'. Lorsque la réplication atteint la fin du génome, la structure ITR 5'-terminal est dupliquée. (d) Fixation de Rep. Les protéines Rep se fixent sur les sites de fixation dans l'ITR 3' et joignent l'élément de fixation de Rep (RBE'). (e) Changement de conformation et clivage. Cette liaison provoquerait un changement de conformation de l'ADN au niveau du trs, et pour induire un clivage à médiation Rep au niveau du site trs. (f) Résolution terminale. Le recrutement de la machinerie de réplication de l'hôte permet ensuite la réplication de la structure du fragment terminal 3'. (g) Le repliement des extrémités génère des structures similaires à celles présentes avant l'initiation de la réplication. (h) Relarguage de nouveaux génomes viraux. Le résultat final est un génome viral entièrement répliqué (d'après M. Chandler et al. 2013).

Les ITR, qui sont les seules séquences en *cis* nécessaires à la réplication, servent d'amorces pour une ADN polymérase cellulaire (Ni et al., 1998) lors de l'initiation de la réplication de l'ADN viral (**Figure 8**). La réplication commence par un mécanisme de

déplacement unidirectionnel des brins permis par la structure en épingle à cheveux et le groupe hydroxyle 3' libre qui fournit un site de réplication de départ. La synthèse du deuxième brin conduit à la formation d'ADN double brin qui servent d'intermédiaires de réplication. Une fois la réplication terminée, les protéines Rep interviennent (en particulier Rep78 et Rep68) en se liant aux sites RBE et coupent au niveau du site trs. Une nouvelle extrémité libre de 3' est alors créée, permettant l'arrêt de la réplication du génome AAV (Brister and Muzyczka, 2000). Une multitude de protéines cellulaires (>180) peuvent interagir avec les protéines Rep et pourraient ainsi faciliter la réplication de l'ADN viral (Nash et al., 2009; Nicolas et al., 2010). Quant à la formation de nouveaux virions à partir de cellules infectées, des études ont montré que les protéines de la capsid sont d'abord assemblées en capsides vides préformées, dans lesquelles l'ADN d'AAV simple brin est ensuite transféré (Ruffing et al., 1992).

3) Voies d'infection

Si les différents tropismes de l'AAV sont bien connus car ils sont un atout en thérapie génique, l'infection naturelle de l'Homme par l'AAV a été peu étudiée et la voie d'infection de celui-ci n'est pas connue. En 1992, de l'ADN d'AAV2 sauvage a été détecté dans les cellules sanguines périphériques d'une petite cohorte de donneurs (3,6 % des donneurs testés) (Grossman et al., 1992). En 1994, la présence d'ADN viral de l'AAV2 a également été détecté dans un nombre élevé de biopsies de l'appareil génital féminin (Tobiasch et al., 1994). Ces résultats ont ensuite été confirmés dans un certain nombre d'études avec des fréquences variables selon les cohortes et les échantillons prélevés, menant ainsi à l'hypothèse que l'AAV pourrait être sexuellement transmissible (Freitas et al., 2009; Han et al., 1996; Malhomme et al., 1997; Venturoli et al., 2001; Walz et al., 1997). Parallèlement, la présence d'ADN de l'AAV dans la sphère reproductive masculine a également été détectée, plus particulièrement dans le sperme et les testicules, appuyant ainsi l'hypothèse d'une infection possible par l'AAV par voie sexuelle (Erles et al., 2001; Mehrle et al., 2004; Schlehofer et al., 2012). Mais si cette voie est possible, elle n'est probablement pas unique. En effet, l'étude d'une cohorte de 250 individus d'âges et d'origines diverses a montré que l'ADN de l'AAV est largement disséminé parmi les tissus humains comme le foie, la moelle osseuse, la rate, les poumons, le cerveau et les reins (Gao et al., 2004). La détection d'ADN de l'AAV dans le foie, la rate et le système digestif suggère une transmission virale par voie gastro-intestinale. Il a également été postulé que de nombreuses infections AAV primaires surviennent pendant la petite enfance, une équipe a caractérisé la fréquence et la complexité des isolats d'AAV en

circulation dans divers tissus pédiatriques humains (Chen et al., 2005). Sur les 175 échantillons de tissus analysés, l'ADN issue du génome de l'AAV2 a pu être détecté dans seulement 9 échantillons (amygdales, rate et poumon). De plus, le taux de détection des séquences d'ADN de l'AAV dans les échantillons de tissus correspondait à la fréquence de la séropositivité dans la population locale (environ 12 %). Pour expliquer la dissémination de l'ADN d'AAV dans le corps, les auteurs se sont efforcés de proposer un modèle d'infection selon lequel l'AAV pénètre dans l'organisme par l'oropharynx, en même temps que les adénovirus dont ils dépendent pour établir des cycles viraux productifs. Dans les cellules de l'oropharynx, plusieurs cycles de réplication de l'AAV seraient réalisés avant que le processus infectieux soit interrompu par le système immunitaire de l'hôte. Entre-temps, l'AAV aurait la possibilité de se propager aux poumons adjacents, aux tissus distants par la circulation sanguine et aux organes lymphoïdes par les vaisseaux lymphatiques. Néanmoins l'adénovirus n'est pas le seul virus auxiliaire de l'AAV et une infection concomitante avec d'autres virus comme celui de l'Herpès est possible. L'ensemble de ces études montrent une prévalence importante de séquences endogènes de l'AAV disséminées dans le corps humain, suggérant une forte occurrence des infections naturelles par l'AAV. Mais en revanche, elles n'ont pas permis de déterminer le mode de transmission et la voie d'entrée préférentielle de l'AAV. Il faut également noter que ces études se concentrent majoritairement sur l'AAV2 et que les infections naturelles par d'autres sérotypes sont peu étudiées.

II. L'AAV recombinant

Le vecteur AAV ou AAVr fait son apparition en 1984. La capsidite du virus sauvage de l'AAV2 a tout d'abord été utilisée pour insérer un gène thérapeutique dans des cellules de mammifères *in vivo* (Hermonat and Muzyczka, 1984; Tratschin et al., 1984). En termes de sécurité, la non-pathogénicité de l'AAV est assurément l'un de ses principaux avantages en tant que vecteur. La dépendance aux virus auxiliaires pour la réplication de l'AAV limite les risques de recombinaison virale et de réplication autonome. De plus, l'ADN de AAV persiste principalement sous forme d'épisomes dans le noyau de l'hôte, et si l'intégration dans le génome de l'hôte a lieu, ce sont des *loci* particuliers qui sont considérés comme sûrs, ce qui limite globalement le risque de mutagenèse par insertion. L'AAV étant capable d'infecter à la fois les cellules au repos et en division (*in vitro* et *in vivo*), tous les types de cellules pourraient en théorie être transduits avec des vecteurs AAV, le facteur limitant étant la capacité de l'AAV à pénétrer un type cellulaire spécifique. Sur ce point, la présence naturelle

de nombreux sérotypes et variants de l'AAV permet la construction d'une large gamme de vecteurs aux spécificités de transduction caractéristiques.

A. Le génome de l'AAVr

Les vecteurs AAV recombinants sont directement basés sur l'AAV sauvage mais leur génome est vide de tout gène viral afin d'empêcher la génération de particules compétentes pour la réplication. Les gènes Rep et Cap sont donc remplacés par la cassette d'expression le plus souvent constituée d'un promoteur (ubiquitaire ou tissu spécifique), d'une séquence codante (un gène thérapeutique ou une autre séquence en fonction de la stratégie) et d'un signal de poly-adénylation. En revanche, les ITR sont conservées car elles sont les seules séquences virales en *cis* nécessaires à l'encapsidation. Dans la plupart des vecteurs, les ITR du sérotype 2 sont utilisées. Cela permet la réplication du génome recombinant à l'aide de protéines Rep de l'AAV2 et l'encapsidation du génome recombinant dans la capsid de différents sérotypes, à l'exception de la capsid AAV5 pour lequel les ITR du sérotype 5 sont utilisées (Chiorini et al., 1999). Les séquences Rep et Cap nécessaires à la production sont fournies en *trans* (McLaughlin et al., 1988; Xiao et al., 1997). La séquence Cap déterminera le sérotype de l'AAVr. Du fait de la déplétion du gène Rep, le génome de l'AAVr ne devrait pas pouvoir s'intégrer au génome de la cellule hôte et persiste donc majoritairement sous forme épisomale ce qui diminue considérablement le risque de mutagénèse insertionnelle (Clark and Penaud-Budloo, 2011; Duan et al., 1998; Nowrouzi et al., 2012; Penaud-Budloo et al., 2008). L'intégration de génomes recombinants dans l'ADN de la cellule hôte (ou l'ADN mitochondrial) semble très rare mais est tout de même à prendre en considération pour la sûreté des AAVr. En effet, des sites d'insertions ont tout de même été détectés chez le primate non-humain et chez l'homme (Gil-Farina et al., 2016; Nowrouzi et al., 2012).

L'AAVr peut encapsider jusqu'à 5kb sous la forme d'ADN simple brin (ssAAVr). La longueur du génome de l'AAVr pour une encapsidation optimale se situe entre 4,1 et 4,9 kb (Dong et al., 1996).

Pour permettre l'expression du transgène le génome simple brin doit être converti en ADN double brin et ce processus a été identifié comme limitant dans l'efficacité de la transduction par l'AAVr car dépendant des protéines de la cellule hôte. Des vecteurs AAV à ADN double brin ont donc fait leur apparition, ils sont dénommés scAAV (AAV *self-complementary*) en opposition aux ssAAV. Ces vecteurs ont émergé suite à l'observation de la capacité des AAV à encapsider deux copies de génome viral si celui-ci fait la moitié de la

taille maximale encapsidable (Dong et al., 1996). Les premiers vecteurs scAAV ont été produits en supprimant le trs d'un des ITR. Ces vecteurs scAAV ainsi produits ont montré une efficacité de transduction supérieure à celle des ssAAV aussi bien *in vitro* dans une vingtaine de lignées cellulaires différentes, qu'*in vivo* dans le muscle, le cerveau et les hépatocytes murins (McCarty et al., 2001, 2003; Wang et al., 2003). Cependant, ces vecteurs semblent également déclencher une réponse immune plus forte en raison de la détection d'ADN double brin par l'immunité innée et notamment des CpG non méthylés par le *Toll-like receptor 9* (TLR9) (Martino et al., 2011a). Bien que ce type de vecteur ne soit pas applicable à toutes les pathologies compte-tenu de sa faible capacité d'encapsidation (<2500 pb), il permet une meilleure efficacité de transduction des cellules et une expression du transgène plus rapide dans certains cas (Wang et al., 2003).

B. La capside de l'AAVr

La grande variété de sérotypes et de variants de l'AAV et leur tropisme varié a permis de créer d'une large gamme d'AAVr capables de cibler des organes différents (**Figure 9**). Il est important de noter que le tropisme d'un sérotype donné peut varier selon l'espèce infectée et la voie d'injection. Cela doit être pris en compte lors des études précliniques.

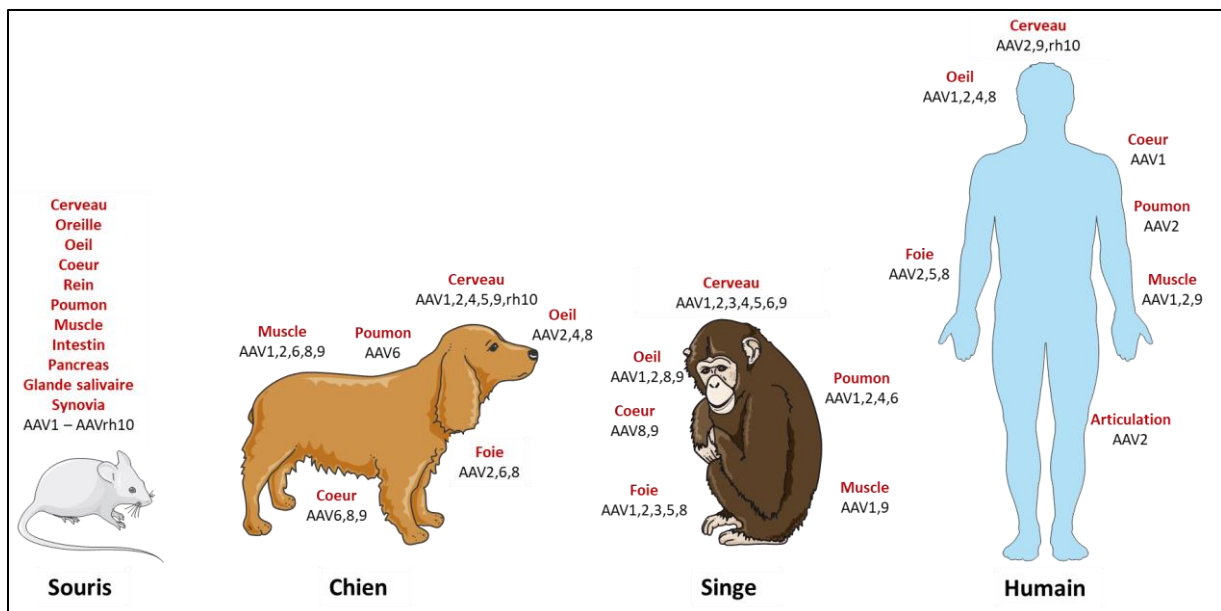


Figure 9: Représentation schématique de l'utilisation des sérotypes d'AAVr dans divers modèles animaux et chez l'Homme.

Représentation schématique des modèles animaux les plus utilisés pour évaluer l'efficacité du transfert de gène *via* des AAVr. Différentes voies d'administration pour cibler les différents tissus et organes peuvent être utilisées et impactent le niveau de transduction des AAVr. (d'après Srivastava 2016; Lisowski, Tay, et Alexander 2015)

Dans la plupart des essais cliniques actuels, les capsides des AAV sauvages sont utilisées. L'AAV2 étant le sérotype le premier identifié et donc le mieux caractérisé il a également été le premier sérotype utilisé comme vecteur viral dans des essais cliniques pour le traitement de la mucoviscidose (Wagner et al., 1998), l'hémophilie B (Kay et al., 2000) ou encore l'amaurose congénitale de Leber (Simonelli et al., 2010). A l'heure actuelle d'autres sérotypes sont utilisés notamment en raison de leur tropisme souvent plus optimal pour un tissu donné (**Figure 9**). Par exemple, les AAV de sérotypes 1 et 9 transduiraient plus efficacement les muscles squelettiques (Brantly et al., 2009; Katwal et al., 2013). Pour le foie, les sérotypes 2, 5 et 8 sont les plus utilisés notamment pour traiter l'hémophilie (Nathwani et al., 2011). L'AAV9 est également utilisé pour cibler le système nerveux central ainsi que l'AAV10 (Dayton et al., 2012). Pour les maladies touchant l'œil, les sérotypes les plus utilisés sont le 2, 4, 5, et 8, chacun ciblant un/des types cellulaires donnés: l'AAV4 est décrit pour transduire préférentiellement les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (Weber et al., 2003) alors que l'AAV5 va plutôt cibler les photorécepteurs (Lotery et al., 2003).

En dépit des succès avec les AAVr possédant une capside de sérotype naturel de l'AAV, des stratégies ont également été mises au point ces dernières années afin de générer de nouveaux variants synthétiques optimisés pour une application donnée afin de produire des vecteurs avec une meilleure efficacité de transduction, capable d'échapper au système immunitaire et plus spécifiques. Pour générer ces variants plusieurs stratégies sont appliquées:

- La mutation rationnelle ou aléatoire ponctuelle d'acides aminés pour augmenter l'efficacité de transduction et le trafic intracellulaire (Li et al., 2012a; Zhong et al., 2008) ;

- L'insertion de peptides dans la capside virale afin de cibler des récepteurs cellulaires spécifiques et de modifier le tropisme du vecteur ou d'échapper à la réponse immunitaire préexistante (Bartel et al., 2011) ;

- La combinaison de fragments de séquence issus de séquences de capside de différents sérotypes d'AAV, appelée plus couramment « shuffling », pour construire une capside chimère avec des propriétés structurales intéressantes (Asokan et al., 2010; Bowles et al., 2012).

Avec multiples possibilités offertes par la vectorologie de l'AAV, un nombre de plus en plus important de sérotypes naturels ou synthétiques atteignent l'évaluation clinique, mais

la majorité des vecteurs actuellement utilisés sont dérivés des sérotypes naturels notamment en raison des difficultés à produire ces variants synthétiques.

C. La production de l'AAVr

A l'heure actuelle, il existe plusieurs plateformes de production d'AAVr (**Figure 10**). La méthode historique, qui reste la plus utilisée pour produire des vecteurs AAVr de grade « recherche », est la transfection transitoire de cellules productrices HEK293 (*Human embryonic kidney cells*) avec 2 ou 3 plasmides : un plasmide vecteur portant le transgène flanqué par les ITR, un plasmide codant les gènes *rep* et *cap* du sérotype choisi et un plasmide auxiliaire apportant les gènes *helpers* adénoviraux E4, E2A and V4 essentiels à la production (Gonçalves, 2005; Matsushita et al., 1998; Xiao et al., 1998). Ces 2 derniers peuvent être combinés dans un seul plasmide. La triple transfection permet de changer de sérotype simplement en changeant le plasmide Rep/Cap. Il est important de noter que la transfection de cellules productrices avec plusieurs plasmides est une étape majeure de limitation de la production à grande échelle. Plusieurs groupes ont optimisé ce procédé pour en augmenter l'efficacité (Ayuso, 2016; Schnödt and Büning, 2017). Il existe également une 2^{ème} technique un peu moins courante qui utilise des virus Herpès Simplex recombinant (HSVr) sous la forme d'un virus sauvage ou incapable de se répliquer en co-infection dans des cellules de mammifères (HEK293 ou BHK) plutôt que des plasmides (Adamson-Small et al., 2016, 2017). La 3^{ème} technique, des lignées cellulaires productrices exprimant de façon stable les fonctions Rep, Cap, adénovirales ou d'HSV-1 ont été développées mais restent peu utilisées (Chadeuf and Salvetti, 2010; Gao et al., 2002; Qiao et al., 2002; Toublanc et al., 2004).

Ces systèmes, bien qu'efficaces, sont des freins à la production de grande quantité car les cellules HEK293 sont adhérentes. Or, les essais cliniques nécessitent d'importante quantité de vecteurs. Des systèmes de culture de HEK293 en suspension ont été mis au point et atteignent un rendement équivalent mais permettent l'utilisation de bioréacteurs et donc une augmentation des productions (Hildinger et al., 2007; Park et al., 2006). En 2002, une autre plateforme de production a émergé utilisant un système de vecteur d'expression de baculovirus (BEVS) (Urabe et al., 2002) en cellules d'insectes SF9 en suspension, permettant donc également un système de production en bioréacteurs (Galibert and Merten, 2011; Negrete and Kotin, 2008).

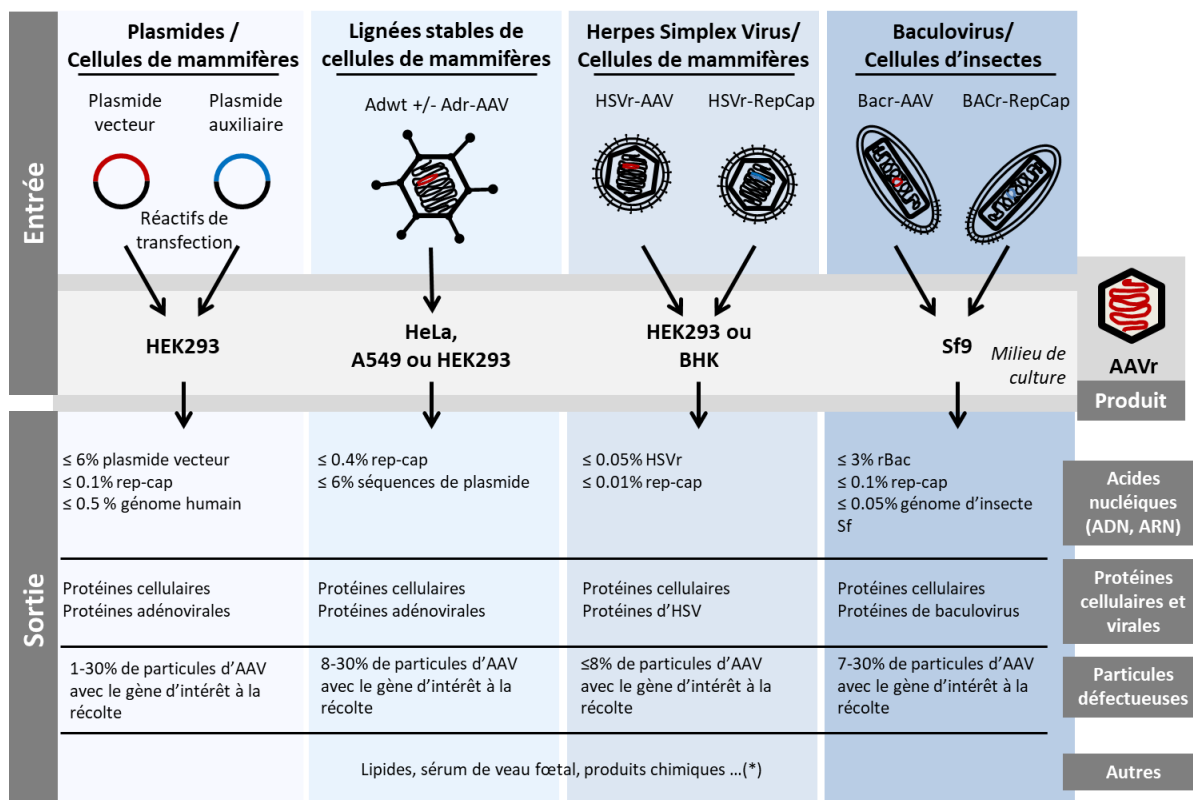


Figure 10 : Schéma des différentes méthodes de production d'AAVr et des impuretés générées.

(*) : dépend du milieu de la composition du milieu de culture et des techniques de lyse utilisés. D'après Penaud-Budloo et al. 2018.

Pour obtenir des lots de vecteurs AAVr, les particules AAVr doivent ensuite être récupérées à partir des cellules productrices, purifiées et concentrées. Les cellules productrices sont d'abord lysées. Les composants cellulaires sont éliminés par filtration ou centrifugation, et les particules d'AAV sont précipitées et ensuite purifiées. Les 2 méthodes de purification les plus couramment utilisées à petite échelle sont les gradients de chlorure de césium ou d'iodixanol. Concernant les productions à grande échelle, des procédés de purification basés sur l'utilisation d'une combinaison de chromatographie d'échange d'ion et d'affinité sont en général utilisés et compatibles pour la clinique. Cependant, ce type de purification ne permet encore de séparer les particules vides et pleines ce qui représente un risque notamment pour l'immunogénicité des AAVr.

Diverses technologies prometteuses sont donc actuellement en cours de développement mais la production de grands lots de vecteurs AAVr nécessite également la mise en place de méthodes de contrôles de qualité pertinents pour caractériser les lots de vecteurs. Les résultats obtenus *in vivo* ont démontré une relative sûreté des vecteurs générés avec les techniques décrites précédemment. Pour la caractérisation des lots de vecteurs AAVr,

il est nécessaire de déterminer le titre de la production virale en génome viraux (vg) par millilitre et le ratio de capsides vides/pleines mais il est également nécessaire de vérifier la présence de contaminants. En effet, il a été montré que des séquences d'ADN procaryotes pouvaient être encapsidées et retrouvées *in vivo* après injection de l'AAVr (Chadeuf et al., 2005). On peut également retrouver des ADN et protéines cellulaires ou virales (Lecomte et al., 2015; Nony et al., 2003; Penaud-Budloo et al., 2017; Ye et al., 2011) en fonction des techniques de production utilisées (**Figure 10**). Ces impuretés peuvent provoquer des effets délétères pour le transfert de gène *in vivo*, en provoquant une toxicité ou un effet adjuvant pour la réponse immune de l'hôte. Le développement de technologies efficaces et innovantes pour caractériser les productions de vecteurs AAVr, en particulier celles utilisées dans les essais cliniques, constitue désormais un axe de recherche majeur.

Actuellement, il n'existe pas de standards concernant la production des vecteurs ce qui est également essentiel pour le domaine dans l'avenir. Ceci dit, il existe déjà des lots standards d'AAV2r et AAV8r produits et caractérisés par un groupe international composé de 16 laboratoires (Ayuso, 2016; Lock et al., 2010).

Ainsi et même si les procédés de production d'AAVr nécessitent encore bien des développements pour optimiser la qualité, mieux caractériser et standardiser les lots produits tout en réduisant le coût de production à grande échelle, il est aujourd'hui possible de produire des lots de vecteurs AAVr suffisamment caractérisés à grande échelle sous les normes BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication) pour des applications cliniques. Ceci a permis de basculer dans une nouvelle ère d'applications cliniques de l'AAVr nécessitant l'administration systémiques de fortes doses d'AAVr.

D. Succès et limitations de l'AAVr

La thérapie génique via l'AAVr est devenue une réalité. Depuis les premières tentatives de transfert de gènes dans des lignées cellulaires *in vitro* (Hermonat and Muzyczka, 1984), les vecteurs AAVr ont rapidement évolué vers les modèles animaux précliniques de maladies humaines. Ils ont montré qu'ils permettaient une expression stable de nombreux gènes *in vivo* par une seule administration sans incident indésirable majeur et avec une amélioration des symptômes dans divers tissus cibles comme la rétine (Acland et al., 2001), les muscles squelettiques (Arruda et al., 2005; Goyenvalle et al., 2004; Herzog et al., 1997) ou le foie (Chandler and Venditti, 2012; Jiang et al., 2006a). L'AAVr est donc rapidement devenu un vecteur de choix pour le transfert de gène thérapeutique *in vivo* et est aujourd'hui

couramment utilisé en essai clinique de thérapie génique. En effet, ses nombreux sérotypes, l'encapsidation d'un génome double brin de l'AAVr ou encore l'optimisation de la production de ce vecteur sont des avancées qui ont fait de ce produit une des plates-formes de transfert de gène *in vivo* les plus performantes.

Actuellement 185 essais cliniques sont en cours pour le traitement de maladies génétiques (U.S. National Library of Medicine : clinicaltrials.gov) et les premiers succès sont maintenant rapportés pour plusieurs maladies héréditaires monogéniques telles que l'amaurose congénitale de Leber de type 2, une dégénérescence rétinienne (Bainbridge et al., 2015) ou l'hémophilie B, un trouble de la coagulation lié à l'X (Nathwani et al., 2014). Le premier traitement de thérapie génique par vecteur AAV a été également mis sur le marché en 2012 en Europe. Il s'agit du Glybera®, développé pour le traitement du déficit familial en lipoprotéine lipase, il consiste à injecter dans les muscles de la jambe un AAV1r codant pour la lipoprotéine lipase humaine. Depuis le Luxturna® a été approuvé par la FDA fin 2017, il est le premier traitement de thérapie génique *in vivo* autorisé aux USA. Ce médicament a démontré une efficacité à combattre une dystrophie rétinienne qui mène à la perte de la vision par injection sous rétinienne d'un AAV2r codant pour la protéine RPE65 (Russell et al., 2017). Le dernier en date, le Zolgensma® a été approuvé par la FDA dans le cadre du traitement de l'amyotrophie spinale (SMA) de type 1 et consistant à injecter en systémique un AAV9r contenant le transgène SMN1 (Hoy, 2019).

Il existe tout de même deux limitations majeures à ces vecteurs. La première est la capacité d'encapsidation. En effet, la cassette d'expression doit faire au maximum 4,7kb pour des vecteurs simple brin cela est suffisant pour une grande partie des transgènes mais cela peut être limitant pour certains comme la dystrophine, gène atteint dans la myopathie de Duchenne, par exemple. Dans ce genre de cas, il est parfois possible d'optimiser la taille des séquences promotrices, du signal de polyadénylation ou du transgène.

La seconde limitation majeure est la réponse immunitaire. Celle-ci peut être dirigée contre le produit du transgène et/ou contre la capsid même si l'AAVr est décrit comme peu immunogène comparé à des vecteurs comme l'adénovirus. L'injection d'AAVr dans des modèles de gros animaux et plus récemment chez l'Homme a montré qu'il était capable d'induire aussi bien une réponse humorale que cellulaire, qu'elle soit dirigée contre la capsid et/ou le produit du transgène limitant ainsi considérablement la réinjection de vecteur AAVr et pouvant même rendre le traitement inefficace (cf. p47).

Dans le cadre d'une réponse anti-capside, les AAV sauvages pouvant naturellement infecter l'homme, une immunité acquise préexistante peut survenir contre les différents sérotypes (Rabinowitz et al., 2019; Vandamme et al., 2017). Ainsi, ces réponses se sont avérées problématiques en matière d'efficacité du transfert de gène, car en fonction du type de réponse, elles peuvent bloquer l'infection par l'AAVr ou entraîner une expression à court terme du gène thérapeutique accompagnée d'une toxicité transitoire mais qui a néanmoins un impact sur l'efficacité du transfert de gène. Une compréhension détaillée de l'interaction des vecteurs AAV avec le système immunitaire est donc d'une grande importance pour la sécurité et le succès des applications en thérapie génique, cette constatation a initié les recherches sur l'immunogénicité de l'AAVr.

Partie 3: La réponse immune dirigée contre l'AAV

Le système immunitaire est défini comme l'ensemble des mécanismes de défense de l'organisme contre tout élément causant une rupture dans l'homéostasie, qu'il s'agisse de bactéries, de virus ou de parasites. Mais le système immunitaire doit également maintenir une tolérance adéquate pour permettre la tolérance du soi, du microbiote et éviter les allergies. Afin d'assurer cette défense l'organisme possède des tissus dits organes lymphoïdes qui permettent la différenciation des cellules immunitaires (organes lymphoïdes primaires) ou l'initiation d'une réponse contre un pathogène (organes lymphoïdes secondaires). L'immunité est divisée en deux composantes étroitement liées : l'immunité innée, précoce et non-spécifique, et l'immunité adaptative, plus tardive mais spécifique. Cette dernière assure également la mémoire immunologique : après l'activation du système immunitaire par un pathogène, l'individu conserve (parfois à vie) un pool de cellules immunitaires mémoire spécifiques de ce pathogène, qui peuvent être réactivées rapidement en cas de nouvelle rencontre avec le même pathogène.

La défense contre les infections virales constituant l'une des fonctions clés de notre système immunitaire, il n'est pas surprenant que les vecteurs viraux puissent induire des réponses immunitaires chez l'hôte. Ainsi, l'Homme étant un hôte naturel de l'AAV sauvage, il peut développer, lors d'infections naturelles, des réponses immunitaires contre les antigènes dérivés du virus. Des cellules mémoire spécifiques de l'AAV peuvent donc persister tout au long de la vie, et être réactivées pendant le transfert de gène médié par l'AAVr. Les AAVr ne contiennent aucun gène viral. Par conséquent, les seules sources d'antigènes étrangers apportées pendant le transfert de gènes sont la capsid virale, l'ADN du vecteur et le produit transgénique. Ici, nous nous intéresserons tout particulièrement aux réactions immunitaires spécifiques de la capsid chez l'homme. Bien que nous ne le détaillerons pas dans cette thèse, il faut tout de même noter que la réponse immune anti-transgène peut également constituer un obstacle à l'efficacité et à la sûreté du transfert de gène, et que celle-ci diffère en fonction du transgène, de l'organe cible et de la voie d'administration.

Bien que la réponse anti-AAV puisse être bénéfique pour des approches vaccinatoires ou anti-tumorales, dans la plupart des autres cas, elle n'est pas désirée et constitue un effet adverse à l'administration du vecteur. En effet, l'élimination du vecteur lui-même, ou des cellules transduites par le vecteur, diminue l'intensité et la durée de l'expression du produit

transgénique, ce qui peut nuire significativement à l'efficacité thérapeutique du transfert génique.

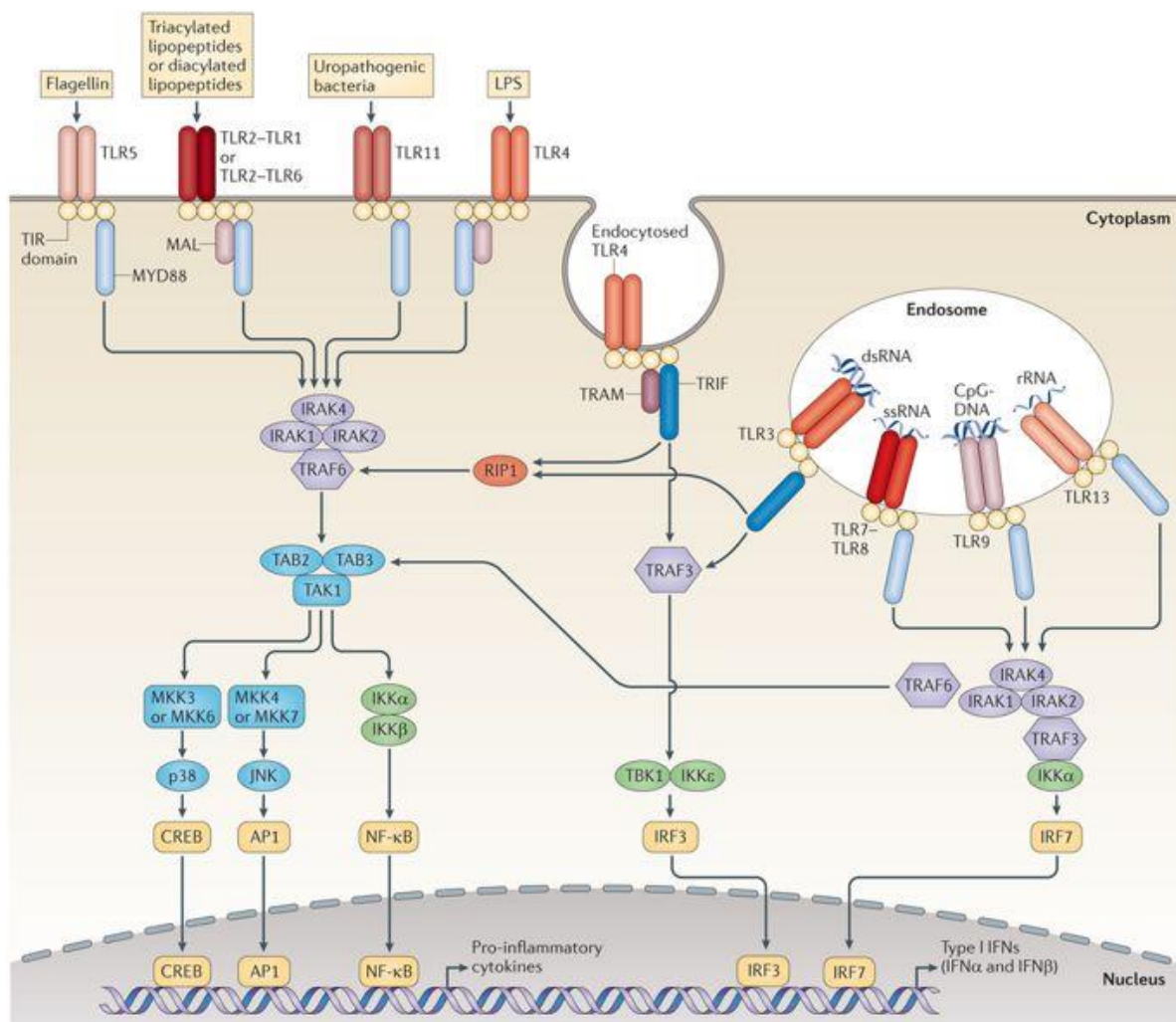
I. L'immunité Innée

A. Généralités et reconnaissance virale

La première barrière rencontrée par un pathogène lors d'une infection est l'immunité innée, activée dans les premières heures suivant son entrée. Elle est non spécifique (simple reconnaissance des agents pathogènes par grandes classes) et n'entraîne pas la mise en place d'une mémoire immunologique. Les principaux acteurs de cette réponse sont des cellules inflammatoires comme les cellules *Natural Killer* (NK) ou les cellules phagocytaires : monocytes, macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques (DC).

La réponse de ces cellules est déclenchée grâce à des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR pour *pattern recognition receptors*) exprimés par les cellules inflammatoires. Ils peuvent reconnaître des motifs exprimés à la surface des pathogènes (PAMP pour *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) comme des acides nucléiques viraux, des motifs glycoprotéiques et des messagers chimiques (Kawai and Akira, 2007, 2010).

Parmi les récepteurs exprimés sur les macrophages et les DC, on trouve les TLR présents à la fois chez les vertébrés et chez les invertébrés. Les TLR murins et humains sont composés de 13 membres (TLR1 à 13). Chaque TLR reconnaît un motif donné. Les TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 et 11 qui reconnaissent les glycoprotéines et lipides membranaires sont des récepteurs transmembranaires de la membrane plasmique, tandis que les TLR3, 7, 8, 9 et 13 qui reconnaissent les acides nucléiques sont situés dans les endosomes et les lysosomes (Kawai and Akira, 2010; Trinchieri and Sher, 2007) (**Figure 11**).



Nature Reviews | Immunology

Figure 11 : Schéma de la structure et des principales voies de signalisation des PRR

Le TLR5, TLR11, TLR11, TLR4 et les hétéromères de TLR2-TLR1 ou TLR2-TLR6 se lient à leurs ligands respectifs à la surface cellulaire, tandis que TLR3, TLR7-TLR8, TLR9 et TLR13 sont localisés aux endosomes, où ils détectent les acides nucléiques microbiens. Le TLR4 est localisé à la fois au niveau de la membrane plasmique et des endosomes. La signalisation TLR est déclenchée par la dimérisation des récepteurs induite par le ligand qui va induire une cascade de signalisation. Une conséquence majeure de la signalisation TLR est l'induction de cytokines pro-inflammatoires et, dans le cas des TLR endosomales, l'induction d'interféron de type I (IFN). ARNdb, ARN double brin ; IKK, inhibiteur de la NF- κ B kinase ; LPS, lipopolysaccharide ; MKK, MAP kinase kinase ; RIP1, protéine 1 interagissant avec les récepteurs ; ARNr, ARN ribosomal ; ssARN, ARN simple brin ; TAB, protéine se liant à TAK1 ; TAK, kinase activée TGF β ; TBK1, Kinase se liant au TANK 1 (D'après O'Neill, Golenbock, et Bowie 2013).

Ces récepteurs sont composés d'un domaine extracellulaire qui se lie aux PAMP et d'un domaine intracellulaire TIR (Toll/IL-1R homologie). Une fois liés à un PAMP, les TLR se dimérisent et subissent ainsi un changement de conformation qui permet le recrutement d'adaptateurs moléculaires, déclenchant diverses cascades de signalisation. Parmi ces

adaptateurs, on trouve MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*) qui induit la phosphorylation et la dégradation de l'inhibiteur de NF kappaB (IkB), permettant ainsi la translocation de NF- κ B dans le noyau et l'activation de la transcription de gènes pro-inflammatoires. Un autre adaptateur, TRIF (*TIR domain containing adaptor inducing interferon β*), est impliqué dans la cascade d'activation menant à des réponses pro-inflammatoires et notamment à la maturation des DC et à la sécrétion d'IFN- α/β (Interferon α/β) via l'induction des gènes par IRF (*Interferon-Regulatory Factor*) (**Figure 11**) (Hoebe et al., 2003; Kaisho et al., 2001; O'Neill et al., 2013; Trinchieri and Sher, 2007).

L'immunité innée peut être fortement activée par certains virus. Le déclenchement d'une ou plusieurs voies de l'immunité innée dépend de la reconnaissance des éléments viraux par les récepteurs. Les glycoprotéines d'enveloppe virale, comme celle du cytomégalovirus (CMV) ou celle du virus de l'herpès simplex (HSV), peuvent être reconnues par le TLR2 (Bieback et al., 2002; Compton et al., 2003) et le TLR4 (Burzyn et al., 2004). Cette reconnaissance entraîne majoritairement la sécrétion de cytokines pro inflammatoires mais pas d'IFN de type I entraînant donc une inflammation plutôt qu'une réponse antivirale spécifique. L'ARN double-brin viral peut être reconnu par le TLR3 et induit fortement la production d'IFN I (Alexopoulou et al., 2001). L'ADN viral est quant à lui reconnu par le TLR9. Ce sont les motifs CpG (cytosine-phosphate-guanine) de l'ADN non méthylé qui sont reconnus. Ces motifs sont présents en plus grande quantité dans les génomes microbiens par rapport au génome de cellules mammifères (Hornung et al., 2002). La sécrétion d'IFN induite par le TLR9 est spécifique de certains types de cellules comme les pDC (Cellules Dendritiques plasmacytoides), une sous-population de DC caractérisée par sa capacité à sécréter des niveaux élevés d'IFN en réponse à une infection virale. Les TLR7 et 8 peuvent également être impliqués dans la reconnaissance des ARN simple brin viraux (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004). L'ARN est rendu accessible suite à la dégradation des particules virales sous l'influence de l'environnement hautement acide des phagolysosomes et des enzymes de dégradation qui y sont présentes.

D'autres cellules coopèrent également pour l'élimination rapide des pathogènes *in vivo* comme les cellules NK. Les NK sont des lymphocytes granuleux capables de détecter les infections virales par un système indépendant des TLR, notamment via les NCR. Ils vont également être capables de produire des cytokines comme l'IFN (Lanier, 2008; Welsh and Waggoner, 2013).

En complément de la détection de pathogène par les cellules pro-inflammatoires, un ensemble de protéines dans le sérum forme une cascade biochimique qui fait également partie de l'immunité innée : le système du complément. Il participe à l'élimination du pathogène par trois voies : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (**Figure 12**).

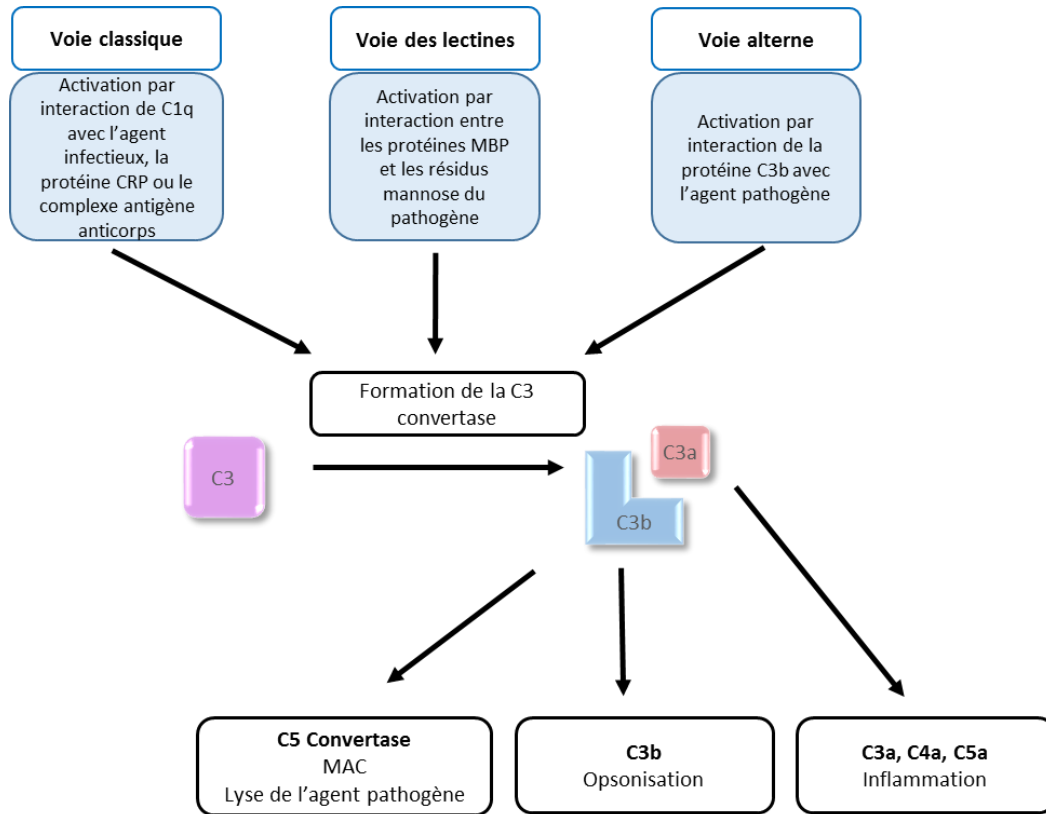


Figure 12: Schéma du système du complément.

La ou les voies déclenchées varient en fonction des protéines impliquées dans la liaison au pathogène. Elles aboutissent toutes les trois à la formation de l'enzyme C3 convertase qui va cliver la protéine C3 en deux: C3a et C3b. La protéine C3b agit comme une opsonine et va également permettre la formation de l'enzyme C5 convertase. Celle-ci mène aux étapes finales de l'activation du système du complément, à savoir la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) et la lyse de l'agent pathogène.

B. L'immunité innée et l'AAV

La première barrière immunologique rencontrée par l'AAV sauvage ou l'AAVr après son entrée dans l'hôte est donc la réponse innée. Au début des années 2000, il était admis que les vecteurs AAVr induisaient une faible réponse innée chez l'homme, tout du moins en comparaison de la forte réponse induite par les vecteurs adénoviraux. Une étude comparant l'expression de chimiokines inflammatoires dans le foie après injection d'un AAVr ou d'un

vecteur adénoviral par voie intraveineuse (IV) chez la souris a montré que, bien que l'efficacité de transduction soit comparable, il fallait une dose 40 fois supérieure d'AAVr pour induire une sécrétion de chimiokines dans le foie du même ordre que le vecteur adénoviral. Cette expression de chimiokines inflammatoires n'était détectable que transitoirement, entre 1h et 6h post injection (Zaiss et al., 2002).

1) Reconnaissance du génome virale

Les mécanismes d'induction de la réponse innée par l'AAV ont ensuite été étudiés plus en détails. Il a ainsi été montré que le TLR9 et MyD88 étaient impliqués dans la réponse innée en réponse à divers sérotypes d'AAVr, tels que l'AAV2r, l'AAV1r ou l'AAV9r (**Figure 11**). Cette réponse serait médiée par les IFN de type I sécrétés par les pDC mais pas par les DC dites conventionnelles (cDC) chez la souris et également chez l'homme. Le TLR9 pourrait détecter les motifs CpG de l'ADN viral grâce à une exposition partielle et/ou une décapsidation de l'AAV2r en raison du pH acide lors du trafic endosomal (Zhu et al., 2009). L'AAVr pourrait également induire au niveau du site d'injection la sécrétion d'interleukine 6 (IL-6), d'IL-1 β , de MCP1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) et de MIP2 (*macrophage inflammatory protein-2*) qui sont des cytokines et chimiokines impliquées dans la phase aigüe de l'inflammation (Faust et al., 2013). Cette étude a d'abord comparé l'efficacité d'un transfert de gène via un AAVrh32.33 dans des souris contrôle et dans des souris TLR9^{-/-}. Or, l'expression du transgène était éliminée uniquement dans les souris contrôle, ce qui confirme la reconnaissance par le TLR9 de l'AAVr (Faust et al., 2013). Dans une seconde expérience, un AAVrh32.33 contenant un transgène avec 308 dinucléotides CpG ou complètement déplété en CpG est injecté en IM dans des souris WT. Le transgène natif perd alors son expression au bout de 30 jours alors que celui déplété en CpG a permis de maintenir une expression pendant plus de 90 jours. Cette observation s'accorde également avec deux autres études qui ont montré que le TLR9 est activé dans les pDC chez l'homme et qu'ensuite celles-ci activent les cDC (Rogers et al., 2017; Zhu et al., 2009). Cette reconnaissance par le TLR9 explique également la plus forte immunogénéicité des AAVr sc comparés aux AAVr ss indépendamment de la souche de souris et du promoteur utilisé puisque les AAVr sc contiennent d'avantage de motifs CpG (Martino et al., 2011a).

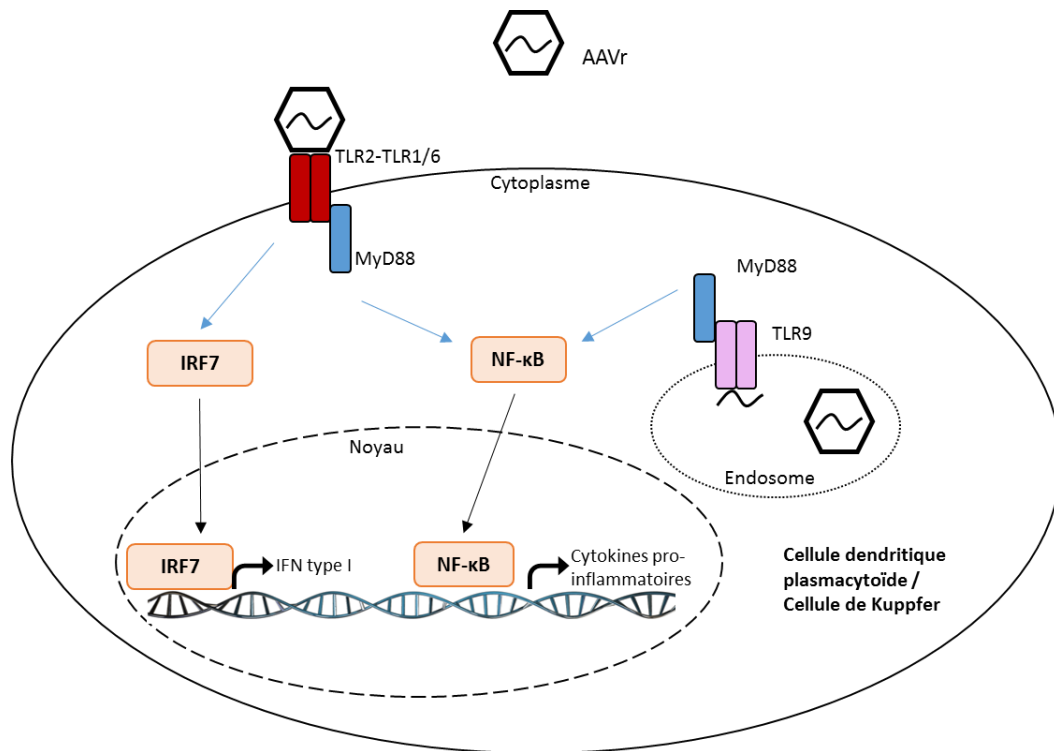


Figure 13 : Activation de la réponse immunitaire innée après transfert de gène à l'aide d'AAVr.

L'hétérodimère TLR2-TLR1 ou TLR2-TLR6 est exprimé à la surface des cellules de Kupffer et reconnaît la capsid du vecteur viral. L'homodimère TLR9 exprimé à la surface des endosomes dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes reconnaît quant à lui l'ADN viral. Pour ces deux récepteurs, la molécule MyD88 est recrutée et entraîne l'activation de NFκB qui induira la production de cytokines pro-inflammatoires ou de IRF7 qui induira la sécrétion d'IFN de type I.

Il est également important de mentionner que la reconnaissance de l'AAVr par le TLR9 semble avoir un impact sur la réponse immunitaire adaptative qui suivra (cf. p60). Plus précisément, une étude a permis de montrer que la voie TLR9-MyD88 est critique pour la réponse des LT CD8⁺ en réponse à l'AAV2 chez la souris après une injection intramusculaire (IM) (Zhu et al., 2009). Cette dépendance a également été mise en évidence dans le cadre d'une étude portant sur l'AAVrh32.33 dans laquelle son interaction avec le TLR9 était nécessaire à une réponse des LT anti-AAV chez la souris (Faust et al., 2013). Cela a également été montré chez l'homme : la reconnaissance de l'AAV par le TLR9 des pDC permettrait l'activation des cDC et la production d'IFN de type I permettrait ensuite l'activation des LT CD8⁺ spécifiques de l'AAV par présentation croisée (Rogers et al., 2017). De plus, le rôle joué par la voie de signalisation TLR9/MyD88 dans l'initiation de la réponse humorale dirigée contre la capsid a également été démontré pour l'AAV1 (Sudres et al.,

2012) ainsi que pour l'AAV2 (Martino et al., 2011a). Néanmoins le lien entre ces deux composantes de l'immunité n'est pas encore clairement élucidé.

2) Reconnaissance de la capsid virale

Les protéines de capsides pourraient également être reconnues par l'immunité innée. Une étude a rapporté que la réponse immune innée pouvait être déclenchée par des capsides d'AAV2 et d'AAV8 *in vitro* via le TLR2 dans des cellules primaires humaines du foie (les cellules de Kuppfer et les cellules endothéliales sinusoidales), mais pas dans les DC, entraînant alors une activation de la voie de signalisation NF- κ b induisant ainsi la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-8 et de TNF α (*Tumor necrosis factor*) (**Figure 11**) (Hösel et al., 2012; Rogers et al., 2017). Ce mécanisme de reconnaissance pourrait également être déclenché dans les moDC (DC dérivées de monocytes) puisque Kuranda *et al.* ont montré une sécrétion d'IL-1 β et d'IL-6 par des moDC humaines en réponse à des peptides de la capsid de l'AAV2 (Kuranda et al., 2018). De plus, cette réponse aurait un impact sur le déclenchement de la réponse adaptative humorale anti-AAV. Cette même étude a montré *in vitro* que la différenciation des lymphocytes B anti-AAV en cellules productrices d'anticorps serait dépendante de l'IL-6 et de IL-1 β (démonstré *in vivo* également).

Le système du complément semble lui aussi un élément important dans la réponse innée contre l'AAVr. Zaiss *et al* ont démontré que la capsid de l'AAV2r serait capable d'interagir *in vitro* avec le système du complément et notamment avec la protéine iC3b et le facteur H (Zaiss et al., 2008). Ces deux protéines sont impliquées dans la régulation de l'activation du complément. En effet, le facteur H se lie au composant C3b et permet ainsi le recrutement du facteur I capable de cliver le C3b en iC3b, un fragment inactif. Leur présence entrainerait donc l'incapacité du vecteur à activer la voie alterne. Néanmoins, la liaison de l'AAVr à d'autres composants de la protéine C3 (C3 et C3b) suggère que le vecteur peut être opsonisé, favorisant ainsi la phagocytose de l'AAV par les macrophages ainsi que leur activation par la voie classique (Nayak and Herzog, 2010). Là encore, l'interaction entre l'AAVr et l'immunité innée, ici le système du complément, semble agir sur la régulation de la réponse adaptative dirigée contre l'AAVr. En effet, la réponse adaptative humorale paraît diminuée dans un modèle de souris KO (*Knock out*) pour la protéine C3 (Zaiss et al., 2008).

Enfin, l'AAV2 semble également déclencher une réponse des cellules NK qui sécrèteraient de l'IFN- γ lors de la stimulation de cellules mononuclées du sang périphérique

(PBMC) avec des peptides de la capsid de l'AAV2 chez certains donneurs (Kuranda et al., 2018).

En conclusion, de nombreuses preuves de la reconnaissance des vecteurs AAVr par le système immunitaire inné *in vitro* et *in vivo* ont été apportées, et l'ensemble de ces études se rejoignent sur l'implication de la voie de signalisation TLR9/MyD88. Bien que la réponse déclenchée reste faible, ces interactions précoces peuvent potentiellement avoir un sérieux impact sur la réponse adaptative résultante. En conséquence, un intérêt particulier doit donc être porté aux stratégies permettant de moduler les voies de signalisation impliquées.

II. L'immunité adaptative

La réponse immunitaire adaptative (ou acquise) intervient plus tardivement que l'immunité innée (quelques jours à quelques semaines) et est dirigée contre un antigène spécifique. Elle permet la reconnaissance et l'élimination de pathogènes qui auraient échappé à l'immunité innée ou qui auraient persisté malgré son action. L'immunité adaptative est divisée en deux composantes : l'immunité humorale, impliquant les lymphocytes B, et l'immunité cellulaire impliquant les lymphocytes T. Elle se divise en plusieurs étapes : la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes, l'activation des lymphocytes et la différenciation en cellules effectrices, l'élimination du pathogène et enfin l'apoptose des cellules effectrices et la persistance des cellules mémoire qui va permettre la mise en place de la mémoire immunitaire à l'issue d'une infection primaire (**Figure 14**). Celle-ci est spécifique de l'immunité adaptative et va permettre, en cas de nouvelle rencontre avec le même antigène, une réponse plus rapide, plus importante et plus efficace.

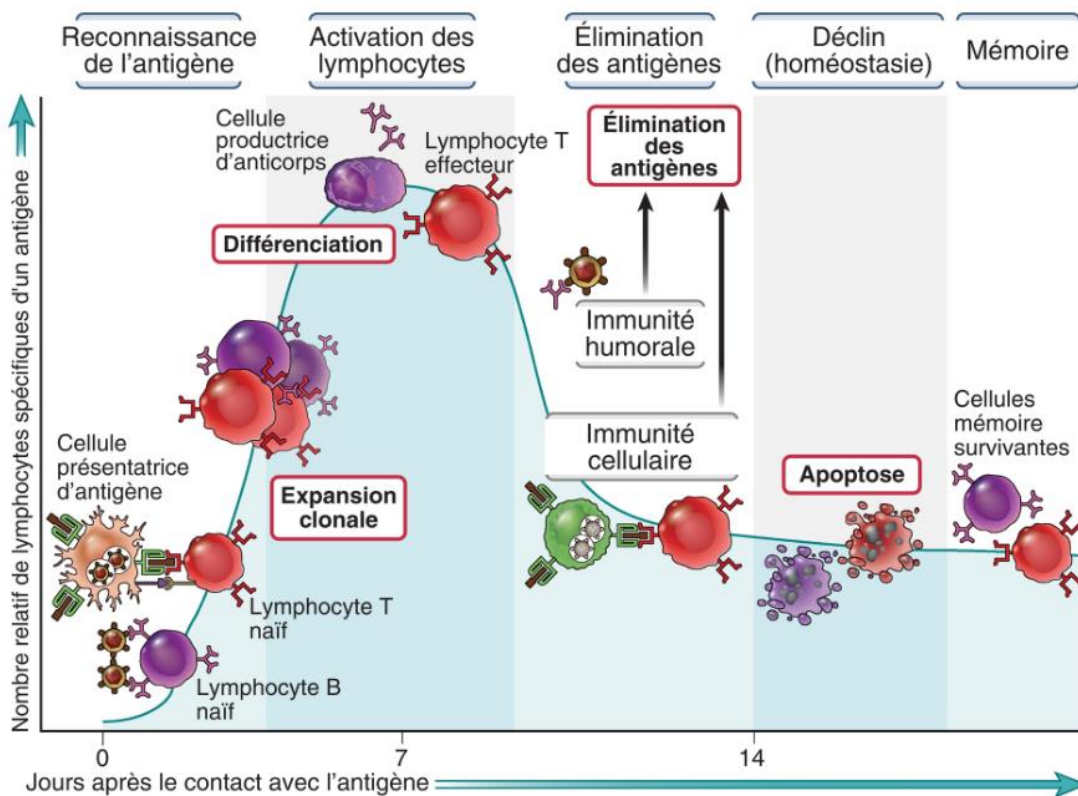


Figure 14 : Phases des réponses immunitaires adaptatives

Les réponses immunitaires adaptatives se composent de phases consécutives : reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes spécifiques, activation des lymphocytes, puis phase effectrice (élimination de l'antigène). La réponse décline lorsque l'antigène est éliminé : la plupart des lymphocytes stimulés par l'antigène meurent par apoptose ; les cellules spécifiques des antigènes qui survivent sont responsables de la mémoire immunitaire. La durée de chaque phase peut varier en fonction des différentes réponses immunitaires. Ces principes s'appliquent à l'immunité humorale (assurée par les lymphocytes B) et à l'immunité cellulaire (assurée par les lymphocytes T) (Abbas et al., 2016).

Lorsque l'on aborde l'immunité adaptative dirigée contre le vecteur, il convient de rappeler que la capsid du vecteur AAVr est une copie similaire, voire identique, de la capsid AAV de type sauvage. Par conséquent, les réponses immunitaires adaptatives dirigées contre les vecteurs seront grandement influencées par l'exposition antérieure de l'individu à l'AAV de type sauvage.

A. Capture des antigènes et présentation aux lymphocytes

1) Généralités

Des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles sont présentes dans la majorité des tissus et ont pour fonction, grâce à des capacités phagocytaires élevées, de détecter *in situ* la présence de pathogène. Lorsqu'un antigène est capturé par une CPA, il est ensuite drainé dans les organes lymphoïdes secondaires : les ganglions lymphatiques et la

rate. Parmi ces cellules présentatrices d'antigènes professionnelles on retrouve les macrophages, les lymphocytes B (LB) et les DC.

Les DC sont particulièrement importantes parmi les CPA. Elles forment une population hétérogène de cellules qui possèdent plusieurs rôles dans le contrôle de la réponse immunitaire adaptative. Elles sont retrouvées à l'état immature dans tout l'organisme : les organes non-lymphoïdes, le sang, les vaisseaux afférents de la lymphe ou encore les tissus lymphoïdes. A l'état basal, elles n'expriment pas les signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes. Les DC immatures sont capables de capter des antigènes ou de cliver des motifs pour générer des peptides en capturant continuellement du matériel extracellulaire par phagocytose ou macro pinocytose. Les antigènes solubles qui se trouvent dans la lymphe sont captés par les DC des ganglions lymphatiques alors que les antigènes qui se trouvent dans le sang sont captés par les DC de la rate. Lors de la capture d'un antigène par des DC immatures dans un tissu infecté, elles s'activent tout en se dirigeant, par l'intermédiaire de vaisseaux lymphatiques, vers des zones T-dépendantes dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques ou rate) où elles peuvent présenter aux LT des peptides antigéniques dérivés du pathogène. Lors de leur maturation les DC augmentent l'expression de molécules de co-stimulation et d'adhésion à leur surface pour rendre la stimulation plus efficace. Les DC vont ensuite présenter les peptides aux lymphocytes par les complexes d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II. Elles font ainsi le lien entre l'immunité innée et adaptative en permettant l'initiation de la réponse adaptative par interaction avec les LB et les LT. Enfin, elles peuvent également dans certains cas induire une tolérance.

La provenance de l'antigène déterminera son mode de présentation (CMH I ou II) et son impact (**Figure 15**). Un peptide exogène issu de la dégradation d'un antigène extracellulaire absorbé par la CPA sera présenté sur le CMH de classe II, exprimé uniquement par les CPA professionnelles. Les complexes peptide-CMH (pCMH) II interagissent avec les récepteurs des lymphocytes T (TCR) exprimés sur les LT CD4⁺.

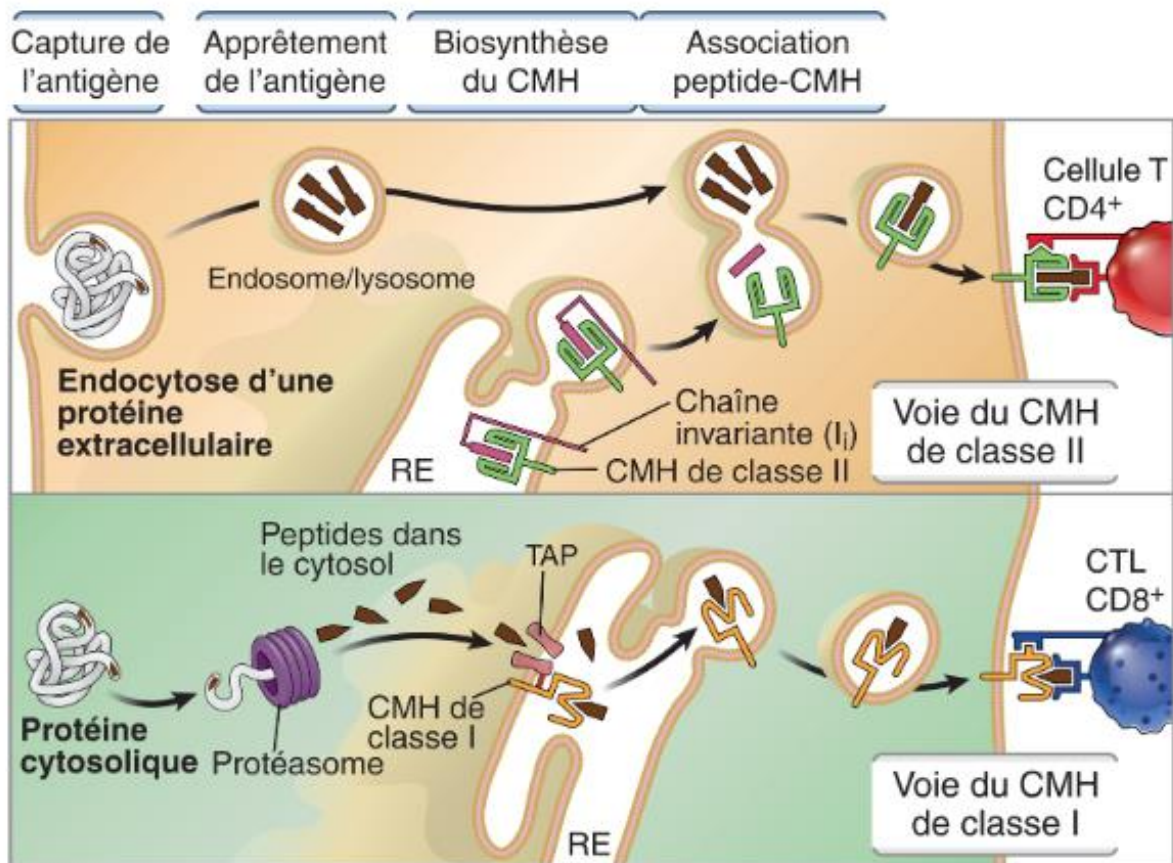


Figure 15 : Voies d'apprêtement intracellulaire des antigènes dans les CPA.

La voie des molécules du CMH II des CPA convertit les antigènes endocytés dans des vésicules en peptides qui se lient aux molécules du CMH II pour être reconnus par les LT CD4⁺. La voie des molécules du CMH I convertit les protéines se trouvant dans le cytosol en peptides par dégradation par le protéasome. Les peptides passent ensuite dans le RE par le TAP et se lient aux CMH de classe I afin qu'ils soient reconnus par les LT CD8⁺. CTL, cytotoxique T lymphocyte ; RE, réticulum endoplasmique ; TAP, transporteur associé à l'apprêtement de l'antigène (Abbas et al., 2016).

Les peptides endogènes, issus de la dégradation des protéines intracellulaires dans le cytosol, sont chargés sur des molécules du CMH de classe I (qui sont exprimées sur toutes les cellules nucléées). Les complexes de pCMH de classe I interagissent avec les TCR exprimés sur les lymphocytes T CD8⁺, entraînant des réponses immunitaires cytotoxiques (**Figure 15**). Une présentation d'antigènes exogènes sur un CMH de classe I est également possible par certaines sous-populations de DC, il s'agit de présentation croisée. C'est notamment le cas pour certains virus incapables d'infecter les DC (Heath and Carbone, 2001).

2) Capture et présentation des antigènes de l'AAV

Initialement, on ne pensait pas l'AAVr capable de transduire efficacement les CPA. Il était admis qu'il serait seulement capable d'entrer dans les cellules et la transduction serait

ensuite bloquée soit par l'incapacité du virus à entrer dans le noyau soit par l'inefficacité de la conversion du génome viral en un modèle bicaténaire transcriptionnellement actif (Fisher et al., 1996; Jooss et al., 1998). Une autre étude a confirmé que les AAVr de sérotype 1, 2, 8 et 9 étaient incapables de transduire les DC immatures même à de fortes doses malgré le fait que les particules virales étaient bien internalisés (Rossi et al., 2019). En effet, des génomes viraux étaient détectés dans les cellules (dans le cytoplasme mais également dans le noyau), et même dans le noyau mais pas le produit du transgène ce qui suggère un processing intracellulaire (uncoating) inefficace des particules virales dans les DC (Rossi et al., 2019). De plus, l'interaction du vecteur AAVr avec le TLR9 dans les pDC (Sudres et al., 2012; Zhu et al., 2009) apporte la preuve indirecte que les AAVr peuvent au moins être internalisés dans les cellules inflammatoires et plus particulièrement dans les DC *in vivo* (Faust et al., 2013). Par ailleurs, la simple internalisation du virus pourrait suffire aux DC pour interagir avec l'AAV/AAVr afin de processer et présenter des antigènes issus de leur capsid puisque'il est possible de détecter des anticorps et des LT CD8⁺ spécifiques de la capsid suivant une infection naturelle ou un transfert de gène, comme il en sera discuté ci-dessous (cf. p75). Ainsi, Rogers et al. ont montré dans un modèle murin que les populations de pDC et cDC sont toutes les deux nécessaires dans le crosspriming des cellules CD8⁺ spécifiques de la capsid ce qui là encore confirme un processing efficace des épitopes dérivés de la capsid dans les DC (Rogers et al., 2017). La transduction des DC par l'AAVr avec expression efficace du transgène *in vivo* et *in vitro* reste néanmoins toujours sujette à débat. Des études semblent indiquer que la transduction *in vitro* de DC dérivées de monocytes murins ou humains à l'aide d'AAV de sérotype 1, 2, 5 et 6 est possible (Aldrich et al., 2006; Ponnazhagan et al., 2001; Veron et al., 2007, 2009). *In vivo*, il a également été montré par Gernoux *et al.* dans un modèle de souris que l'AAV8r pouvait transduire les CPA après une administration intramusculaire (Gernoux et al., 2015).

B. L'immunité adaptative humorale

1) Généralités

L'immunité adaptative humorale est majoritairement médiée par les lymphocytes B, dont le développement s'opère essentiellement dans la moelle osseuse, et qui portent à leur surface un récepteur des lymphocytes B (BCR) correspondant à un anticorps membranaire capable de reconnaître un antigène dans sa conformation native. Les LB naïfs résident dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires. L'antigène arrive dans les organes lymphoïdes secondaires via les vaisseaux afférents de la lymphe sous forme de molécule

soluble, de complexe immun ou encore transporté par les DC. Le LB va reconnaître l'antigène protéique via son BCR. Cette reconnaissance entraîne l'internalisation du complexe BCR-antigène et l'activation du LB. Cette activation peut être de deux types : T-dépendante ou T-indépendante.

En cas de réponse humorale T-dépendante, le LB joue alors le rôle de CPA professionnelle en activant le LT *helper 2* (Th2) en présentant à sa surface un peptide antigénique (produit de clivage de l'antigène natif) au sein de molécules de CMH II. Celui va être reconnu par le TCR exprimé par les Th2. L'interaction se fait à l'interface entre les follicules comprenant les LB et la zone des LT au sein des organes lymphoïdes secondaires et conduit à l'activation du LT qui va lui-même fournir un deuxième signal de stimulation au LB. Ce signal correspond à l'interaction entre CD40L exprimé à la surface des LT et CD40 exprimé par les LB.

Dans des cas beaucoup moins fréquents, la réponse humorale peut être T-indépendante. L'activation, la prolifération et la différenciation des LB résultent alors d'un *cross-linking* de plusieurs BCR (à la surface d'une seule cellule) avec un antigène contenant une structure fortement répétée (*ex.*: polysaccharides).

Une fois activé, le LB naïf prolifère de manière clonale, c'est-à-dire en conservant la même spécificité antigénique, pendant 4 à 5 jours. Les LB vont également se différencier en cellules effectrices, les plasmocytes, qui vont migrer vers le site où est présent l'antigène et sécréter des anticorps. Les anticorps, aussi appelés immunoglobulines (Ig), sont sécrétés en grandes quantités et sont les médiateurs de la réponse humorale. Ils peuvent avoir un effet neutralisant puisqu'en se liant aux pathogènes, ils facilitent l'opsonisation, la phagocytose et activent la voie classique du système du complément afin d'empêcher l'infection des cellules-cibles.

Les Ig sont composées de deux chaînes légères identiques et de deux chaînes lourdes identiques reliées entre elles par des ponts disulfures. Il existe différents isotypes d'Ig en fonction de la chaîne lourde dont elles sont constituées, avec des longévités et des fonctions variées. Parmi eux, deux isotypes sont cruciaux pour la mise en place de l'immunité humorale:

- les IgM qui jouent un rôle dans la réponse immune primaire : en effet, ces Ig exprimées à la surface des LB ont une très forte avidité pour leur antigène et sont sécrétées

très rapidement, leur présence dans le sang indique une infection/immunisation récente et/ou en cours. Elles permettent l'élimination des pathogènes pendant la production des IgG.

- les IgG, quant à elles, sont prédominantes dans le corps (entre 75% et 80% des anticorps circulants totaux) et persistent à long terme après la fin de l'infection, participant ainsi au maintien de la mémoire immunologique. Chez l'Homme, quatre sous-classes ont été identifiées : les IgG1, 2, 3 ou 4. En général, elles ne sont pas représentées en même proportion dans la circulation, et notamment dans le sérum : la prédominance est telle que $IgG1 > IgG2 > IgG3 > IgG4$ chez l'Homme (Papadea et Check 1989). Alors que les IgG1 et 3 seraient plutôt produites en réponse à un antigène protéique, les IgG2 et 4 seraient associées à des polysaccharides (Schroeder et Cavacini 2010).

Après élimination du pathogène, les LB effecteurs meurent par apoptose mais des LB mémoire persistent afin de répondre plus rapidement et plus efficacement en cas de seconde rencontre avec le même pathogène. Les réponses des LB mémoire sont caractérisées par la production de petite quantité d'IgM et de large quantité d'IgG. Les LB mémoire expriment aussi un fort niveau de CMH II à leur surface et ont une affinité augmentée pour leur antigène. Ces deux particularités leur donnent la capacité d'interagir efficacement avec les LT $CD4^+$ Th2 même à de faibles doses d'antigènes.

2) L'immunité adaptative humorale anti-AAV

L'AAV sauvage peut naturellement infecter l'homme. Une partie de la population a donc développé des anticorps et des facteurs neutralisants contre la capsid de l'AAV. Leur effet délétère même à de faibles titres sur l'efficacité du transfert de gène via l'AAVr a été observé de nombreuses fois chez la souris (Moskalenko et al., 2000; Scallan et al., 2006) , chez le primate non humain (Jiang et al., 2006b) ainsi que chez l'Homme (Moskalenko et al., 2000; Scallan et al., 2006).

a. Principaux outils d'analyse de l'immunité adaptative humorale chez l'Homme

Plusieurs méthodes ont été mises au point pour détecter les réponses humorales dirigées contre divers sérotypes d'AAV (Calcedo and Wilson, 2013). L'ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) est couramment utilisé et détecte la fixation directe des anticorps contenus dans le sérum, le plasma ou d'autres fluides, sur les capsides d'AAV (**Figure 16**). Les tests ELISA ont non seulement permis de réaliser des études de séroprévalence des différents sérotypes d'AAV (cf. p61), mais également d'assurer le suivi

immunologique (ou immunomonitorage) du statut sérologique des patients avant et durant un essai clinique médié par l'AAVr. Néanmoins, la détection par ELISA d'anticorps spécifiques de l'AAV ne permet pas d'évaluer l'ensemble des facteurs humoraux circulants susceptibles d'interagir avec les vecteurs AAVr. En effet, tous les anticorps spécifiques de l'AAV ne sont pas forcément neutralisants et, réciproquement, les facteurs de neutralisation spécifiques de l'AAV ne sont pas tous des anticorps. En effet, d'autres protéines circulantes peuvent se fixer à l'AAV et ainsi l'empêcher d'interagir avec les récepteurs cellulaires nécessaires à son entrée dans les cellules cibles (Denard et al., 2012). Il est donc devenu nécessaire de développer d'autres méthodes, *in vitro* ou *in vivo*, permettant d'appréhender l'activité neutralisante du sérum/plasma chez les patients (**Figure 16**).

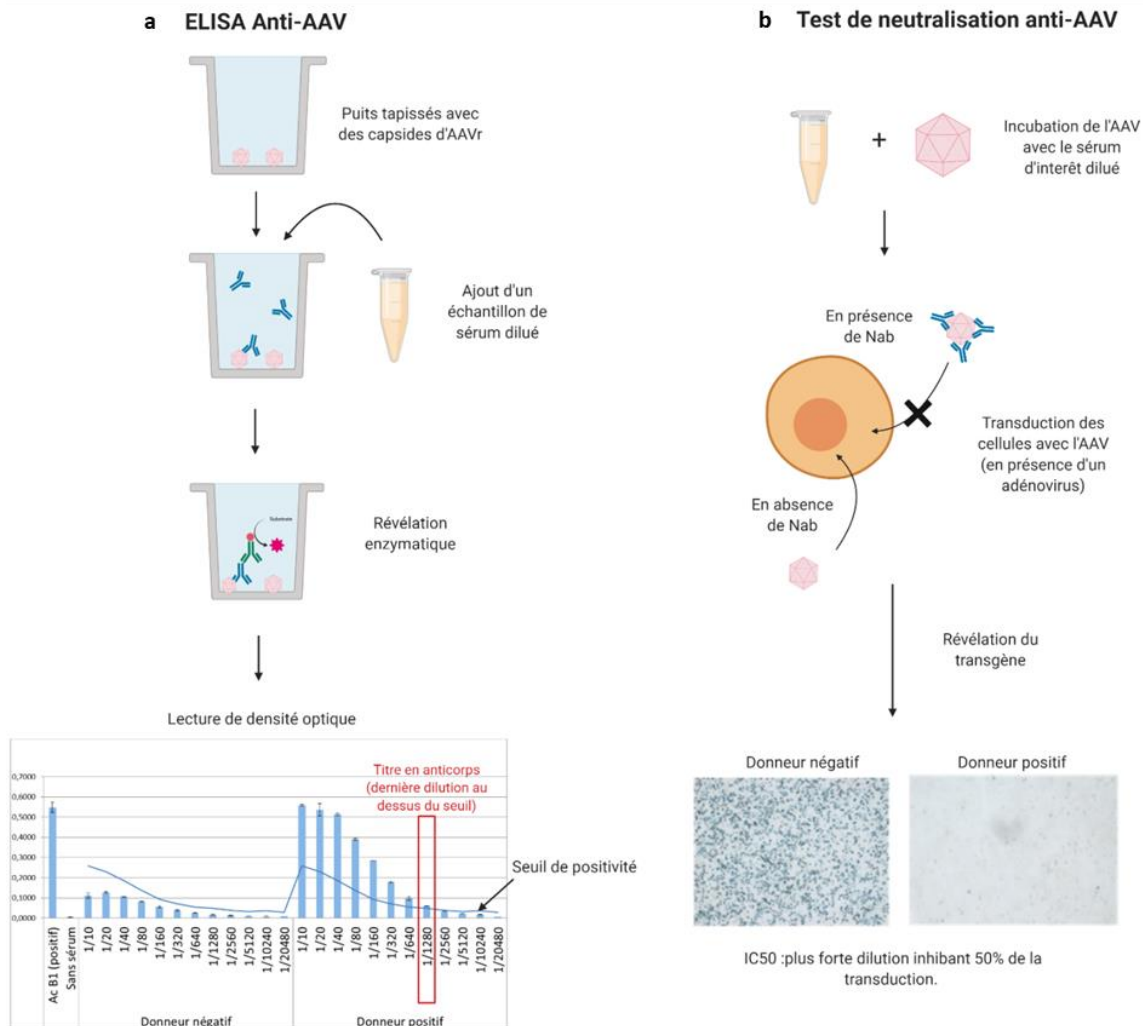


Figure 16 : Outils de détection de la réponse humorale préexistante anti-AAV

a) ELISA anti-AAV. Des particules d'AAV du sérotype d'intérêt sont fixées au fond des puits de plaques ELISA où sera ensuite incubée une gamme de dilutions des échantillons à tester. La présence des anticorps anti-AAV est révélée par un anticorps secondaire conjugué à une enzyme (ex : alcaline phosphatase). Le substrat de l'enzyme est finalement ajouté et donnera

un produit coloré par réaction enzymatique. La quantification du produit coloré est réalisée par spectrophotomètre et la densité optique obtenue est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifique de l'antigène présent dans l'échantillon. Un seuil de positivité est préalablement établi avec des échantillons négatifs, afin de déterminer le titre qui est défini comme la dilution de l'échantillon la plus forte dont la densité optique est supérieure au seuil.

b) Test de neutralisation anti-AAV. Les AAVr sont préalablement incubés avec une gamme de dilution de l'échantillon à tester (sérum, plasma...), ce qui permettra de déterminer un titre en facteurs neutralisants. Des cellules sont ensuite transduites, en général des lignées cellulaires immortalisées permissives pour le sérotype AAV concerné, avec des vecteurs AAVr codant pour un transgène rapporteur (ex : GFP, luciférase, β -galactosidase...); L'expression résiduelle du transgène rapporteur dans les cellules transduites est ensuite analysée pour déterminer le titre d'"IC50". L'"IC50" est défini comme la plus forte dilution inhibant 50% de la transduction. Nab, anticorps neutralisants.

Les protocoles et paramètres du test de neutralisation *in vitro* (lignée cellulaire, dose de vecteur, gène rapporteur ...) varient d'une étude à l'autre, ce qui rend les comparaisons difficiles. Mais cette procédure est tout de même considérée comme le test standard pour évaluer la présence de facteurs neutralisants spécifiques des capsides d'AAV dans les échantillons cliniques, même si le manque de standardisation des protocoles reste un problème (Calcedo and Wilson, 2013; Martino et al., 2011a; Meliani et al., 2015).

Des essais de neutralisation *in vivo* ont également été décrits. Ces essais consistent à administrer l'échantillon à tester à des souris, par voie IV ou IM, avant l'injection de vecteurs AAVr codant pour un gène rapporteur. Si certaines études démontrent que ces essais *in vivo* permettent une sensibilité de détection jusqu'à quatre fois plus élevée que les essais *in vitro* (Hurlbut et al., 2010; Sun et al., 2013), d'autres semblent montrer le contraire (Kruzik et al., 2019a). De plus, ils sont beaucoup moins applicables à grande échelle, car plus difficiles à standardiser, plus chronophages, plus onéreux et éthiquement moins acceptables.

b. Prévalence de l'immunité adaptative humorale anti-AAV chez l'Homme

Divers études ont été réalisées à l'aide des techniques décrites ci-dessus depuis les années 1960-70 pour étudier la présence d'anticorps sériques et de facteurs neutralisants dirigés contre la capsidie chez l'Homme. Il est intéressant de noter pour commencer qu'on observe une corrélation positive significative entre les titres des anticorps IgG anti-AAV et les titres des facteurs neutralisants anti-AAV (Boutin et al., 2010; Hurlbut et al., 2010; Kruzik et al., 2019b; Leborgne et al., 2019; Murphy et al., 2009; Veron et al., 2012). Néanmoins, la majorité des études de prévalence s'intéresse à la prévalence des facteurs neutralisants en raison de leur impact sur le transfert de gène par l'AAVr (cf. p66).

L'ensemble de ces études montre qu'environ 80% de la population est séropositive pour l'AAV (tous sérotypes confondus), et qu'il peut exister des variations importantes dans la séroprévalence contre divers sérotypes en fonction des régions géographiques dont sont issus les populations analysées (Calcedo et al., 2009; Erles et al., 2001; Kruzik et al., 2019b). Au départ, ces études s'intéressaient principalement aux AAV2. Il a ainsi été montré que ce sont les anticorps et les facteurs neutralisants dirigés contre l'AAV2 (entre 30% et 80%) qui possèdent la plus grande prévalence. D'autres études se sont ensuite penchées sur divers sérotypes (**Tableau 3**). Malgré les variations dues à l'origine géographique de la cohorte, l'AAV2 semble toujours le plus prévalent et le plus souvent suivi par l'AAV1 tandis que l'AAV7, 8 et 9 sont moins prévalents (Boutin et al., 2010; Calcedo et al., 2009). Néanmoins, dans certaines cohortes, on observe une prévalence très forte pour l'AAV8 (Kruzik et al., 2019b; van der Marel et al., 2011). De plus, à une échelle géographiquement moins élevée, une étude a également montré que la séroprévalence en anticorps neutralisants anti-AAV8 pouvait beaucoup varier entre 2 cohortes issues du même continent (de 32% de donneurs positifs sur une cohorte exclusivement autrichienne à 65% sur une cohorte européenne) (Kruzik et al., 2019b).

Boutin et al. ont également montré que tous les donneurs possédant des anticorps spécifiques de l'AAV 5, 6, 8 et 9 sont aussi positifs pour les anticorps anti-AAV2 et anti-AAV1 (Boutin et al., 2010). D'autres études ont réalisé des observations similaires. Ceci peut s'expliquer soit par de multiples infections successives ou simultanées par différents sérotypes d'AAV de type sauvage, soit par une large réactivité croisée entre anticorps neutralisants ou facteurs neutralisants dirigés contre différent sérotypes (Calcedo and Wilson, 2016; Calcedo et al., 2009). Cette réaction croisée est très probablement le résultat de fortes homologies séquentielles entre les capsides de différents sérotypes d'AAV, et ne peut donc pas être facilement évitée, ce qui complique considérablement le choix du sérotype de AAVr à administrer au patient et encourage le développement de nouveaux variants synthétiques.

De la même manière, des études ont été réalisées parmi des cohortes de patients atteints de maladies comme la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) (Leborgne et al., 2019), la fibrose kystique (Chirmule et al., 1999) ou l'hémophilie B (Kruzik et al., 2019b), ce qui a permis de montrer que la séroprévalence peut être légèrement modifiée dans certaines maladies, même si la tendance reste la même.

Etude	Origine géographique	Dilution	Pourcentage de donneurs positifs										
			AAV1	AAV2	AAV3	AAV4	AAV5	AAV6	AAV7	AAV8	AAV9	AAVrh10	
Boutin et al., 2010	France	1/20	50	59			3	37		19	33		
Chirmule et al., 1999	Etats-Unis	1/20 (?)		32									
Murphy et al., 2009		1/3.1		38									
Calcedo et al., 2009	Australie	1/20	30	35					29	27			
Calcedo et al., 2009	Europe	1/20	27	35					25	22			
Calcedo et al., 2009	Afrique	1/20	43	56					31	31			
Calcedo et al., 2009	Etats-Unis	1/20	20	28					12	14			
Halbert et al., 2006	Etats-Unis	1/20		30			18	30	14	30			
Parks et al., 1970		1/10		40									
Blacklow et al., 1968b		1/10		40									
Ito et al., 2009	Etats-Unis	1/20		40									
Moss et al., 2004		?		32									
Wagner et al., 2002		1/20		22									
Erles et al., 1999				50				50					
Veron et al., 2012	France	1/2	59										
Mingozzi et al., 2013	Pays-Bas	1/10		82				27	64		50		
Mingozzi et al., 2013	Pays-Bas	1/3.1		100				36	91		90		
Ellsworth et al., 2018	Etats-Unis	1/16										17	
Kruzik et al., 2019b	Europe	1/5	27	47				20			63		
Kruzik et al., 2019b	Etats-Unis	1/5		50				59			32		
Ling et al., 2015b	Chine	1/20		92	89			69					
van der Marel et al., 2011	Allemagne	1/100	79				31	77	67		94		
Thwaite et al., 2015	Espagne	1/20		71								21	18
Mimuro et al., 2014	Japon	1/14	36	35				38			33	36	

Tableau 3 : Synthèse des études de prévalence des facteurs neutralisants anti-AAV chez l'Homme dans la population générale.

L'âge moyen de séroconversion des individus pour l'AAV est une information importante. En effet, dans de nombreuses maladies héréditaires, il est nécessaire d'intervenir à un jeune âge. La séroconversion peut avoir lieu très tôt au cours de la vie laissant une fenêtre thérapeutique restreinte pour s'affranchir de ces facteurs neutralisants (Li et al., 2012b) : entre 7 et 11 mois pour l'AAV2 et jusqu'à 3 ans pour l'AAV8. Par ailleurs, des anticorps spécifiques de différents sérotypes d'AAV peuvent déjà être détectés à la naissance, ce qui suggère une transmission verticale des anticorps maternels (Calcedo et al., 2011). Les titres d'anticorps diminuent ensuite au cours de la première année de vie, puis les taux d'IgG augmentent pour atteindre un plateau à l'adolescence (Calcedo et al., 2011; Erles et al., 1999). Par conséquent, la période pendant laquelle les humains sont dépourvus d'anticorps anti-AAV est assez étroite.

L'analyse des sous-types d'Ig impliqués dans la réponse anti-AAV a montré que les IgG1 seraient prédominantes, suggérant la présence d'une réponse T-dépendante. D'autres sous-types comme les IgG2, IgG3 et IgG4 seraient également présents (Boutin et al., 2010; Kruzik et al., 2019b; Madsen et al., 2009; Murphy et al., 2009). Étonnamment, une proportion importante de personnes âgées de moins de 60 ans qui portent des anticorps anti-AAV1 IgG présentent également des anticorps anti-AAV1 IgM, ce qui suggère des épisodes réguliers d'infection par l'AAV de type sauvage ou de réactivation de l'AAV en présence de virus auxiliaires (Erles et al., 1999; Murphy et al., 2009).

c. Impact de l'immunité humorale préexistante anti-AAV en essai clinique

L'immunité humorale anti-AAV préexistante représente une problématique cruciale dans le transfert de gène par administration systémique de vecteurs AAVr (Mingozzi and High, 2013). Elle peut altérer l'efficacité du transfert de gène, notamment s'il s'agit d'une réponse neutralisante (Moskalenko et al., 2000; Scallan et al., 2006). Lors du premier essai clinique où des vecteurs AAVr ont été injectés en systémique pour traiter l'hémophilie B, les titres d'anticorps neutralisants anti-AAV n'ont pas été utilisés comme critère de discrimination pour exclure les patients de l'étude. A l'époque, le titre d'anticorps nécessaire pour empêcher la transduction *in vivo* n'était pas connu (Manno et al., 2006). Or, parmi les 2 sujets recrutés dans la cohorte à forte dose (2×10^{12} vg/kg), l'un présentait un titre d'anticorps neutralisants de 1 :17 et n'a jamais présenté d'expression détectable du transgène, le facteur IX (F.IX) tandis que le second, avec un titre plus faible (1 :2), a développé un taux de F.IX à environ 10% du taux normal. Cette étude a donc permis de montrer que des titres relativement faibles d'anticorps neutralisants étaient suffisants pour neutraliser complètement des doses élevées de

vecteurs. Des études chez la souris (Murphy et al., 2008; Scallan et al., 2006) et les primates non humains (Hui et al., 2013; Jiang et al., 2006b) ont ensuite révélé que des titres d'anticorps aussi faibles que 1:5 étaient suffisants pour bloquer complètement la transduction hépatique des vecteurs AAVr, et que les vecteurs demeuraient sensibles à une neutralisation même des heures après administration intravasculaire.

La présence d'anticorps ou/et de facteurs neutralisants chez un futur patient pouvant complètement bloquer un transfert de gène à l'aide des vecteurs AAVr, l'immunité humorale préexistante chez les candidats à un essai clinique est donc maintenant systématiquement évaluée, afin de mettre en place si nécessaire des stratégies pharmacologiques d'immunomodulation (Hui et al., 2013) ou d'exclure le patient de la cohorte si le risque est trop élevé.

La transduction du vecteur AAVr n'est pas inhibée uniquement lors d'injection systémique, elle peut également être inhibée par les anticorps anti-AAV lorsque le vecteur est administré dans le liquide synovial de l'espace articulaire (Cottard et al., 2004; Mingozi and High, 2013), le système vasculaire du membre musculaire (Arruda et al., 2010; Rodino-Klapac et al., 2011), le ventricule cérébral (Samaranch et al., 2012) ou encore l'artère coronaire pour cibler le muscle cardiaque (Hajjar et al., 2008). A l'inverse, la présence d'anticorps anti-AAV ne semble pas empêcher la transduction lorsque le vecteur est administré par voie intra-parenchymateuse ou dans l'œil (Bennett et al., 2012; Kaplitt et al., 2007; Maguire et al., 2009).

Non seulement l'existence d'une réponse humorale préexistante dirigée contre la capsid de l'AAV peut se révéler problématique pour le transfert de gène à l'aide d'AAVr, mais la réponse induite suite à l'administration du vecteur peut également l'être. Les études de transfert de gène à l'aide d'AAVr ont montré que le déclenchement d'une réponse immunitaire humorale anti-AAV est systématique chez des individus séronégatifs après injection d'AAVr. En effet, ce phénomène a été décrit chez la souris (Chirmule et al., 2000), chez de gros animaux comme le chien (Haurigot et al., 2010) ou chez le primate (Jiang et al., 2006b; Nathwani et al., 2007). Et enfin cela a été décrit chez l'Homme dans des essais cliniques ciblant les déficits en alpha anti-trypsine (AAT) ou en F.IX (Flotte et al., 2011; Nathwani et al., 2011). L'apparition de cette réponse humorale dirigée contre la capsid du vecteur ne dépend ni de l'espèce, ni du sérotype, ni de la voie d'injection. Cette séroconversion ne semble pas avoir d'impact sur l'efficacité du transfert de gène. Elle est uniquement limitante

pour une potentielle ré-administration du vecteur dans les cas où cela serait nécessaire (Louis Jeune et al., 2013). Dans des études ciblant le foie ou le muscle, une deuxième administration d'un vecteur de même sérotype entraîne une inefficacité du transfert de gène (Chirmule et al., 2000; Scallan et al., 2006). Par contre, une deuxième administration d'un vecteur de sérotype différent du premier ne semble pas aboutir à la perte d'expression du transgène comme cela a été montré dans un essai clinique chez des patients atteints de déficit en LPL. Certains individus avaient déjà reçu un AAV2r en IM avant d'être injecté avec un AAV1r par la même voie. La présence de facteurs neutralisants contre l'AAV2r n'a pas empêché le transfert de gène avec l'AAV1r (Brantly et al., 2009). Cette stratégie peut ne pas fonctionner en cas de réaction croisée entre les sérotypes (Calcedo et al., 2009). Pour contrecarrer cette immunité humorale, l'augmentation de la dose injectée peut permettre de dépasser la neutralisation (Hurlbut et al., 2010). Une autre solution est la génération de variants synthétiques pouvant échapper aux anticorps neutralisants (cf. p40).

C. L'immunité adaptative cellulaire

1) Généralités

Les acteurs principaux de l'immunité adaptative cellulaire sont les lymphocytes T. Ils expriment le CD3 et représentent 45 à 70% des PBMC. Il existe deux types de LT en fonction du corécepteur qu'ils expriment : les LT CD8⁺ dits cytotoxiques ou les LT CD4⁺ dits auxiliaires ou *helper*. Ils sont présents à un ratio CD4:CD8 d'environ 2:1 dans les PBMC humaines (Kleiveland, 2015). Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques sont les effecteurs de la réponse immunitaire cellulaire, ils vont lyser les cellules infectées. Les LT auxiliaires vont permettre la stimulation d'autres cellules immunitaires comme les LB ou les LT CD8⁺.

Chaque lymphocyte T possède à sa surface un TCR unique spécifique d'un peptide antigénique. Le TCR est un hétérodimère composé d'une chaîne alpha et d'une chaîne bêta, pour les LT $\alpha\beta$, qui s'associe au niveau de la membrane plasmique avec un corécepteur CD4 ou CD8. Il existe également des lymphocytes dont le TCR est composé de deux chaînes protéiques : γ et δ , ce sont les lymphocytes T $\gamma\delta$ dits non conventionnels. Pour être activés, les LT doivent reconnaître leur peptide antigénique spécifique à la surface des cellules cibles. Le TCR ne reconnaît pas les antigènes directement, ceux-ci doivent être présentés par le CMH (ou Antigène des Leucocytes Humains HLA chez l'Homme) un complexe de protéines de surface présent à la surface des CPA (cf. p56).

L'activation et la prolifération des LT naïfs se fait dans les organes lymphoïdes secondaires où ont migré les DC activées et chargées avec l'antigène. Les DC sont capables de stimuler aussi bien la réponse cytotoxique médiée par les LT CD8⁺ que la réponse *T-helper* médiée par les LT CD4⁺. L'interaction TCR-pCMH seule n'est pas suffisante pour entraîner l'activation des LT CD4⁺ ou CD8⁺. Ceux-ci dépendent de 3 signaux d'activation. L'interaction entre le TCR et le complexe peptide-CMH apporte le premier signal d'activation aux LT et est la première étape pour la formation de la synapse immunologique (**Figure 17**). Si ce signal n'est pas présent les LT restent à l'état d'ignorance immunologique.

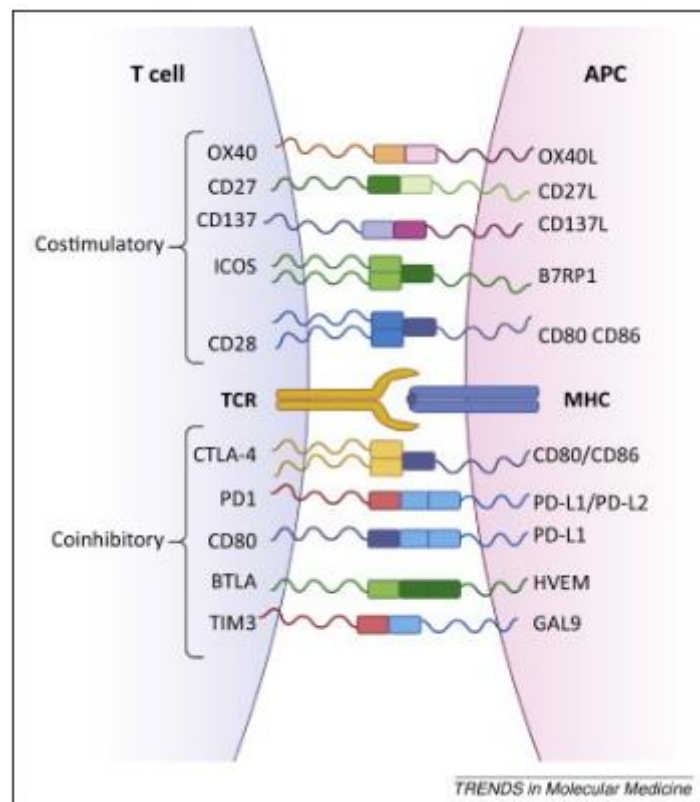


Figure 17 : Récepteurs costimulateurs et co-inhibiteurs dans la synapse immunitaire.

La mise au point de la réponse immunitaire est coordonnée par une pléthore de corécepteurs qui sont responsables de l'amplification ou de l'atténuation de la réponse immunitaire initiale. La plupart de ces récepteurs exigent que le récepteur des lymphocytes T (TCR) reconnaisse spécifiquement un peptide affiché par une molécule du CMH sur une cellule présentatrice d'antigène (CPA), pour délivrer leur signal costimulateur ou cohibiteur. Ces interactions peuvent avoir lieu soit dans des sites lymphoïdes secondaires où les lymphocytes T naïfs rencontrent l'antigène pour la première fois, soit dans la périphérie où les cellules effectrices peuvent être activées (ou supprimées). Abréviations : B7RP1, protéine 1 apparentée à la protéine B7 ; atténuateur de lymphocytes BTLA, B et T ; GAL9, galectine 9 ; HVEM, médiateur d'entrée de l'herpèsvirus ; ICOS, costimulateur inductible des cellules T ; TIM3, protéine 3 de la membrane cellulaire T (Pico de Coaña et al., 2015).

Le 2ème signal est également fourni par les DC et correspond à l'interaction entre les molécules co-stimulantes et leurs récepteurs à la surface des LT, comme les interactions CD80CD86/CD28 (Zheng et al., 2008). Sans ce 2ème signal, ou lorsque des signaux inhibiteurs sont émis au lieu de signaux d'activation, les lymphocytes T s'installent dans un état d'anergie et ne prolifèrent pas : ils ne sécrètent pas d'IL-2, une cytokine nécessaire à leur survie et leur prolifération, et peu d'IFN- γ . Enfin, la reconnaissance de l'antigène sans stimulation peut également induire une inhibition de la réponse plutôt qu'une anergie et donc être tolérogène. En effet, les LT peuvent exprimer CTLA4 qui en se liant au B7 va délivrer, contrairement au CD28, un signal inhibiteur aux LT (**Figure 17**). Cette interaction a notamment lieu lorsque les CPA présentent des antigènes du soi à leur surface. Il est également généralement admis que le contexte cytokinique *in situ* des lymphocytes T dans les tissus infectés favorise les fonctionnalités acquises lors du processus de différenciation, cela correspond au 3ème signal. D'autres cellules peuvent également agir en tant que cellules CPA, en particulier les macrophages et les lymphocytes B. Cependant, seules les DC peuvent initier des réponses des lymphocytes T primaires (Abbas et al., 2016).

Une fois activés, les LT CD4⁺ se différencient en plusieurs sous-ensembles qui se distinguent par le type de cytokines sécrétées, les facteurs de transcription exprimés, les marqueurs phénotypiques, le potentiel migratoire ainsi que les fonctions effectrices en réponse à un antigène (**Figure 18**).

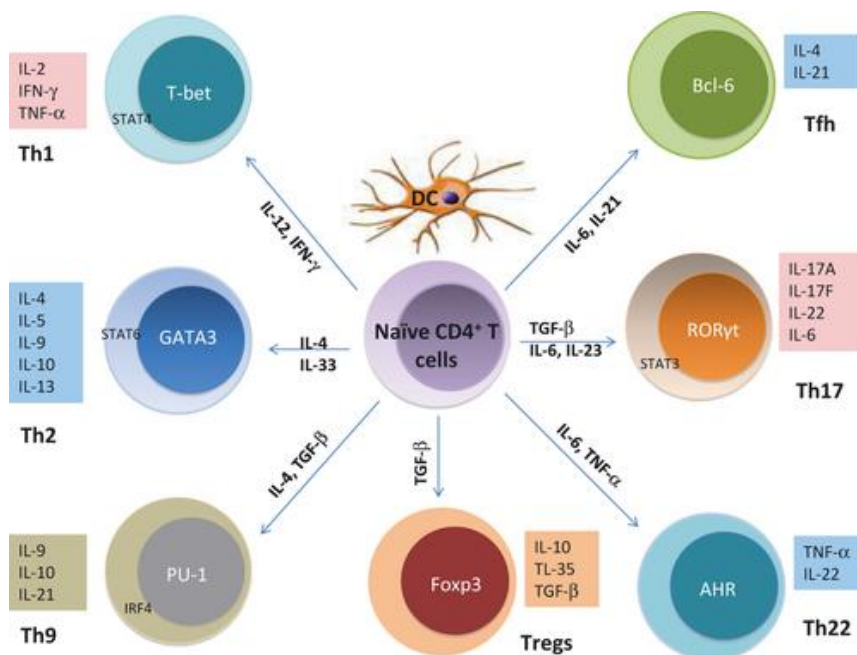


Figure 18 : Différenciation de LT CD4⁺ naïfs en sous-ensembles de LT CD4⁺.

Lors de l'activation des récepteurs des lymphocytes T par les cellules dendritiques présentant l'antigène, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs se différencient en cellules Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh et Treg contrôlées par leurs facteurs de transcription respectifs dans un milieu unique à polarisation cytokinique. En présence d'IL-12 et d'IFN- γ , les lymphocytes T CD4⁺ naïfs se différencient en lymphocytes Th1 avec activation du facteur de transcription T du régulateur maître par STAT4. D'autre part, l'IL-4 et l'IL-33 favorisent l'activation des STAT6 et GATA3, qui induisent la différenciation des cellules Th2. La combinaison des cytokines immunosuppressives TGF- β et IL-4 active l'IRF4 et le PU-1 et favorise la différenciation des cellules Th9. La cytokine immunosuppressive TGF- β et les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-23 pilotent la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en cellules Th17 par l'activation de STAT3 et ROR γ t. L'association de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α induit l'activation de la PA et favorise la différenciation des cellules Th22. Les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-21 induisent l'activation Bcl-6 et la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en Tfh. TGF- β favorise l'induction de Tregs, qui sont contrôlés par le facteur de transcription Foxp3 (Liu et al., 2013).

Différents facteurs orientent cette différenciation parmi lesquels l'environnement cytokinique et l'intensité de l'interaction entre le TCR et le CMH semblent jouer un rôle majeur (Boyton and Altmann, 2002; Edwards and Evavold, 2011). Parmi ces sous-populations de LT CD4⁺, les LTh1 favorisent la réponse immune contre les pathogènes intracellulaires tandis que les LTh2 favorisent plutôt la réponse contre les parasites extracellulaires. Les LTh2 inhibent les réponses Th1, et *vice versa* (Abbas et al., 1996). Ils permettent une fonction *help* optimale pour la réponse humorale. Les LT CD4⁺ peuvent également se différencier en lymphocytes T régulateurs (Treg). Ces cellules ont une activité suppressive sur la réponse immunitaire et préviennent les réponses autoimmunes et allergiques. Les Treg naturels se différencient dans le thymus et expriment fortement et de manière constitutive le CD25 (la sous-unité alpha du récepteur à l'IL2). Ils expriment également de manière stable le facteur de transcription Foxp3 (*forkhead box P3*), requis pour l'activité suppressive de ces cellules. Les Treg produisent de forte quantité d'IL-10 et/ou de TGF- β qui vont avoir un effet suppresseur sur les LT effecteurs (Vignali et al., 2008). Les cellules Treg peuvent supprimer les réponses des lymphocytes T dans l'infection aiguë et dans la phase aiguë de l'infection virale chronique comme dans le cas d'infection par le VIH (Virus de l'immunodéficience humaine) et l'HCV (Virus de l'hépatite C) (Delhem et al., 2008; Hasenkrug et al., 2018).

Une fois activés, les lymphocytes T CD8⁺ quant à eux vont se différencier en CTL (Lymphocyte T cytotoxique). Leur cytotoxicité leur est conférée par leur capacité à libérer, dans l'espace intermembranaire de la synapse immunologique, des granules cytotoxiques qui contiennent de la perforine et du granzyme. Les molécules de perforine se multimérisent pour

former un pore membranaire par lequel les molécules de granzymes peuvent entrer dans la cellule cible. Une fois à l'intérieur du cytosol, les protéines granzymatiques activent les caspases cellulaires, provoquant ainsi l'apoptose des cellules cibles (Bossi and Griffiths, 2005; de Saint Basile et al., 2010). L'apoptose peut également être induite par la reconnaissance de ligands membranaires par leur récepteur, par exemple FAS (*apoptosis-stimulating fragment*) et son ligand (FAS-L) (Anel et al., 1994). En plus de leur fonction cytotoxique principale, les lymphocytes T CD8⁺ sécrètent également diverses cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-2...) qui permettent la mobilisation des autres cellules immunitaires. Tout comme les LT CD4⁺, les LT CD8⁺ ont plusieurs profils cytokiniques équivalents à ceux observés chez les LT CD4⁺ (Tc1, Tc2) (Seder and Le Gros, 1995).

Les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ effecteurs ont une durée de vie limitée. Après élimination du pathogène, la plupart des lymphocytes issus de l'expansion clonale meurt par apoptose durant la phase de contraction de la réponse immunitaire. Mais des LT mémoire persistent afin de répondre plus rapidement et plus efficacement en cas de seconde rencontre avec le même pathogène. Les LT mémoire et les LT naïfs se distinguent par l'expression de différents isoformes du marqueur CD45 : CD45RO pour les LT mémoire et CD45RA pour les LT naïfs. Les LT mémoire sont séparés en deux groupes majeurs : les LT de la mémoire centrale (TCM) et des LT effecteurs mémoire (TEM). Ces deux sous-types se différencient par les marqueurs qu'ils expriment, leur profil de migration mais également par les cytokines qu'ils sécrètent (Okada et al., 2008; Sallusto et al., 2004). Chez l'Homme, les TCM expriment les marqueurs CD45RO, CD62L, le CD27, le CD28 et CCR7 (**Figure 19**).

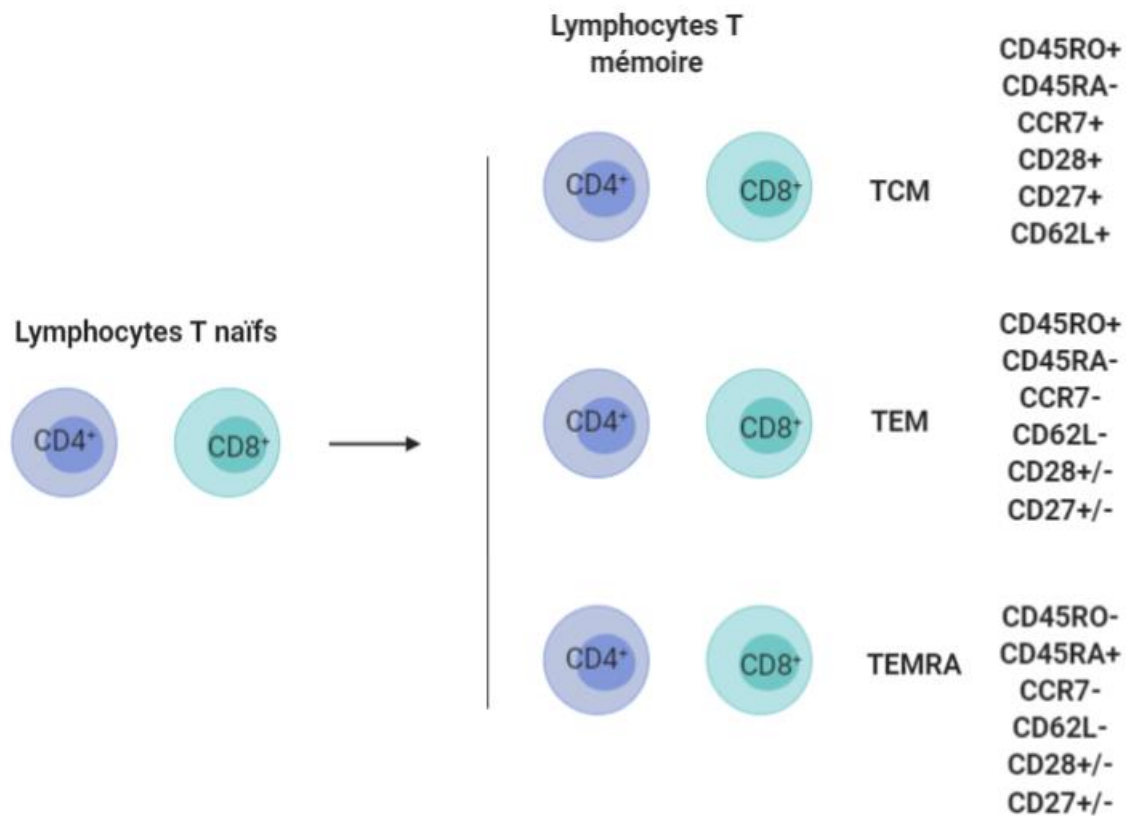


Figure 19 : Sous-ensembles de LT mémoire

TCM, LT central mémoire ; TEM, LT effecteur mémoire ; TEMRA, LT effecteur mémoire terminalement différenciés.

Ils sont retrouvés dans les tissus lymphoïdes secondaires et ont la propriété de se diviser rapidement et de se différencier en cellules effectrices en réponse à un antigène. Les TEM, quant à eux, expriment le CD45RO mais pas CD62L ni CCR7, elles peuvent exprimer le CD28 et le CD27. Ils circulent dans les tissus périphériques et ont une capacité proliférative limitée mais une fonction effectrice prononcée (Tanel et al., 2009). Il est important de noter qu'une sous-population de T_{EM} très différenciée re-exprime le CD45RA: ce sont les T_{EMRA}. Les T_{EMRA} CD8⁺ possèdent des capacités de proliférations faibles mais expriment de fort niveau d'IFN- γ et de molécules cytotoxiques (perforine, FAS-L) après activation du TCR (D'Asaro et al., 2006; Geginat et al., 2003). Des T_{EMRA} CD4⁺ ont également été décrit dans le cas d'infections virales chroniques mais leur rôle fonctionnel n'a pas encore été déterminé (Libri et al., 2011; Tian et al., 2017). Il est largement admis que la présence des T_{EMRA} effectrices CD8⁺ résulte de l'exposition chronique des LT CD8⁺ à leur antigène, comme par exemple dans le cas de GVHD (D'Asaro et al., 2006) ou de transplantation cardiaque (Barbarash et al., 2016). Les T_{EMRA} sont également souvent observées dans le cadre

d'infections virales chroniques comme le CMV, le VIH ou l'HCV (Eberhard et al., 2016; Shen et al., 2010a; Weltevrede et al., 2016).

Un autre phénomène observé dans le cadre d'infections virales est l'épuisement des LT. Bien que des lymphocytes T antiviraux robustes et très efficaces contribuent à l'élimination de nombreuses infections aiguës, la persistance virale est associée au développement progressif de réponses des lymphocytes T épuisées et fonctionnellement réduites. Cet épuisement, qui se met en place sous l'influence de divers facteurs, dont l'environnement inflammatoire, peut aboutir à la suppression des lymphocytes T antiviraux. L'un des premiers signes d'épuisement est la perte de la sécrétion d'IL-2 (Fuller et al., 2004; Wherry et al., 2003). La production d'autres cytokines comme le TNF- α est ensuite supprimée. La production d'interféron IFN- γ , de bêta-chemokine, ainsi que les activités effectrices cytolytiques sont plus résistantes à l'inactivation, bien que ces capacités soient également éteintes dans les sous-groupes les plus épuisés (Fuller et al., 2004; Mackerness et al., 2010; Zhou et al., 2004). Cet épuisement de la réponse compromet le contrôle de la charge virale mais peut servir à atténuer les dommages causés par le système immunitaire. Le degré d'épuisement varie selon le type d'infection et est généralement en corrélation positive avec la charge virale (Wherry and Kurachi, 2015).

Dans le contexte de l'épuisement des lymphocytes T, le récepteur PD-1 est régulé à la hausse sur les lymphocytes T spécifiques du virus pendant de nombreuses infections virales chroniques, comme le VIH ou l'HCV, et limite leur fonction et leur capacité proliférative (Day et al., 2006; Golden-Mason et al., 2007). L'expression individuelle de PD1 ou d'autres récepteurs inhibiteurs n'est pas un signe d'épuisement : c'est la co-expression de récepteurs inhibiteurs multiples qui en fait une caractéristique essentielle. Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent également perdre leur fonction effectrice pendant les infections virales chroniques (Brooks et al., 2005; Fuller et al., 2004). Le phénomène reste semblable à celui observé chez les LT CD8⁺ mais les LT CD4⁺ semblent perdre leur fonction effectrice plus tôt que les cellules T CD8⁺ (Crawford et al., 2014).

2) L'immunité adaptative cellulaire anti-AAV

a. Principaux outils d'analyse de l'immunité adaptative cellulaire anti-AAV chez l'Homme

Plusieurs méthodes ont été mises au point pour détecter les réponses cellulaires dirigées contre divers sérotypes d'AAV.

L'*Enzyme-linked immunosorbent spot* (ELISpot) est la méthode la plus couramment utilisée dans les études précliniques et cliniques pour détecter et quantifier les LT spécifiques de la capsid AAV présents dans un échantillon cellulaire (PBMC, splénocytes, ganglions lymphatiques, infiltrats tissulaires...). Il permet la détection des LT par leur capacité à sécréter des cytokines ou autres facteurs solubles en réponse à une stimulation antigénique (Martino et al., 2011b). Cette méthode, relativement simple à mettre en œuvre, ne nécessite qu'un faible nombre de cellules (environ $2 \cdot 10^6$ cellules), permettant donc un suivi longitudinal du patient au cours du temps. L'ELISpot possède une sensibilité de détection élevée (en moyenne un LT spécifique de l'antigène pour 500.000 à 1.000.000 de cellules totales). Plus récemment, des tests Fluorospot (basé sur l'ELISpot) ont permis d'évaluer simultanément jusqu'à 4 analytes différents en remplaçant la révélation enzymatique par une détection fluorométrique. Il est par ailleurs possible de déterminer la ou les sous-populations responsables de la sécrétion de l'analyte en effectuant un tri magnétique ou cytométrique des cellules au préalable (par exemple, $CD8^+$ ou $CD4^+$, déplétion des LT des PBMC).

Actuellement, la détection d'une immunité cellulaire anti-AAV se fait principalement par ELISpot IFN- γ sur des PBMC (**Figure 20**), car l'IFN- γ est une des cytokines antivirales clés impliquées dans l'immunité cellulaire spécifique AAV (Basner-Tschakarjan and Mingozzi, 2014; Martino et al., 2011b). Les cellules sont donc cultivées, avec ou sans signaux de stimulation, dans une plaque de culture possédant des membranes dont la surface a été préalablement recouverte d'anticorps de capture de l'analyte étudié. Dans le cas de l'AAV, les cellules sont habituellement stimulées par des pools peptidiques qui se chevauchent et qui couvrent toute la séquence protéique de la capsid. Après un temps d'incubation, les cellules sont lavées et la présence des facteurs sécrétés est détectée grâce à des anticorps de détection. Lors de la révélation enzymatique (ou par des fluorochromes dans le cas des Fluorospots), des points (ou spots) apparaissent là où les cellules ont répondu à la stimulation antigénique. Chaque spot correspond à une cellule sécrétrice. Le nombre de spots dans chaque puits est compté par un lecteur ELISpot et les résultats sont ensuite exprimés en nombre de cellules

sécrétrices (SFC, *Spot-Forming Cells*) par million de cellules totales dans l'échantillon. La limite majeure de cette technique est l'impossibilité de réaliser une caractérisation phénotypique des cellules sécrétrices.

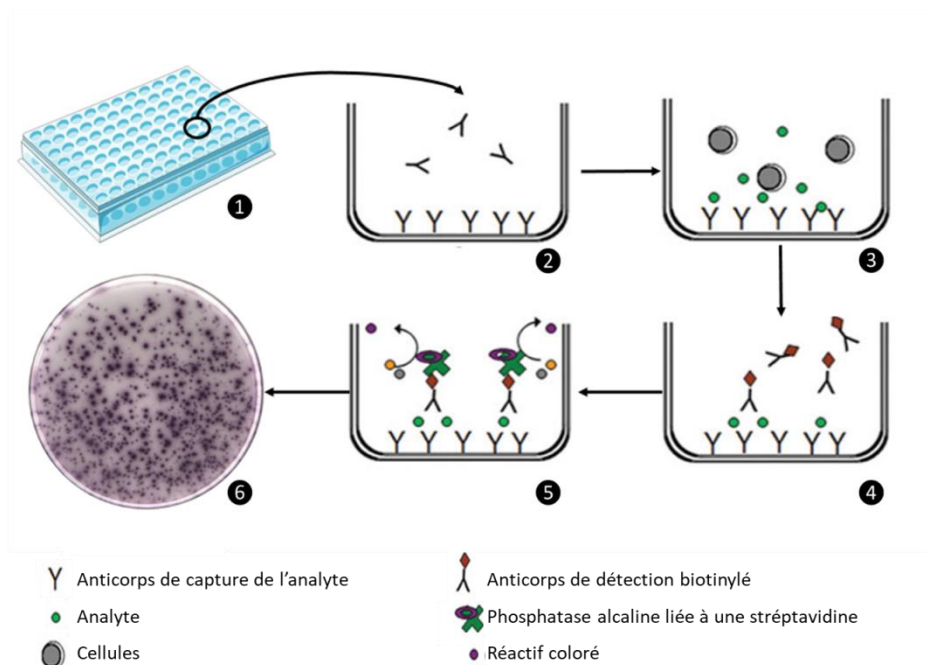


Figure 20 : Schéma du principe de l'Elispot

(1) L'ELISpot se fait en plaque 96 puits. (2) Le fond de plaque est tapissé par des anticorps de capture. (3) Les cellules vont sécréter l'analyte en réponse à une stimulation (4) Celui-ci va être fixé les anticorps de détection biotinylés. (5) La biotine va être mis en contact avec la streptavidine qui est couplé à un substrat. La phosphatase alcaline va dégrader le substrat en produit coloré. (6) Des spots colorés vont apparaître au fond du puits comme étant des cellules sécrétrices de l'analyte. Adapté de Streeck et al., 2009

Les essais de cytotoxicité permettent l'étude de la fonctionnalité des LT CD8⁺ spécifiques d'un antigène donné par mesure de la réponse cytotoxique (Finn et al., 2010; Martino et al., 2013; Pien et al., 2009). Les cellules effectrices (splénocytes, PBMC, lymphocytes T CD8⁺...) sont co-cultivées avec des cellules cibles (transduites avec des vecteurs AAVr ou chargées de peptides dérivés de la capside), puis le pourcentage des cellules cibles tuées est déterminé. Le rapport de lyse des cellules cibles est quantifiable en suivant la quantité de certaines molécules qui sont libérées dans le surnageant cellulaire après la rupture de la membrane plasmique des cellules cibles. Ce suivi peut se faire par marquage des cellules cibles avec l'isotope radioactif ⁵¹Cr avant incubation et mesure de la radioactivité dans le surnageant cellulaire (Miller and Dunkley, 1974). De nombreuses alternatives non radioactives comme la mesure de la lactate déshydrogénase (LDH) ont également été

proposées. La sensibilité varie en fonction de la technique utilisée (Fotakis and Timbrell, 2006).

La cytométrie en flux est une autre technique qui permet l'analyse d'un plus grand nombre de paramètres en simultanée au niveau unicellulaire et cela sur des milliers de cellules par seconde. Elle permet donc dans un même échantillon, non seulement, une analyse phénotypique et fonctionnelle, mais va également permettre le tri des cellules d'intérêt afin d'effectuer des tests complémentaires *in vitro* (Herzenberg et al., 2002; Li et al., 2011a). Des outils ont également été développés afin d'intégrer la reconnaissance antigénique des cellules du système immunitaire au large panel des paramètres analysables en cytométrie en flux. C'est notamment les cas des multimères de CMH. Il s'agit de complexes peptide/CMH (de classe I ou II) (pCMH) fluorescents qui vont permettre la détection, le dénombrement, la caractérisation et l'isolement des lymphocytes $CD4^+$ ou $CD8^+$ (en fonction du pCMH utilisé).

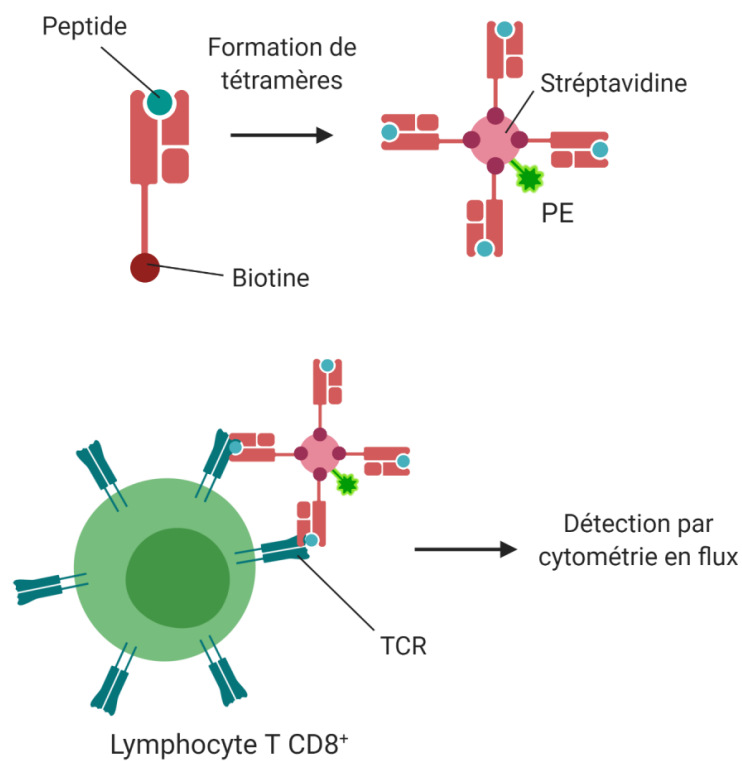


Figure 21 : Construction et utilisation de tétramères peptide-CMH I pour la détection des cellules $CD8^+$ T spécifiques de l'antigène.

Quatre monomères biotinylés de pCMH I sont assemblés autour d'une seule bille de streptavidine pour former le tétramère pCMH I. La bille de streptavidine est préalablement conjuguée à un fluorochrome (ex. : phycoérythrine, PE). La population cellulaire à analyser est incubée avec les tétramères : seules les cellules T $CD8^+$ présentant des TCR spécifiques pour les complexes de pCMH I formant les tétramères sont liés par eux et deviennent ainsi marqués par fluorescence et seront donc détectables par cytométrie en flux.

Des monomères pCMH solubles sont capables d'interagir de manière très spécifique avec les TCR reconnaissant le peptide du complexe à la surface des LT. La multimérisation de ces complexes biotinylés autour d'une bille de streptavidine fluorescente permet d'augmenter l'avidité. L'engagement simultané de plusieurs TCR par des multimères pCMH stabilise l'interaction résultante et permet la détection des cellules T spécifiques de l'antigène par cytométrie de flux. Cet outil s'est avéré d'une grande efficacité dans la surveillance des lymphocytes T CD8⁺ antiviraux dans des contextes cliniques comme la vaccination, l'oncologie ou même l'auto-immunité (Altman and Davis, 2003; Bentzen and Hadrup, 2017; Schappert et al., 2018).

b. La réponse cellulaire anti-AAV : une limitation apparue en essai clinique

La réponse cellulaire T cytotoxique dirigée contre l'AAV a été décrite pour la toute première fois lors d'un essai clinique de phase I/II chez des patients hémophiles. Aucune réponse cellulaire cytotoxique n'avait été observée lors de l'évaluation préclinique de ce protocole de thérapie génique dans des modèles de souris et de chiens déficients en F.IX (Mount, 2002; Snyder, 1999). Les animaux recevaient par voie intraportale un AAV2r codant pour le F.IX permettant une expression de la protéine à long terme et à un taux thérapeutique. Le traitement a donc été amené en clinique. Mais chez l'Homme, le transfert de gène par voie hépatique a abouti à une expression transitoire du F.IX, celle-ci diminuant entre 4 et 8 semaines après injection, pour finalement être complètement abrogée à dix semaines (Manno et al., 2006). La perte d'expression du transgène corrélait avec une augmentation asymptomatique transitoire et réversible des taux de transaminases hépatiques (**Figure 22**), un indicateur d'une cytolysse hépatique. Cette observation était corrélée à la détection d'une sécrétion d'IFN- γ par les PBMC contre la capsid de l'AAV2 entre quatre et six semaines post-injection. Ces ELISpot IFN- γ ont également permis l'identification d'un épitope immunodominant restreint au HLA B*0702 dérivé de la capsid de l'AAV2 (VPQYGYLTL).

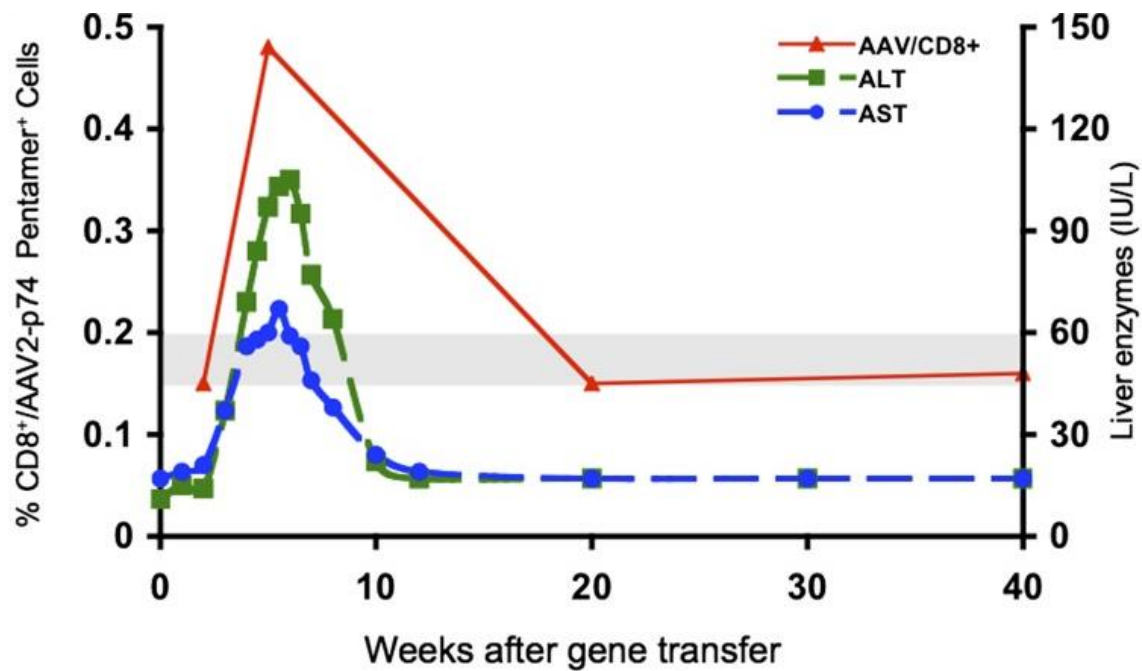


Figure 22 : Expansion d'une population de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la capsid après injection d'un vecteur AAV2r.

Évolution temporelle des transaminases sériques et fréquence des LT CD8⁺ spécifiques de la capsid de l'AAV2 dans les PBMC, chez un sujet injecté à une dose de 4×10^{11} vg/kg (Mingozzi and High, 2013).

Une analyse plus poussée de la réponse immune a montré que l'augmentation transitoire des transaminases était corrélée à une augmentation de la fréquence des LT spécifiques de la capsid. Celle-ci a été suivie au cours du temps à l'aide de pentamères de molécules de CMH I chargées avec le peptide immunodominant de l'AAV2 identifié précédemment et commun aux AAV de sérotype 1, 6, 7 et 8 (**Figure 22**). L'hypothèse émise a donc été que suite au transfert de gène et donc à la réexposition à l'AAV, des LT CD8⁺ mémoire spécifiques de la capsid de l'AAV auraient été réactivés et auraient détruit les hépatocytes transduits exprimant le transgène d'intérêt, menant donc la perte de l'expression du F.IX (**Figure 23**) (Mingozzi et al., 2007a). De plus, les hépatocytes joueraient un rôle de cellules présentatrices dans ce contexte (Pien et al., 2009). Les particules d'AAV seraient dégradées par le protéasome et les peptides résultants seraient ensuite chargés sur des CMH I, ce qui permettrait donc la reconnaissance par les LT CD8⁺ anti-AAV préexistants et la destruction des hépatocytes transduits.

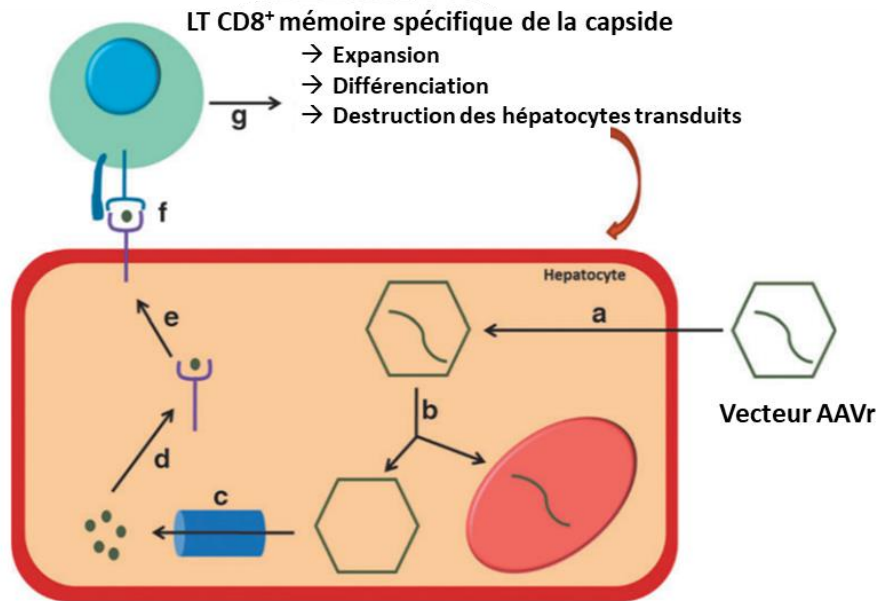


Figure 23 : Modèle du traitement des capsides dans les hépatocytes et présentation aux LT CD8⁺ mémoire spécifiques de l'AAV.

(a) Après administration, les vecteurs AAVr entrent dans les hépatocytes par endocytose par les récepteurs. (b) Après s'être échappé de l'endosome et avoir été désencapsidé, l'ADN vecteur se dirige vers le noyau où il va permettre l'expression du transgène. (c) Les capsides sont clivées par le protéasome (ou immunoprotéasome) en peptides courts. (d) Les peptides dérivés de la capside sont transportés au réticulum endoplasmique et chargés sur des molécules de classe I du CMH. (e) Les complexes AAV-peptide/CMH sont transportés vers la membrane, où ils marquent les hépatocytes transduits comme cibles pour les LT CD8⁺ mémoire spécifique de la capside. (f) Les épitopes dérivés d'AAV sont présentés aux LT CD8⁺ mémoire par interaction entre le TCR et le complexe peptide/CMH de l'AAV. (g) Lors de la reconnaissance de l'antigène, les LT CD8⁺ mémoire subissent une expansion et une différenciation en cellules effectrices cytotoxiques qui peuvent éliminer les hépatocytes transduits par la sécrétion de cellules cytolytiques ou l'expression de ligands qui provoquent la mort (Vandamme et al., 2017).

La présence d'une réponse médiée par les lymphocytes spécifiques de la capside de l'AAV a été décrite dans d'autres essais chez l'Homme. Dans un essai clinique visant à traiter des patients atteints de déficit en Lipoprotéine lipase (LPL), une réponse IFN- γ dirigée contre l'AAV1 a été détectée (Mingozzi et al., 2009). Cette réponse IFN- γ apparaissant plus précocement chez les patients injectés à forte dose (3×10^{11} vg/kg) par rapport à ceux injectés à une dose moins forte (1×10^{11} vg/kg), suggérant une réponse dose-dépendante. Chez un patient, l'apparition de cette réponse était également corrélée à la perte d'expression du transgène et à une augmentation transitoire de créatine kinase dans le sérum, ce qui n'est pas sans rappeler ce qui a été observé chez les patients hémophiles.

L'activation de la réponse cellulaire spécifique à l'AAV dans le foie a de nouveau été signalée au cours d'un autre essai clinique de transfert de gène visant le foie pour l'hémophilie B (Nathwani et al., 2011). Cette fois-ci, un vecteur AAV8r codant pour un transgène F.IX optimisé (toujours sous le contrôle d'un promoteur spécifique du foie), a été injecté dans une veine périphérique chez des patients souffrant d'hémophilie B sévère sans taux détectable d'anticorps anti-AAV neutralisants. Les deux premières cohortes posologiques se sont déroulées sans incident notable mais les sujets de la cohorte recevant la dose élevée (2×10^{12} vg/kg) ont de nouveau présenté une expression de F.IX à des taux de 8 à 10 % pendant 8 semaines, après quoi les taux de F.IX ont commencé à baisser alors que les taux de transaminases sériques ont rapidement augmenté, ainsi que les taux des LT anti-AAV circulants (**Figure 24**). Dès le début de l'élévation des taux de transaminases, les sujets ont été soumis à un régime de stéroïdes à forte dose qui a permis de contrôler rapidement l'activation des lymphocytes T spécifiques de l'AAV et ainsi de rétablir partiellement les taux de F.IX (Nathwani et al., 2011) (cf. p87).

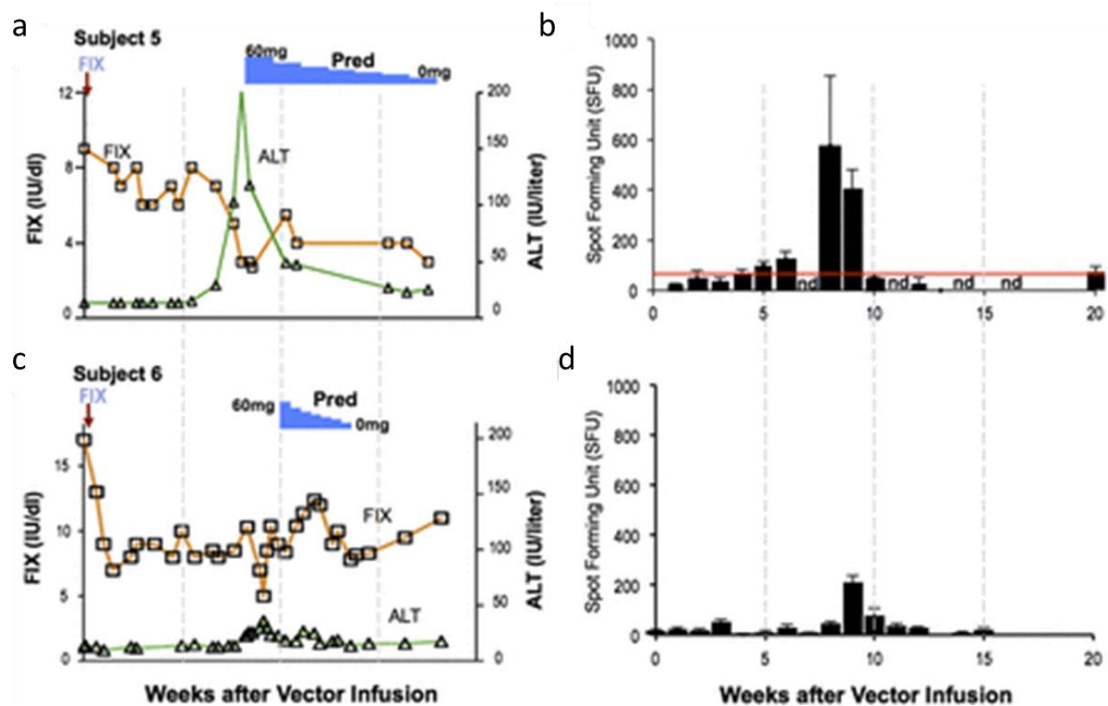


Figure 24 : Immunité cellulaire en réponse à la capsid dans un essai clinique avec un AAV8-F.IX.

(a-b) Le sujet 5 a reçu une dose de vecteur de 2×10^{12} vg/kg. A 8 semaines post-injection, l'expression d'un F.IX diminue (ligne orange) et les transaminases du foie augmentent (ALT, ligne verte). En parallèle, les LT spécifiques de la capsid deviennent détectables dans le sang périphérique. L'administration de la prednisolone a été associée à la résolution de la transaminite et au sauvetage partiel des niveaux d'expression du transgène F.IX. (c-d) Le sujet 6, qui a reçu une dose de 2×10^{12} vg/kg, a connu une augmentation des enzymes hépatiques et

a rapidement été traité aux stéroïdes. Chez ce sujet, l'augmentation des enzymes hépatiques et la diminution des niveaux d'expression du transgène F.IX ont également été associées à la détection LT spécifiques de la capsidie dans les PBMC (Mingozzi and High, 2013).

Un autre phénomène a été observé dans un essai clinique visant à traiter des patients présentant un déficit en AAT. Les patients ont reçu par voie IM un AAV1r contenant le transgène AAT. L'initiation d'une réponse cellulaire contre la capsidie de l'AAV1r a également été observée. Mais contrairement à l'essai ciblant le déficit en LPL, cette réponse immune envers la capsidie ne s'est pas accompagnée d'une perte d'expression du transgène (Flotte et al., 2011). Ce phénomène non délétère vis-à-vis du produit du transgène s'explique par la mise en place d'une tolérance immunitaire vis-à-vis des antigènes de capsidie. En effet, cette équipe a décrit la présence de capsidies virales dans le muscle injecté en plus d'une infiltration de Treg spécifiques de la capsidie de l'AAV à un an post-injection (Mueller et al., 2013). Les résultats de cet essai à 5 ans montrent toujours une expression du transgène ainsi qu'un maintien de la réponse des Treg spécifiques de l'AAV, accompagné d'un épuisement des LT CD8⁺ cytotoxiques spécifiques de l'AAV (Mueller et al., 2017).

La voie d'administration semble être un facteur majeur dans l'initiation d'une réponse cellulaire dirigée contre la capsidie puisque ces réponses ont été décrites dans des essais cliniques ciblant le foie ou le muscle. En effet, un AAVr ciblant le foie semble plutôt induire une réponse immunogène alors qu'une injection IM semble favoriser une réponse tolérogène. A l'inverse, ce phénomène ne semble pas être une limite dans l'efficacité du transfert de gène dans des essais ciblant les sites dits « immunoprivilégiés » comme l'œil ou le système nerveux central. Pour les maladies de la rétine, comme l'Amaurose congénitale de Leber, des patients déficitaires en RPE65 ayant reçu un vecteur AAV2r par voie sous-rétinienne ont même été réinjectés dans l'œil controlatéral sans effet délétère (Bennett et al., 2012). Il est important de noter qu'à la différence des transferts de gène dans le muscle et le foie, de faibles doses de vecteurs étaient injectées, ce qui pourrait aussi expliquer l'absence d'une réponse immune puisque celle-ci semble être proportionnelle à la dose de capsidie administrée.

La découverte de la possibilité d'une réponse cellulaire contre l'AAVr dans le cadre d'un transfert de gène a incité la communauté scientifique à s'intéresser davantage à l'immunité cellulaire anti-AAV préexistante et à son impact sur le transfert de gène *via* l'AAVr (Basner-Tschakarjan and Mingozzi, 2014; Mingozzi and High, 2013; Vandamme et al., 2017).

c. Prévalence et caractérisation de la réponse cellulaire préexistante anti-AAV

Suite à ces diverses observations, la question du screening de patients pour une éventuelle réponse cellulaire dirigée contre la capsid, en plus de la recherche de facteurs neutralisants humoraux, a donc été soulevée. Des études de prévalence des lymphocytes T spécifiques de la capsid chez l'Homme ont donc émergé.

La prévalence de l'immunité cellulaire anti-AAV dans la population générale a été rapportée par plusieurs études (Chirmule et al., 1999; Hui et al., 2015; Kruzik et al., 2019b; Li et al., 2011a; Mingozzi et al., 2007a; Veron et al., 2012), utilisant différents protocoles et critères de positivité. Les résultats sont résumés dans le **Tableau 4**. L'ensemble de ces études est loin de couvrir toute la diversité des sérotypes AAVr utilisés dans les essais cliniques

L'équipe de Mingozzi a évalué la prévalence des LT spécifiques de la capsid de l'AAV2. Pour cela, les PBMC de donneurs positifs en facteurs neutralisants contre l'AAV2 ont été analysés en mesurant la production d'IFN- γ par ELISpot où les cellules ont été stimulées et/ou amplifiées avec des pools peptidiques se chevauchant couvrant toute la séquence AAV2. Seulement deux donneurs sont sortis positifs après une analyse directe *ex vivo*. Une méthode d'expansion *in vitro* des cellules a donc été réalisée et a permis de mettre en évidence un plus grand nombre de patients présentant une population lymphocytaire répondant à l'AAV et avec un phénotype mémoire (Hui et al., 2015; Mingozzi et al., 2007a). Ces résultats suggèrent qu'il n'existe peut-être pas de corrélation entre la présence de facteurs neutralisants et la présence d'une réponse cellulaire. De plus, les analyses *ex vivo* à partir de PBMC montrent que la fréquence en LT spécifiques de la capsid est faible et que l'absence de détection peut provenir de la limite de sensibilité des tests cellulaires (cf. p75) (Mingozzi et al., 2007a). Ces travaux ont également montré une prévalence plus élevée des réponses des lymphocytes T dans les splénocytes comparée à celles observées dans les PBMC. Cela pourrait indiquer que les lymphocytes T spécifiques d'AAV ne recirculent pas dans le sang périphérique et restent plutôt dans les organes lymphoïdes secondaires.

Sérotyp	Echantillons	Méthode	Positif/Total	Phénotyp	Fonctionnalité	Référence
AAV2	PBMC	Prolifération lymphocytaire; Sécrétion d'IFN- γ en réponse à la capsid	3/57 (6%)	N.A.	N.A.	Chirmule <i>et al.</i> , 1999
AAV2	PBMC	Marquage intracellulaire de cytokines sur les cellules stimulées avec des peptides AAV en présence d'anti-CD28 et d'anti-CD49d	8/17 (47%)	CD45RO ^{hi} CD27 ^{hi} Cellules mémoires centrales	IFN- γ , IL-2, TNF- α	Li <i>et al.</i> , 2011
AAV2	PBMC	ELISpot IFN- γ sur cellules non amplifiées	2/46 (4%)	CD45RA ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁻ Cellules mémoires centrales	IFN- γ	Mingozzi <i>et al.</i> , 2007
	Splénocytes	ELISpot IFN- γ sur cellules non amplifiées	2/28 (7%)			
	PBMC	ELISpot IFN- γ sur cellules amplifiées avec des peptides de l'AAV ou des capsides entières	2/7 (28%)			
	Splénocytes	ELISpot IFN- γ sur cellules amplifiées avec des peptides de l'AAV ou des capsides entières	9/15 (60%)			
AAV2/1	Splénocytes	ELISpot IFN- γ sur cellules non amplifiées	2/44 (4.55%)	CD45RO ⁺ cellules mémoires	IFN- γ , IL-2, TNF- α , CD107a, cytotoxicité	Hui <i>et al.</i> , 2015
		ELISpot IFN- γ sur cellules amplifiées avec des peptides de l'AAV ou des capsides entières	20/32 (62.5%)			
AAV2	PBMC	ELISpot IFN- γ sur cellules non amplifiées	19/90 (21%)	N.A.	IFN- γ , IL-2	Kruzik <i>et al.</i> , 2019
AAV5	PBMC		24/90 (26%)			
AAV8	PBMC		20/90 (21%)			
AAV1	PBMC	ELISpot IFN- γ sur cellules stimulées avec LV/VP1	16/55 (29%)	CD45RA ⁻ CD62L ⁻ Cellules mémoires	IFN- γ	Veron <i>et al.</i> , 2012

Tableau 4 : Prévalence des réponses médiées par les lymphocytes T spécifiques de l'AAV chez les donneurs sains.
N.A., Non Applicable, mise à jour à partir de Vandamme *et al.*, 2017.

Veron *et al.* a effectué une étude de prévalence pour le sérotype 1 par ELISpot IFN- γ où les cellules ont été stimulées avec un vecteur lentiviral codant VP1 et a montré que la plupart des donneurs positifs présente une réponse médiée par les LT CD8⁺ (Veron et al., 2012). Une autre étude s'est intéressée à la prévalence de la réponse cellulaire préexistante contre le sérotype 2 chez l'homme mais également chez le primate pour l'AAV de sérotype 8 (Li et al., 2011a). Ils ont utilisé la cytométrie en flux et le marquage intracellulaire de cytokines sur des PBMC stimulées avec un pool de peptides de capsid AAV2 ou AAV8 en présence d'anticorps anti-CD28 et anti-CD49d. Cela a permis de montrer qu'en plus de l'IFN- γ , les LT spécifiques d'AAV (CD8⁺ et CD4⁺) pouvaient également produire de l'IL-2 et du TNF- α .

Enfin plus récemment, une équipe a réalisé une étude de prévalence de la réponse cellulaire préexistante contre les AAV de sérotypes 2, 5 et 8 par ELISpot IFN- γ et a montré une prévalence assez similaire entre les 3 sérotypes (Kruzik et al., 2019b). La sécrétion d'IL-2 a également été testée et les LT sécrétant de l'IL-2 en réponse aux peptides de l'AAV semblent beaucoup plus rares que ceux sécrétant l'IFN- γ . L'immunité humorale a également été testée et les titres en anticorps anti-AAV ne corrèlent pas avec la sécrétion d'IFN- γ observée en ELISpot anti-AAV. Ces résultats suggèrent là encore une absence de corrélation entre la composante cellulaire et humorale de l'immunité préexistante anti-AAV.

Il est important de mentionner que les études décrites ici ont été réalisées avec des tests possédant des sensibilités de détection différentes, avec des seuils de positivité établis en conséquence, et ont été effectuées sur des populations de diverses parties du monde. Ces variations dans le design expérimental peuvent rendre la comparaison des différentes études difficile. Cependant, il semble toujours que, dans l'ensemble, les réponses cellulaires anti-capsid soient moins prépondérantes que les réponses humorales, montrant que la plupart des humains semblent avoir été exposé à l'AAV sauvage mais ne présentent pas tous des réponses cellulaires anti-capsid détectables. L'ensemble des études s'étant intéressé au phénotype de ces cellules semblent montrer que la majorité des lymphocytes T spécifiques de l'AAV présentent un phénotype de mémoire mais avec des sous types différents selon les études, ce qui confirme que ces cellules pourraient bien provenir d'infections AAV naturelles antérieures.

Une autre étude s'est intéressée plus en détails aux différents sous-types de cellules mémoire concernées (**Figure 25**) : les LT effecteurs (TEff), les TCM et les TEM chez

l'Homme mais également chez le primate. Dans la population humaine, il a été montré que les LT CD8⁺ préexistants spécifiques de l'AAV2 sont répartis entre les trois populations T_{EFF}, TCM et TEM alors que les LT CD4⁺ sont majoritairement des TCM. Ces deux populations totales expriment majoritairement de l'IL-2 et de l'IFN- γ puis du TNF- α . Pour ce qui est des primates, les LT CD8⁺ et les LT CD4⁺ préexistants spécifiques de l'AAV8 sont majoritairement des T_{eff}. Ces deux populations expriment presque exclusivement de l'IL-2 (Li et al., 2011a).

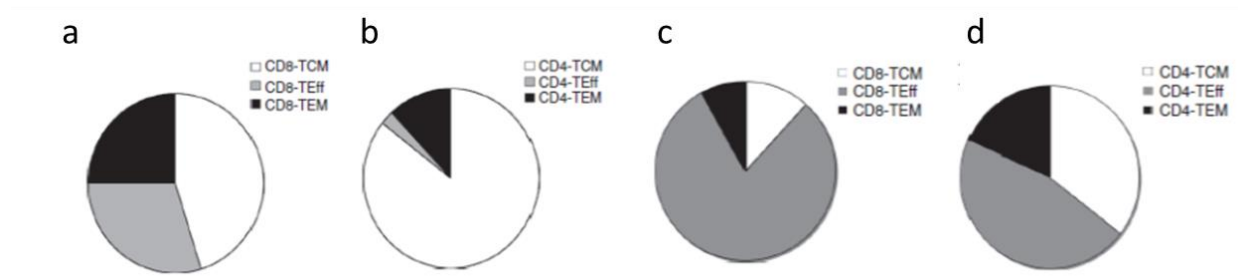


Figure 25: Proportion de LT CD4⁺ et CD8⁺ répondant à la capsid de l'AAV2 chez l'Homme et l'AAV8 chez le primate.

Différentes populations de LT CD8⁺ (a) et LT CD4⁺ (b) répondant à capsid de l'AAV2 chez l'Homme. Différentes populations de LT CD8⁺ (c) et LT CD4⁺ (d) répondant à capsid de l'AAV8 chez le primate. TCM = LT de la mémoire centrale ; T_{eff} = LT effecteur ; TEM = LT effecteur mémoire (Li et al., 2011a).

D'après une autre étude, l'AAV2 déclencherait une réponse uniquement chez les LT CD8⁺ TEM avec une sécrétion de TNF- α et de granzyme B mais pas de sécrétion d'IFN- γ . En revanche, une sécrétion d'IFN- γ a été observée par les cellules NK à 24h chez certains donneurs (Kuranda et al., 2018).

Actuellement, avant un essai clinique, l'immunité cellulaire anti-AAV préexistante des patients est évaluée par ELISpot IFN- γ mais cette méthode bien que très sensible ne l'est pas assez du fait de l'extrême rareté des LT spécifiques de l'AAV circulants (fréquence inférieure à 1 cellule pour 1 million de PBMC) (Mingozzi et al., 2007a). Les études de prévalence par ELISpot IFN- γ , bien qu'informatives, ne sont donc pas prédictives de l'impact de la réponse cellulaire en clinique. En effet, certains donneurs négatifs étaient positifs après expansion *in vitro* des PBMC (Mingozzi et al., 2007a) mais il a également été observé que certains patients positifs ne présentaient pas de réaction cytotoxique lors du transfert de gène (Nathwani et al., 2011). Cette réponse ne peut pas non plus être prédite en fonction du monitoring de la réponse humorale préexistante car les réponses humorales et cellulaires contre l'AAVr semblent découplées (Veron et al., 2012). Contrairement aux réponses humorales anti-

capside, le dépistage préalable des patients pour exclure ceux qui ont une immunité cellulaire anti-AAV préexistante ne semble donc pas être une bonne approche. De plus, les réponses cellulaires anti-capside positives dans les essais cliniques ne se traduisent pas systématiquement par des conséquences cliniques délétères, et il n'existe actuellement aucun moyen de prédire quels paramètres déclencheront l'apparition de réponses nocives.

d. Développement de modèles animaux pour l'étude de l'immunité cellulaire spécifique de l'AAV.

L'étude des réponses immunitaires cellulaires contre la capsid e d'AAV est problématique, car ces réponses ne sont pas facilement induites dans les modèles animaux (Li et al., 2007b, 2011a; Martino et al., 2013), même ceux sensibles aux infections naturelles par l'AAV comme les primates non humains (Gao et al., 2009; Jiang et al., 2006b). Cette différence pourrait être due aux différences dans la fréquence et la distribution des sous-ensembles de lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ spécifiques de l'AAV chez les humains et chez les primates non humains (Li et al., 2011a). Devant cette difficulté à prédire la réponse cytotoxique anti-capsid e en essai clinique, plusieurs équipes ont tenté de développer des modèles animaux pour reproduire le phénomène observé chez l'Homme. Malgré les limites liées à ces modèles, certains ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la reconnaissance du vecteur par le système immunitaire de l'hôte.

Comme il n'existe pas d'immunité préexistante contre l'AAV chez la souris, Li et al, ont immunisé des souris à l'aide d'adénovirus exprimant un antigène de l'AAV2 ou de l'AAV8. Ces souris, ayant développé des LT CD8⁺ sécrétant de l'IFN- γ spécifiques d'un peptide commun à la capsid e de l'AAV2 et AAV8, ont ensuite été injectées avec un AAV codant pour le F.IX. Le fait d'avoir préalablement immunisé ces souris n'entraîne pas de perte de l'expression du F.IX ni d'augmentation de transaminases contrairement à ce qui a été décrit chez l'Homme. Une étape de déplétion des Treg par l'injection d'un anticorps anti-CD25 n'a pas eu d'impact sur la réponse cytotoxique (Li et al., 2007b; Wang et al., 2007). Ces résultats suggèrent que la capsid e ne serait pas prise en charge de la même façon d'une espèce à l'autre. Ces expériences ont néanmoins permis de cartographier les épitopes immunodominants des haplotypes H-2b et H-2d (Wang et al., 2007).

Un autre modèle de souris immunisées contre l'AAV a été développé par injection répétée de cellules dendritiques pulsées avec la capsid e de l'AAV2 ou transduites avec un

adénovirus exprimant la capsid de l'AAV2. Là encore ce modèle ne permet pas de reproduire la destruction des hépatocytes transduits observée chez l'homme (Li et al., 2007a).

Un modèle murin a été réalisé par transfert adoptif où les animaux ont reçu des splénocytes dérivés de souris OT-1 qui portent les TCR CD8⁺ transgéniques spécifiques de l'épitope SIINFEKL, un épitope immunodominant dérivé de l'ovalbumine, et ont été injectés avec des vecteurs AAV2r, dont la protéine de capsid VP2 contenait de multiples copies de l'épitope SIINFEKL (Li et al., 2011b). Ce modèle a permis la prolifération de cellules T CD8⁺ spécifiques de l'épitope SIINFEKL et a permis d'évaluer la cinétique de dégradation de la capsid AAV2 *in vivo*.

L'équipe de Martino *et al.* est tout de même parvenue à développer un modèle murin capable de reproduire la destruction des hépatocytes suite à la réponse anti-capsid comme cela est observé chez l'Homme (Martino et al., 2013). Pour cela, des souris *Rag1*^{-/-} BALB/c ont été injectées avec un AAV2r ou AAV8r exprimant le F.IX par voie systémique 24h avant un transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifiques de l'épitope de l'AAV2 (commun à l'AAV8). Ce modèle a permis de montrer qu'une capsid d'AAVr modifiée de manière à pouvoir échapper à la dégradation par le protéasome pourrait donc permettre de réduire la présentation antigénique par les hépatocytes et ainsi augmenter l'efficacité du transfert de gène. Ces études ont également permis de déterminer la durée de clairance de la capsid. Cette dernière étude met également en évidence le fait qu'entre les sérotypes, la dégradation de la capsid peut être décalée dans le temps : l'AAV2 serait pris en charge plus rapidement que l'AAV8.

En conclusion, l'ensemble de ces modèles ont permis de recueillir un certain nombre d'information sur les mécanismes de cette réponse. Néanmoins, un modèle animal pertinent récapitulant ce que l'on observe chez l'homme reste à établir.

III. Les stratégies d'immunomodulation

Les données observées chez l'Homme indiquent qu'en plus de déterminer si les patients possèdent un titre en facteurs neutralisants anti-AAV élevé, il faudrait également déterminer s'ils présentent une réponse cellulaire préexistante à la fois contre la capsid de l'AAV et contre le produit du transgène. Les critères d'inclusion dans les essais cliniques deviendraient alors très drastiques et peu de patients pourraient bénéficier d'un traitement.

Des stratégies d'immunomodulation ont donc vu le jour. On peut distinguer deux types d'immunomodulation : celles visant à moduler la réponse humorale et celles visant la réponse cellulaire (**Tableau 5**). Certaines des stratégies potentielles énumérées pour surmonter l'immunité anti-capside sont communes aux deux composantes et pourraient donc avoir un double objectif. Elles peuvent également être classées en fonction de leur mode d'action : sur le vecteur lui-même ou sur la réponse immunitaire de l'hôte (**Tableau 5**).

Stratégies	Efficace sur		Principaux inconvénients
	LB	LT	
Actions sur le vecteur			
Administration de plus forte dose de vecteurs pour contourner les Nab	Oui	Non	- De fortes doses peuvent être neutralisées par des titres faibles (1 :5/1 :17) - Augmente la charge antigénique susceptible de déclencher des LT CD8 ⁺ spécifiques de la capsid
Utilisation de capsides vides comme « leurre » pour contourner les Nab	Oui	Non	- Augmente la charge antigénique susceptible de déclencher des LT CD8 ⁺ spécifiques de la capsid
Modification de la capsid d'AAVr pour éviter la reconnaissance par le système immunitaire - Isolement de nouveaux variants naturels	Oui	Peut-être	- Techniquement difficile et chronophage - Altération potentielle des processus de tropisme, de production et de purification des vecteurs - Possiblement inefficace en raison des réactions croisées.
Amélioration de la production et la caractérisation des lots d'AAVr pour réduire la reconnaissance immunitaire : - Réduire la présence de contaminants et/ou d'adjuvants - Augmenter le rapport chavirement plein/vide	Oui	Oui	- Techniquement difficile et chronophage - Spécifique à un sérotype
Diminuer la dose thérapeutique nécessaire pour réduire la charge d'antigènes: - Améliorer la spécificité et l'efficacité de la transduction - Concevoir des variants de capsides optimisés - Concevoir des variants optimisés du transgène thérapeutique	Non	Oui	- Non réalisable pour tous les transgènes - Altération potentielle de l'encapsidation du transgène - Spécifique aux transgènes
Actions sur le patient			
Réduction de l'exposition des vecteurs à la neutralisation des composants sanguins : - Effectuer la plasmaphérèse pour réduire les titres de NAb en circulation - Utiliser des cathéters à ballonnet avec des flushs d'eau saline pour administrer les vecteurs.	Oui	Non	- Plusieurs cycles de plasmaphérèse ont été nécessaires pour diminuer significativement les titres de NAb. - Immunosuppression transitoire induite par la plasmaphérèse - Les cathéters à ballonnet ne peuvent pas être utilisés pour toutes les voies d'administration/tissus cibles ; procédure invasive
Administration des inhibiteurs protéasomiques pour limiter la présentation de l'antigène de capsid sur le CMHL.	Non	Oui	- Pharmacothérapie prolongée nécessaire pour un effet susceptible d'être limité
Administrer des médicaments immunosuppresseurs pour prévenir ou éradiquer les réponses immunitaires	Oui	Oui	- Risques associés à l'immunosuppression systémique - Interférence avec l'induction Treg - Évaluation préclinique difficile (les médicaments sont souvent inefficaces chez les animaux) - Pas d'éradication des lymphocytes mémoire
Induire une tolérance périphérique aux antigènes dérivés de la capsid pour prévenir l'activation des réponses immunitaires spécifiques à la capsid.	Oui	Oui	- Aucun effet sur les NAb préexistants - Intervention clinique supplémentaire nécessaire - Techniquement difficile et chronophage

Tableau 5: Principales approches actuellement à l'étude pour moduler les réponses des lymphocytes B et T spécifiques de l'AAV.
(Vandamme et al., 2017)

Afin de contrer la présence de facteurs neutralisants, la plasmaphérèse est déjà utilisée chez l'Homme. Elle permet d'éliminer des protéines de haut poids moléculaires comme les Ig dans le plasma. Pour l'AAV8, la plasmaphérèse ne semble efficace que si le taux en facteurs neutralisants préexistants est faible (aux alentours d'un titre au 1/20) et si plusieurs cycles sont effectués pour pallier au retour de la réponse humorale pouvant entraîner une augmentation du taux d'anticorps. Cette technique permettrait alors de créer une fenêtre pendant laquelle le vecteur pourrait être administré (Chicoine et al., 2014; Monteilhet et al., 2011). L'immunoabsorption a également été testée. Contrairement à la plasmaphérèse elle permet d'éliminer uniquement les immunoglobulines et permet une clairance presque complète de tous les types et sous-types d'immunoglobulines. Dans une étude réalisée chez le primate, cette technique a permis de diminuer considérablement le titre en anticorps neutralisants anti-AAV5 et d'atteindre un niveau d'expression thérapeutique de F.IX grâce à un AAV5r-F.IX (Salas et al., 2019). L'utilisation de vecteurs AAV possédant une capsid chimère ou mosaïque devrait également être envisagée car elle permet d'éviter la reconnaissance de la capsid par les anticorps présents chez les patients (Tse et al., 2017). Elle pourrait également potentiellement permettre de contourner la réponse cellulaire si la capsid synthétique ne contient pas les épitopes nécessaires à son déclenchement.

Une stratégie largement privilégiée à l'heure actuelle est l'administration de traitements pharmacologiques immunosuppresseurs. Les immunosuppresseurs utilisés ont été choisis en fonction de ceux qui se sont montrés efficaces pour prévenir le rejet de greffe d'organe en raison de la ressemblance entre la réponse induite par la greffe et celle induite par la capsid d'AAV. Ces traitements ont ensuite été testés dans le cas de transfert de gène sur des modèles animaux et sont actuellement utilisés dans les essais. Les réponses des LT spécifiques de la capsid ont été contrôlées par administration transitoire de médicaments largement immunosuppresseurs, à titre préventif ou dès l'apparition de signes de lésions tissulaire (Nathwani et al., 2011). Un bref traitement immunosuppresseur constitué de glucocorticoïdes qui ont un effet sur le facteur de transcription NFκB a permis de rétablir le taux circulant en F.IX tout en abaissant le niveau de transaminases. Malgré ses limites, cette stratégie semble être aujourd'hui une bonne alternative pour permettre un transfert de gène à long terme. Si l'immunosuppression permet, dans certains cas, la persistance de l'expression du transgène, des désavantages sont décrits comme la question de la spécificité (c.-à-d. la capacité de limiter seulement les réponses immunitaires dirigées contre un antigène donné) ou l'exclusion de l'induction de la tolérance. En effet, les médicaments immunosuppresseurs

empêchent également le développement de réponses Treg parfois nécessaires pour établir une tolérance à long terme au produit transgénique (Mingozzi et al., 2007b). De plus, ces traitements pourraient influencer la biodistribution des particules de vecteurs ainsi que l'efficacité de transduction.

Les risques associés à l'utilisation de l'immunosuppression, la persistance de particules intactes d'AAV après plusieurs années (même si celle-ci pourrait favoriser le maintien de la tolérance par induction de Treg) (Stieger et al., 2009) ainsi que le fait que l'administration de stéroïdes chez certains sous-groupes de patients n'est pas recommandée, ont incité à poursuivre les recherches dans ce domaine. L'objectif est de développer d'autres stratégies plus spécifiques pour la modulation des réponses de LT spécifiques de la capsidie comme la rapamycine par exemple (Meliani et al., 2018).

Pour conclure enfin sur l'immunogénicité de la capsidie d'AAV, les données recueillies lors des divers essais cliniques menés jusqu'à présent indiquent que les réponses immunitaires dirigées contre la capsidie d'AAV peuvent être influencées par une grande variété de paramètres. La stratégie idéale serait donc sans doute la prise en compte de tous ces paramètres mais cela reste très complexe à réaliser. Le meilleur compromis que l'on puisse actuellement imaginer est de développer des vecteurs AAVr qui pourraient fournir une efficacité thérapeutique à des doses suffisantes pour contourner l'immunité humorale préexistante, mais pas assez élevées pour déclencher une immunité cellulaire délétère.

Partie 4 : Contexte et objectifs de la thèse

I. Contexte

Aujourd'hui, l'AAVr a émergé comme un vecteur de choix pour la thérapie *in vivo* et est utilisé dans plus de 200 essais cliniques dans le monde entier. Alors qu'il permet une expression du transgène à long terme dans des modèles murins, la translation dans des modèles de gros animaux puis chez l'Homme a montré que l'AAVr pouvait être immunogène. La réponse immune dirigée contre la capsid du vecteur et/ou le produit du transgène peut aboutir à une inefficacité du transfert de gène.

Dans ce contexte, l'étude de l'impact de l'immunogénicité potentielle de la capsid associée à l'administration systémique de fortes doses de particules d'AAVr est aujourd'hui un des défis majeurs de la thérapie génique. La mesure et la compréhension de cette immunité est donc nécessaire, dans le but d'établir des stratégies optimales permettant de contourner ou de minimiser son initiation. L'absence d'un modèle animal pertinent pour étudier les réponses cellulaires anti capsid lors de l'administration d'AAVr est malheureusement un obstacle indéniable à la compréhension de l'immunogénicité de la capsid et au développement préclinique de stratégies efficaces et sûres pour l'éviter.

L'unité INSERM UMR 1089 « Thérapie Génique Translationnelle des Maladies Génétiques » à Nantes, où j'ai réalisé ma thèse, développe et évalue des stratégies de thérapies géniques pour soigner des maladies neuromusculaires comme la DMD ou des maladies rétiniennes depuis plus de 20 ans maintenant. De nombreuses études précliniques sur des primates non humains, des chiens et des rongeurs ont été réalisées avec des AAVr, à des doses variées et avec diverses voies d'injections. Plusieurs de ces études de biodistribution ont montré qu'une injection musculaire d'AAVr pouvait mener à une fuite du vecteur dans le foie (Guilbaud et al., 2019; Le Guiner et al., 2014; Toromanoff et al., 2008). De plus, les protocoles de thérapie génique musculaire par l'AAVr se font de plus en plus par administration systémique et à des doses élevées de vecteurs ($> 10^{13}$ vg/kg en moyenne). Au vu des résultats obtenus lors des essais cliniques de thérapie génique *via* l'AAVr visant le foie décrit précédemment, il est donc apparu nécessaire de recueillir notre propre ensemble de données sur les réponses immunitaires spécifiques de l'AAV chez les humains. Pour cela, le laboratoire possède une équipe de recherche dédiée à l'étude des divers aspects de la réponse immunitaire dans le cadre du transfert de gène *via* l'AAVr.

II. Objectifs

Mon projet de thèse porte sur la caractérisation de la réponse cellulaire anti-AAV préexistante chez des sujets sains. Pour cela, l'objectif a été de développer des techniques de détection des lymphocytes spécifiques de l'AAV circulants alternatives aux tests ELISpot qui permettraient une analyse phénotypique et fonctionnelle plus sensible et plus complète. Cette caractérisation permettrait à long terme d'améliorer l'immunomonitorage et la prédiction de la réponse immune cellulaire anti-AAV dans les essais cliniques de thérapie génique à l'aide d'AAV recombinants, mais aussi le développement de stratégies d'immunomodulation à la fois plus ciblée, plus efficace et moins lourde.

Dans un premier temps, nous avons donc souhaité réaliser un état des lieux de la réponse immune cellulaire préexistante anti-AAV chez l'homme en réalisant une étude de prévalence au sein de la population générale pour les sérotypes 2, 4, 5, 8, et 9 en se basant sur l'indicateur de fonctionnalité le plus utilisé, la sécrétion d'IFN- γ . Cette information n'a été décrite que pour quelques sérotypes (**Tableau 4**). Nous y avons inclus le sérotype AAV9 qui à notre connaissance n'a pas encore été étudié à ce niveau alors qu'il est de plus en plus utilisé en clinique dans les applications systémiques. Dans le cadre de ces essais, les lymphocytes T anti-AAV sont majoritairement détectés par ELISpot IFN- γ . Cependant, les tests ELISpot pourraient ne pas être suffisamment sensibles pour permettre systématiquement la détection *ex vivo* des lymphocytes T spécifiques de l'AAV en circulation. De plus, un ELISpot positif (sécrétion d'IFN- γ) n'est pas forcément prédictif d'une réponse cytotoxique en réponse à une injection d'AAVr. Afin d'identifier les raisons de cette absence de corrélation, nous avons décidé d'étudier plus en détails le phénotype et la fonctionnalité de ces cellules. Pour cela, nous avons d'abord utilisé des techniques dérivées de l'ELISpot IFN- γ tel que l'ELISpot combiné à une déplétion en LT CD4⁺ ou LT CD8⁺ afin de déterminer la population sécrétrice et potentiellement d'augmenter la sensibilité. De plus, pour palier à l'insuffisance de renseignements fournie par l'ELISpot IFN- γ , nous avons choisi de mieux caractériser la réponse cytokinique des donneurs, via la méthode de Fluorospot qui permet de détecter au moins 3 cytokines simultanément avec la même quantité de cellules qu'un ELISpot IFN- γ conventionnel. Une caractérisation phénotypique plus poussée de ces LT sécrétant l'IFN- γ en réponse à l'AAV a également été réalisée afin d'identifier les sous-populations responsables de la sécrétion d'IFN- γ en réponse à la capsid e d'AAV en utilisant le test de « Cytokine Capture Assay ». L'ensemble des données obtenues dans cette première

partie montrent que le type de réponse pourrait être dépendante du sérotype de l'AAV, ce qui suggère une histoire naturelle d'infection différente d'un sérotype à un autre.

Une partie des résultats obtenus dans cette première partie sont présentés dans le manuscrit quasiment finalisé « *Cellular AAV serotype prevalence study in healthy humans reveals particular features for AAV9 serotype* » qui sera prochainement soumis à un journal de comité de lecture international.

Le second axe de mon projet consistait à caractériser phénotypiquement et fonctionnellement les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de peptides immunodominants de l'AAV8 chez l'humain. Ces lymphocytes étant présents à de très faibles fréquences, ils sont difficiles à détecter et à caractériser *ex vivo* dans les PBMC. Pour augmenter la sensibilité de détection de ces lymphocytes qui reconnaissent les peptides de l'AAV, nous avons utilisé une méthode d'enrichissement magnétique associée aux tétramères (TAME). Les LT ainsi isolés sont alors caractérisés avant amplification par cytométrie en flux et amplifiés afin de réaliser des tests fonctionnels. Afin de déterminer s'il existe une corrélation entre la fréquence des LT CD8⁺ anti-AAV et d'autres paramètres immunitaires, les résultats obtenus ont été confrontés à la réponse cellulaire mesurée par ELISpot ainsi qu'aux titres en anticorps anti-AAV et en facteurs neutralisants l'AAV (réponse humorale). Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article « *Tetramer-based enrichment of preexisting anti-AAV CD8⁺ T cells in human donors allows the detection of a Temra subpopulation* » qui a été soumis à *Frontiers in immunology*.

En raison du manque actuel de modèles animaux pertinents pour l'étude de la réponse cellulaire anti-AAV, le troisième axe de mon projet consistait donc à élaborer un modèle de souris permettant de reproduire la réponse cellulaire anti-capside observée chez l'homme. A long terme, ce modèle permettrait une caractérisation de la réponse cellulaire anti-capside et le test de stratégies d'immunomodulations ciblées. Dans ce but, nous avons choisi d'utiliser un modèle de souris possédant un système immunitaire humanisé.

III. Choix expérimentaux

A. Etude I : Etude de la prévalence de la réponse immune cellulaire anti-AAV

L'étude de prévalence de la réponse immunitaire cellulaire préexistante anti-AAV a été réalisée sur les AAV de sérotypes 2, 4, 5, 8 et 9. Notre choix s'est porté sur ces sérotypes car lors de l'initiation de ce projet seule la prévalence de l'AAV1 et 2 avait été étudiée (**Tableau 4**). De plus, il nous a paru nécessaire d'avoir ces données pour anticiper les risques

d'un rejet immunitaire pour les serotypes 8 et 9 de plus en plus utilisés aujourd'hui dans le cadre d'essais cliniques systémiques. La stratégie expérimentale est détaillée dans le manuscrit associé à cet axe.

B. Etude II : Caractérisation des LT IFN- γ anti-AAV

Au vu de la rareté des cellules anti-AAV préexistantes et de l'impossibilité d'isoler ces cellules en ELISpot afin de mieux les caractériser, nous avons choisi de développer une méthode d'isolement magnétique des cellules sécrétrices d'IFN- γ . Les cellules isolées sont ensuite caractérisées par cytométrie en flux (**Figure 26**).

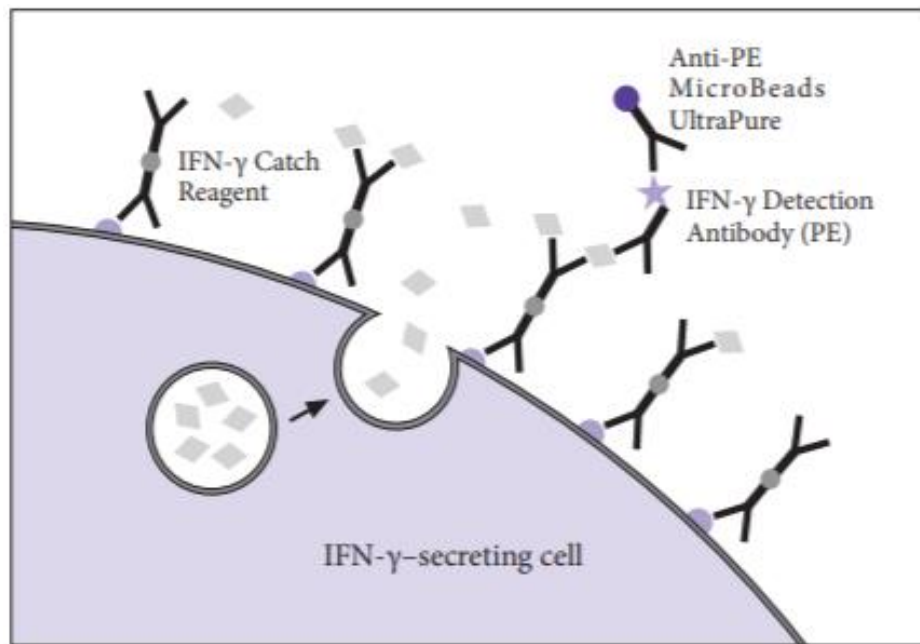


Figure 26 : Méthode d'enrichissement magnétique par capture des cytokines.

Un anticorps de détection anti-IFN- γ marqué avec un fluorochrome permet de détecter ces cellules par cytométrie en flux. Un marquage secondaire avec des anticorps dirigés contre le fluorochrome et couplés à des billes magnétiques permet l'enrichissement des cellules sur colonne magnétique (*IFN- γ Secretion Assay, data-sheet - Miltenyi Biotech*).

Lors d'une stimulation antigénique, cette technique permet de fixer l'IFN- γ sécrété à la membrane de la cellule grâce à des anticorps de capture préalablement fixés à la cellule sécrétrice. Un second marquage de l'IFN- γ fixé permet ensuite de détecter les cellules par cytométrie.

C. Etude II : Enrichissement médié par les tétramères

L'évaluation des réponses des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'un antigène particulier est classiquement réalisée par des tests ELISpot, par marquage intracellulaire de cytokines ou par marquage par tétramère de pCMH. Cependant, la sensibilité de détection de

ces tests ne dépassent généralement pas 5×10^{-5} cellules, une limitation majeure car certaines populations de LT CD8⁺ sont particulièrement rares. Afin de palier à ce problème une méthode d'enrichissement par des billes magnétiques basé sur les pCMH de classe I a été mise au point et utilisée avec succès pour caractériser les LT CD8⁺ spécifiques de l'antigène dans les PBMC humaines (**Figure 27**) (Alanio et al., 2013; Davis et al., 2011; Legoux et al., 2010). Ce test, appelé TAME (*Tetramer-Associated Magnetic Enrichment*), possède une limite de détection de 1×10^{-7} PBMC (Alanio et al., 2010). Les interactions entre les TCR et les tétramères pCMH I dépendent à la fois de l'allèle HLA (c'est-à-dire l'allèle de la chaîne lourde de classe I du CMH) et de la spécificité épitopique (c'est-à-dire le peptide contenu dans le sillon peptidique de classe I du CMH), ces deux paramètres clés, spécifiquement liés à l'utilisation des réactifs tétramère pCMHI, doivent être établis au préalable afin de réaliser TAME.

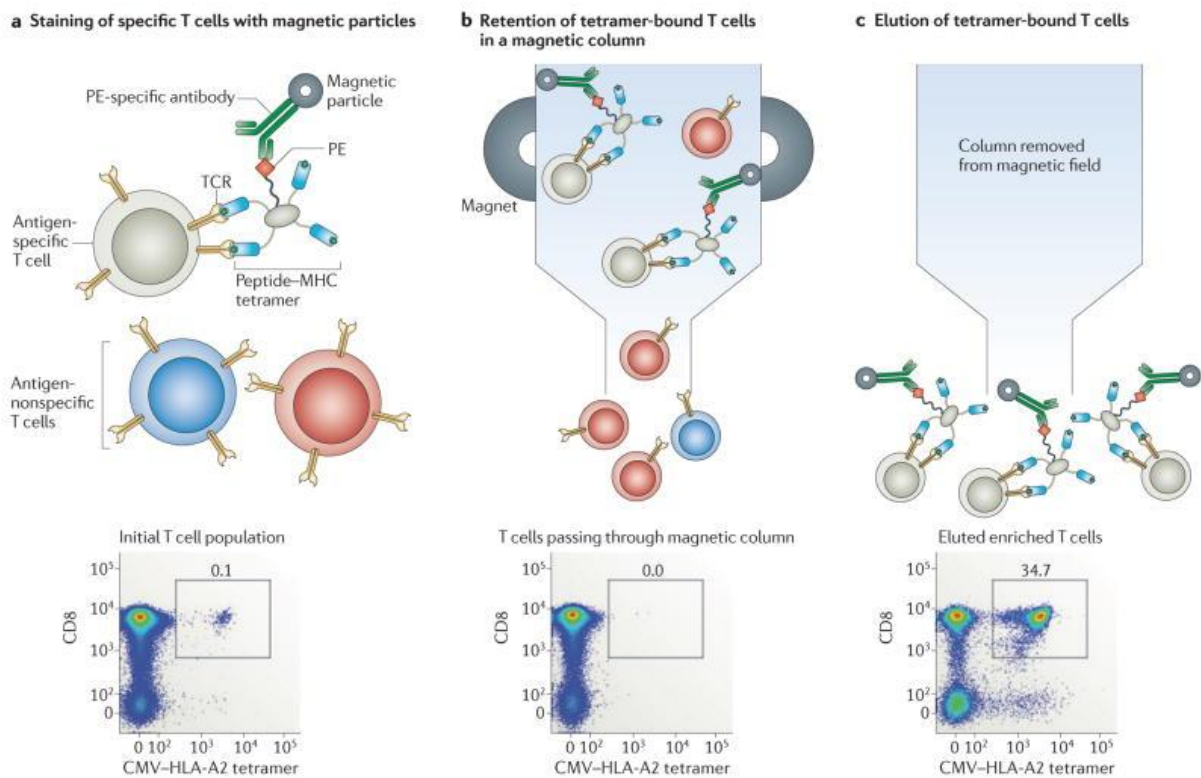


Figure 27 : Enrichissement par tétramère de peptide-CMH utilisant des particules magnétiques.

a) Après avoir marqué un échantillon de LT CD8⁺ avec des tétramères pCMH, les cellules sont marquées avec un anticorps spécifique du fluorochrome couplé à des particules magnétiques. b) Les cellules passent ensuite à travers une colonne magnétique, dans laquelle les cellules marquées sont piégées par le champ magnétique, alors que la plupart des cellules non marquées sont lavées. c) Les cellules liées au tétramère sont éluées en retirant la colonne du champ magnétique (Davis et al., 2011).

Afin d'avoir une cohorte de donneur importante, nous avons sélectionné les allèles HLA les plus fréquemment exprimés dans la population générale. Les enquêtes menées auprès de l'Etablissement Français du Sang (Nantes, Pays de la Loire) nous ont apprises que les quatre allèles de CMH I les plus fréquents parmi la population locale étaient HLA-A02 (44% des donneurs), HLA-A03 (29%), HLA-B07 (25%) et HLA-A11 (10%). Nous avons donc choisi de nous concentrer sur les donneurs de HLA-A02⁺ (A2⁺), l'allèle le plus fréquent, et plus particulièrement sur le HLA-A02*01⁺ (94 % des donneurs A2⁺) ainsi qu'aux donneurs HLA-B07⁺ (B7⁺), et plus particulièrement à ceux de HLA-B07*02⁺ (98,7% des donneurs de B7⁺). Le choix de ce dernier, pourtant moins fréquent que HLA-A03 est lié aux résultats rapportés par Mingozi et al. sur les donneurs de B7⁺ (Mingozi et al., 2007a).

La mise au point du TAME a été réalisée avant début de ma thèse et à l'époque aucun épitope A2-restreint n'avait été décrit pour l'AAV2 et l'AAV8. Par conséquent, le dépistage des épitopes AAV2 et AAV8 à restriction A2 et également B7 (afin de garder la même stratégie) a été réalisé à l'aide d'une technologie d'échange peptidique à médiation UV qui a permis de générer des complexes pCMH de classe I personnalisés, sur la base des bases de données de prédiction bio-informatique. Les données générées concernent une partie du travail présenté dans l'article de la partie I des résultats de ce mémoire mais ne relèvent pas de mon travail de thèse.

Mon projet de thèse a consisté à utiliser cette même technologie sur une seconde cohorte de donneurs en l'adaptant aux épitopes immunodominant de l'AAV8 à restriction A2 récemment décrit et B7 (Hui et al., 2015; Mingozi et al., 2007a). Par conséquent, nous avons utilisé des PBMC provenant de donneurs A2⁺ ou B7⁺ que nous avons incubés avec des tétramères pA2 ou pB7 chargées avec les épitopes immunodominant. Les fréquences des LT CD8⁺ anti-AAV obtenus avec l'épitope immunodominant ont ainsi pu être comparées avec les fréquences obtenues avec les pools de peptides sélectionnés comme décrit précédemment ainsi qu'avec d'autres paramètres immunitaires : la réponse cellulaire mesurée par ELISpot et la réponse humorale mesurée par les titres en anticorps anti-AAV et en facteurs neutralisants l'AAV.

D. Etude III : Modèle animal

Afin de réaliser un modèle animal permettant d'étudier la réponse cellulaire observée chez l'homme et de valider la fonctionnalité des LT anti-AAV isolées par TAME, il était primordial de développer un modèle animal pertinent capable de mimer des phénomènes immunitaires observables chez le patient. En effet, comme nous l'avons vu auparavant, c'est en passant aux essais cliniques que les modèles de petits animaux tels que la souris ont montré leurs limites d'un point de vue immunologique. Dans cette optique, nous nous sommes basés sur une étude de Martino et al. où des lymphocytes T CD8⁺ murins spécifiques de l'AAV ont été injectés dans des souris immunodéficientes et ont été capables de détruire les hépatocytes transduits par les AAVr en présence d'adjuvants (Martino et al., 2013). Nous avons proposé un nouveau modèle d'étude de la réponse cellulaire : souris transgéniques immunodéficientes NOD/SCID humanisées HLA-A2 injectées avec un AAV8-CAG-mSEAP (*murine secreted embryonic alkaline phosphatase*). Notre choix s'est porté sur ce sérotype en raison de son utilisation en clinique et des réponses cytotoxiques observées dans le foie (Nathwani et al., 2011). Le transgène, la mSEAP, a été choisi car il est très bien toléré chez la souris (Gunhild M Maeldansmo, 2005). Concernant la dose injectée, nous avons souhaité injecter de fortes doses (1.10^{14} vg/kg) afin de favoriser le déclenchement d'une réponse immune puisque celle-ci semble dose-dépendante chez l'Homme (Nathwani et al., 2011). Une étude préliminaire a été réalisée chez ces souris sans injection de cellules afin de vérifier l'efficacité du vecteur. Elle a consisté à étudier la biodistribution du vecteur ainsi l'expression du transgène d'intérêt. Dans un second temps, ces souris ont reçu des cellules immunitaires humaines afin de reconstruire leur système immunitaire et d'évaluer son impact sur le transfert de gènes médié par le AAVr. Plusieurs groupes ont été réalisés :

- un groupe injecté avec des lignées primaires de LT CD8⁺ spécifiques du peptide AAV8-A2 obtenu par TAME et expansion
- un groupe injecté avec des lignées primaires de LT CD8⁺ spécifiques du peptide AAV8-A2 obtenu par TAME et expansion et co-injecté avec des PBMC totaux du même donneur.
- un groupe injecté avec PBMC totaux d'un donneur répondant en ELISpot IFN- γ anti-AAV8.

Une analyse de l'efficacité du transfert de gène et de la réponse immune a ensuite été réalisée à 1 mois post-injection.

RESULTATS

Etude I : “Cellular AAV serotype prevalence study in healthy humans reveals particular features for AAV9 serotype”

Cellular AAV serotype prevalence study in healthy humans reveals particular features for AAV9 serotype

Rebecca XICLUNA¹, Marie DEVAUX¹, Céline VANDAMME^{1,2}, Célia COUZINIE¹,
Nicolas JAULIN¹, Johanne LEDUFF¹, Alicia CHARRIER¹, Mickaël GUILBAUD¹ and
Oumeya ADJALI^{1*}

Correspondence should be addressed to O.A. (oumeya.adjali@univ-nantes.fr)

¹INSERM UMR 1089, Translational Gene Therapy for Genetic Diseases, Université de
Nantes, CHU de Nantes, F-44200 Nantes, France

² Current affiliation, Department of Clinical Microbiology, Institute of Clinical
Medecine, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland

*** Correspondence :**

Oumeya ADJALI MD PhD – INSERM UMR 1089

oumeya.adjali@univ-nantes.fr

Short Title: Prevalence and characterization of pre-existing cellular anti-AAV
immunity.

Keywords: AAV, serotype, gene therapy, pre-existing immunity, cellular response,
IFN γ ELISpot, Fluorospot.

Abstract

Recombinant adeno-associated virus (rAAV)-based gene therapy is a powerful therapeutic strategy for *in vivo* gene delivery. Pre-existing immunity to AAV capsid is one of the major hurdles for successful clinical translation of rAAV gene therapy products. Prevalence studies for pre-existing humoral anti-AAV immunity are numerous and its mechanisms well known whereas studies describing the prevalence and characteristics of pre-existing anti-AAV T cell immunity are still needed. Here, we report the prevalence of anti-AAV2, 4, 5, 8 and 9 cellular responses in a cohort of healthy human donors using enzymatic and fluorometric ELISpot assays. The highest prevalence observed was against AAV9 serotype with the majority of responses against peptide pool 3. As already described by others, a high cross reactivity between serotypes was observed but no correlation between cellular and humoral responses was observed. Using fluorospot assays, multicytokine profiles reveal differences between AAV9 and AAV8 serotypes which encourage the use of multiparametric monitoring methods, to better characterize capsid-specific cellular immune responses and predict their impact in rAAV-mediated clinical trials.

1. Introduction

Adeno-Associated Virus (AAV) is a small, non-enveloped dependovirus which belongs to the *Parvoviridae* family. One of its major assets is the diversity of its clades and no less than 13 natural serotypes with different tropisms¹. Therefore, recombinant adeno-associated virus-derived vectors (rAAV) have emerged over the past decade as a powerful vector platform for *in vivo* gene delivery to target a large variety of tissues. rAAV have been used in over a hundred clinical trials worldwide in the frame of a variety of genetic diseases affecting various organs as eyes, liver, muscles and central nervous system²⁻⁶, with a sustained therapeutic effect observed in several instances. Also three treatments have already been approved by the Food and Drug Administration and/or European Medicine Agency⁷⁻⁹. In this perspective, investigating the impact of the vector capsid's potential immunogenicity associated to the systemic administration of high doses of vector particles¹⁰ has been brought back to the forefront of the field.

During natural infections with wild-type (WT) AAV, individuals can mount humoral and cellular immune responses directed against capsid-derived antigens¹¹⁻¹³. As a result, AAV-specific memory B and T cells can persist throughout lifetime, be recalled during rAAV-mediated gene transfer and therefore might hinder therapeutic efficiency. Concerning

anti-AAVr humoral immune responses, the prevalence of anti-AAV antibodies and neutralizing factors among the general population, as well as their impact on rAAV-mediated *in vivo* gene therapy, has already been largely documented in humans¹⁴. On the contrary, vector-directed cellular immune responses remain more elusive to detect and characterize.

Deleterious effects of anti-AAV cellular immune responses were first evidenced over 15 years ago in a liver-directed gene transfer clinical trial in severe haemophilia B patients¹⁴. A few weeks following the intrahepatic administration of an AAV2 vector carrying the coagulation factor IX expression cassette, some patients from the high and mid-dose cohorts underwent a gradual loss of factor IX transgene expression which correlated with a transient rise in liver transaminase levels and an increase in the frequency of circulating AAV-specific CD8⁺ T lymphocytes¹⁴. Similar events were subsequently observed when the AAV8 serotype was administered intravenously, though it also became known that these responses seem to be manageable with a short course of corticosteroid regimen¹⁰. The mechanistic model instituted to explain these observations states that upon rAAV administration, transduced liver cells process and present capsid-derived epitopes onto major histocompatibility class I (MHC I) molecules. These complexes are recognized by memory capsid-specific CD8⁺ T cells which then activate and expand, leading to the destruction of the transduced cells¹⁵. Preexistence of memory AAV capsid-specific T cells in humans is then a key issue to address for a successful clinical translation of rAAV-based gene therapy. To our knowledge, in the general population, only cellular responses directed against AAV2¹⁵⁻¹⁷, AAV1¹⁸, AAV5¹⁶ and AAV8^{15,16} have been investigated so far, which does not cover the whole diversity of rAAV serotypes now used in clinical trials. Indeed, other serotypes are widely used in clinics such as AAV5^{19,20} or AAV9⁶. Intravenous and intracisternal deliveries of rAAV9 are becoming strategies of choice for the treatment of Central Nervous System (CNS) and muscular diseases using high vector doses whereas still no cellular prevalence data in humans are reported for AAV9 capsid. Numerous successful preclinical studies have opened the way to no less than 16 active or imminent clinical trials, as referenced in clinicaltrials.gov database, for spinal muscle atrophy (SMA), Batten, Pompe and Parkinson diseases as well as Duchenne Muscular Dystrophy. Moreover, the latest approved AAV product for the market, Zolgensma®, is a rAAV9 administered intravenously for the treatment of severe SMA disease in paediatric patients.

Here, we investigated the prevalence of AAV-specific circulating T cells against AAV9 as well as four other AAV serotypes already used in clinical trials (AAV2, 4, 5 and 8), using the IFN γ ELISpot assay that is usually used in immune monitoring. We have observed the highest prevalence of pre-existing cellular immunity against AAV9 serotype followed by AAV8. There was no correlation between those cellular responses and the prevalence of humoral anti-capsid immunity. In contrast, a high cross reactivity was observed between serotypes. Cell responses were mainly mediated by CD8 T cells as shown using CD4 and CD8-depleted fractions. We also assessed Fluorospot assays as a new potential poly-functional read-out of AAV-specific T cell responses to be used in clinical trials and identified different cytokine profiles between anti-AAV8 and anti-AAV9 responses. This observation could suggest a different functional impact of preexisting capsid-specific T cells in rAAV-based clinical trials. Our data encourage use of multiparametric monitoring methods, to better characterize capsid-specific cellular immune responses and predict their impact in rAAV-mediated clinical trials.

2. Material and methods

All this work was performed under the control of our quality management system that is approved by Lloyd's Register Quality Assurance LRQA to meet requirements of international Management System Standards ISO 9001:2015. It has been implemented to cover all activities in the laboratory, including research experiments and production of research-grade viral vectors.

Healthy donor samples

Cytapheresis samples were provided by the local Etablissement Français du Sang (EFS Nantes, Pays de la Loire, agreement N° PLER NTS 2016-25) and originated from consenting healthy donors living in the surrounding area (9 women, 89 men). Median age was 46 years old (min: 20; max: 72). PBMCs were obtained by Ficoll density gradient centrifugation (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) and frozen in liquid nitrogen for ELISpot and Fluoropost assays.

IFN γ ELISpot enzymatic assay using total PBMC

Anti-AAV cellular immune responses were evaluated with an IFN γ ELISpot assay using frozen PBMCs. The assay was performed using overlapping peptide libraries covering the whole AAV capsid sequences (Supplementary materials) (15 overlapping per 10 mers, PEPscreen, Sigma) split into three peptide pools each. MultiScreenHTS filter plates, with polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Millipore) were coated overnight at 4°C with human anti-IFN γ antibody (clone MT126L, 15 μ g/mL, Mabtech). After coating, 2×10^5 cells per well were plated and restimulated 48H with AAV-derived peptide pools at a final concentration of 10 μ g/mL. Medium alone served as negative control, while cells stimulated with concanavalin A (Con A, 10 μ g/mL, SIGMA) served as a positive control. After incubation with a biotinylated anti-IFN γ antibody (clone 7-B6-1, MabTech) and Streptavidin-ALP(MabTech), enzymatic reaction was revealed using NBT/BCIP (MabTech). Spot number was determined using an ELISpot iSpot Spectrum reader (AID, Strassberg, Germany) and analysed with AID ELISpot reader Software V7.0 (AID, Germany). Responses were considered positive when the number of spot-forming colonies per million cells was > 50 and at least threefold higher than the medium alone negative control. For positive responses, statistical analyses were performed using a DFR(2x) test.

IFN γ ELISpot enzymatic assay using CD4⁺ or CD8⁺ depleted PBMCs

CD4⁺ or CD8⁺ T cells have been depleted from total PBMCs using Stem Cell magnetic-based system (Easy Sep Stem Cell kits #17852 and #17853) according to manufacturer instructions. Subsequently, the efficiency of depletion has been evaluated by BD LSR II flow cytometer using anti-CD4 APC-H7 (BD Biosciences, #560251) and CD8 eFluor 605 (eBiosciences, #93-0088-42) antibodies. Anti-AAV cellular responses were assessed by IFN γ ELISpot as described above.

Multiparametric monitoring of preexisting anti-AAV cellular response using fluorospot assay

Anti-AAV cellular immune responses were also evaluated with IFN γ /IL-10/IL-5 and IFN γ /IL-2/TNF α Fluorospot assays (Mabtech) using frozen PBMCs. The assays were performed using the same peptide libraries as IFN γ ELISpot. For that purpose, 2×10^5 cells per well were seeded in antibody-pre-coated MultiScreenHTS filter plates and restimulated 48H with AAV-derived peptide pools at a final concentration of 10 μ g/mL. Medium alone served as negative control, while cells stimulated with PMA/ionomycin served as a positive control. After incubation with detection antibodies (MabTech) and fluorophore-conjugated reagents (Mabtech), spots were revealed with fluorescence enhancer. Spot number was determined using an ELISpot iSpot Spectrum reader (AID, Strassberg, Germany) and analysed with AID ELISpot reader Software V7.0 (AID, Germany). Responses were considered positive when the number of spot-forming colonies per million cells was >50 and at least threefold higher than the medium alone negative control. For positive responses, statistical analyses were performed using a DFR(2x) test.

Monitoring of preexisting anti-AAV IgG antibodies

Detection of anti-AAV total IgG antibodies for each serotype in the plasma of healthy human donors was conducted using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Nunc Maxisorp P96 plates (Sigma-Aldrich) were coated overnight at 4°C with rAAV (INSERM UMR 1089 Vector Core Facility) at 5×10^9 vector genome (vg)/well. After washing and plate saturation, wells were then incubated for 1 hour at 37°C with 12 serial twofold dilutions of human plasma (from 1/10 to 1/20,480) followed by HRP-conjugated anti-human F(ab')₂ IgG antibody (Jackson) for 1 hour at 37°C. Revelation was performed using 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB, OptEIA, BD Biosciences) and absorbance of duplicate samples

was read at 450 nm with a correction at 570 nm on a MultiSkan Go reader (Thermo Scientific). Positive threshold curves for each ELISA were determined from seronegative human sera (> 20 donors) as the mean optic density for each dilution + 2xSD. For each donor, anti-AAV IgG titer was defined as the last plasma dilution with an optic density remaining above the threshold curve.

Monitoring of anti-AAV neutralizing factors

Detection of anti-AAV neutralizing factors for each serotype was conducted using a neutralization assay based on the principle of transduction inhibition in HeLa cells. Five 10-fold serial dilutions of serum (1:50 to 1:100,000) were incubated 30 min at room temperature with rAAV-CMV-LacZ vectors. The media of HeLa cells pre-emptively infected with adenovirus serotype 5 was removed, and plasma containing rAAV vectors were added. After a 24H-incubation at 37°C, cells were fixed and β -galactosidase expression was then revealed with an X-gal substrate (Promega). Titers of anti-AAV neutralizing factors were defined as the last dilution where transduction was reduced compared to transduction control using rAAV vectors in the absence of plasma.

3. Results

Higher prevalence of cellular response against AAV9 compared to other serotypes.

In order to study the prevalence of pre-existing anti-capsid cellular responses in the general human population, anti-AAV2, 4, 5, 8 and 9 capsid-directed T cell responses were assessed through IFN γ ELISpot assays using PBMCs isolated from healthy donors (total n = 93. 71 donors assessed for all serotypes). Cells were stimulated with 3 pools of overlapping peptides covering the whole AAV capsid sequences (**Fig. 1a for representative assays**). For each assay a positive control was performed with concanavalin A (ConA) the negative control consisted in medium alone (neg). Donor #1755 is shown as a representative negative sample for all AAV serotypes. Donor #7043 is a representative donor with a positive response against all serotypes tested except AAV5 and donor #3149 is shown as a representative donor with a cross-reactive response for AAV8 and AAV9 serotypes. Results from the whole cohort are summarized in **Table 1**. Surprisingly, cellular responses directed against AAV9 were the most prevalent (49.4%), followed by AAV8 (21%), AAV4 (10%) and AAV2 (6%). No positive donors were found for AAV5. For 3 serotypes (AAV4, AAV8 and AAV9), pool 3 elicited a majority of positive responses. As expected, due to their strong homology, cross responses were observed between serotypes with 38.7% of positive donors reacting against 2 or more serotypes as presented in **Table 2** and **Fig.1 b** in a Venn diagram. All AAV2-positive donors were also found positive for AAV8 serotype. Interestingly, only 43.9% of AAV9-positive donors were found positive for another serotype.

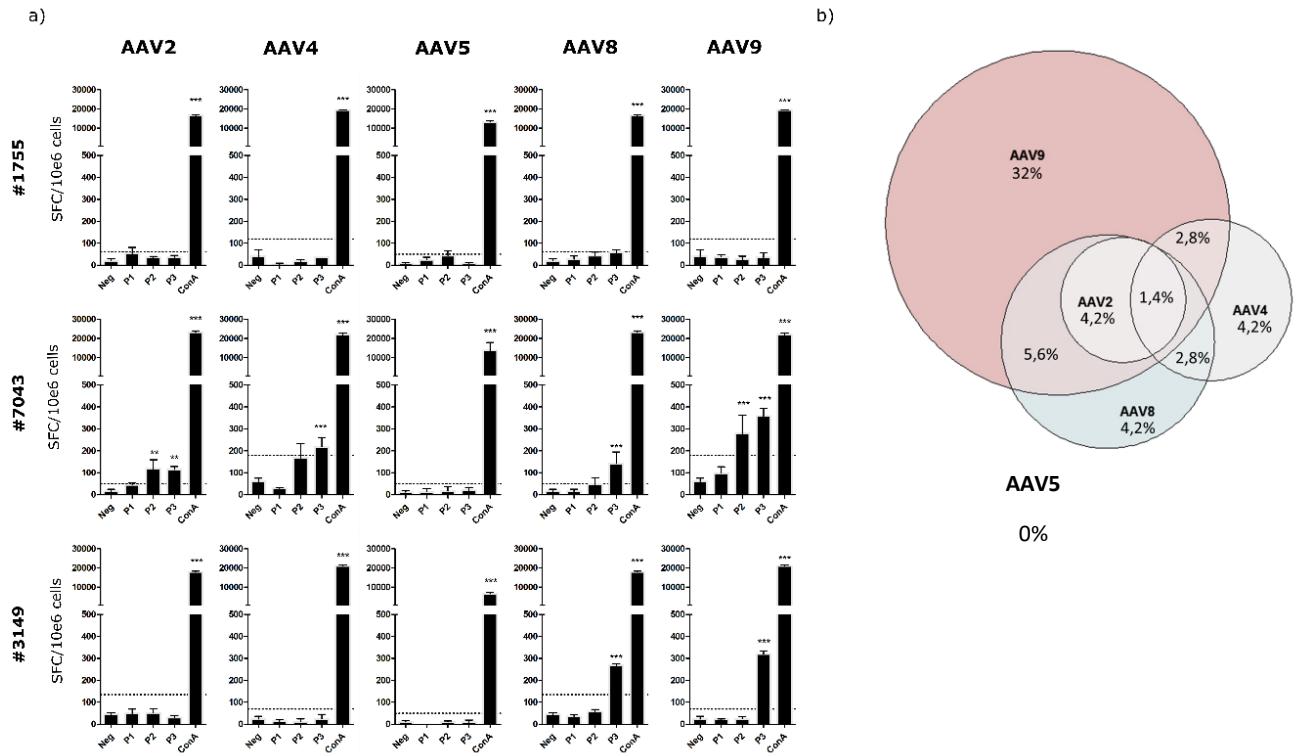


Figure 1: Representative anti-AAV2, anti-AAV4, anti-AAV5, anti-AAV8 and anti-AAV9 IFN γ ELISpot responses and Venn Diagramm of cross reactivity. Anti-AAV IFN γ ELISpot responses were assessed after 36-48H-stimulation of whole PBMCs from donors with 3 pools of overlapping peptides (P1, P2, P3) covering the whole AAV2, AAV4, AAV5, AAV8 or AAV9 capsid sequences. As negative control, PBMCs were cultured in medium alone (Md). Concanavaline A (Con A)-stimulated PBMCs served as positive control. (a) Representative results of 3 donors (#1755, #7043 and #3149) are shown for each serotype. Results are expressed in Spot Forming Cells (SFC) per millions PBMCs. Positive threshold (dotted line) was calculated as three times the value obtained with medium alone or at least 50 SFC/10e6 cells. Statistical significance was determined using DFR(2x) statistical test. **: $p < 0.01$. ***: $p < 0.001$. (b) Venn Diagramm of cross reactivity between serotypes for the 71 donors tested for all 5 serotypes.

Serotypes	Number of positive donors /	Percentage of positive donors	Pool	Number of pool positive response /	Percentage of positive donors
	Number of tested donors			Number of positive donors	
AAV2	5/80	6%	Pool 1	0/5	0,0%
			Pool 2	4/5	80,0%
			Pool 3	2/5	40,0%
AAV4	8/80	10%	Pool 1	1/8	12,5%
			Pool 2	3/8	37,5%
			Pool 3	4/8	50,0%
AAV5	0/93	0%	Pool 1	NA	NA
			Pool 2	NA	NA
			Pool 3	NA	NA
AAV8	19/91	21%	Pool 1	4/19	21,0%
			Pool 2	11/19	57,9%
			Pool 3	16/19	84,2%
AAV9	41/83	49%	Pool 1	5/41	12,2%
			Pool 2	5/41	12,2%
			Pool 3	38/41	92,0%

Table 1: Overview of anti-AAV2, anti-AAV4, anti-AAV5, anti-AAV8 and anti-AAV9 IFN γ responses assessed on PBMCs from donors by IFN γ ELISpot. NA, Non applicable.

We have next decided to focus on the AAV2, 8 and 9 serotypes in particular. Anti-AAV2, AAV8 (n=58) and AAV9 (n=36) humoral responses have been tested by ELISA (**Table S1**). A correlation study was realized between anti-AAV cellular and humoral response (**Fig. 2**). Results obtained for cellular response by anti-AAV IFN γ ELISpot (in SFC/millions cells) were plotted against results obtained for humoral response by ELISA (titers of anti-AAV total IgG) for AAV2 (**Fig. 2a**), AAV8 (**Fig. 2b**) and AAV9 (**Fig. 2c**). For the 3 serotypes, as already reported by other studies, the presence of anti-AAV cellular response does not necessarily imply a humoral response and *vice versa*. Moreover, for donors presenting both responses, there is no correlation between anti-AAV total IgG titers and the frequency of IFN γ secreting cells. Hence, no any correlation between anti-AAV2, anti-AAV8 and anti-AAV9 humoral and cellular responses was observed.

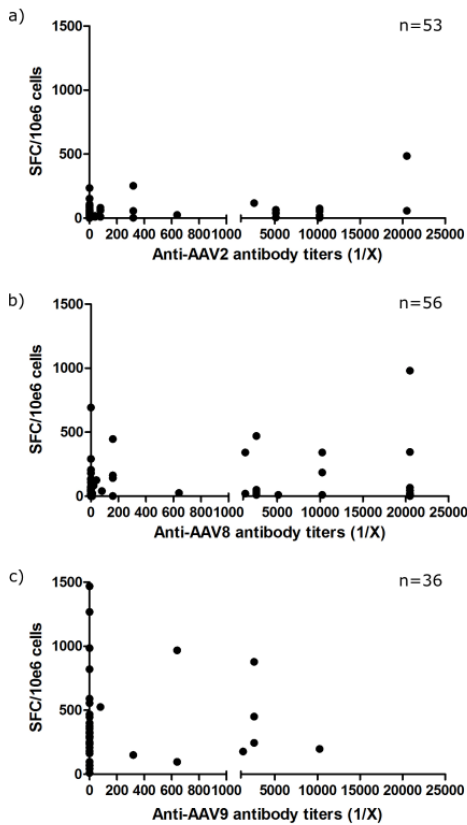


Figure 2: No correlation between anti-AAV2, anti-AAV8 and anti-AAV9 humoral and cellular response. Correlation study between anti-AAV IFN γ ELISpot responses and anti-AAV antibody titres for AAV2 (a), AAV8 (b) and AAV9 (c). SFC/10 6 cells values obtained through anti-AAV IFN γ ELISpot assays were plotted against titres of anti-AAV total IgG antibodies, determined by ELISA. Spearman correlation test revealed no correlation between both parameters.

Serotypes	Number of positive donors/ Number of tested donors	Percentage of positive donors
Negative	30/71	42,2%
AAV2 only	0/71	0,0%
AAV4 only	3/71	4,2%
AAV5 only	0/71	0,0%
AAV8 only	3/71	4,2%
AAV9 only	23/71	32,2%
AAV8/AAV9	4/71	5,6%
AAV4/AAV8	2/71	2,8%
AAV4/AAV9	2/71	2,8%
AAV2/AAV8/AAV9	3/71	4,2%
AAV2/AAV4/AAV8/AAV9	1/71	1,4%

Table 2: Overview of anti-AAV2, anti-AAV4, anti-AAV5, anti-AAV8 and anti-AAV9 IFN γ responses cross-reactivity assessed on PBMCs from donors by IFN γ ELISpot.

AAV IFN γ response is predominantly mediated by CD8⁺ T cells.

We next continued the study with AAV8 and AAV9 serotypes which have shown the highest prevalence in our study and are widely used in the clinics. To refine the analysis of IFN γ anti-AAV cellular responses, we performed additional IFN γ ELISpot assays in a representative cohort of positive donors (n=7 to 16) using CD4⁺ or CD8⁺-depleted PBMC cell fractions (**Fig. 3 for a representative assay**). The efficiency of CD4 and CD8 depletions was confirmed by flow cytometry (**Fig. 3a for a representative assay**). After CD8-depletion, we obtained fractions with a purity ranging from 94.27% to 99.71% whereas for CD4-depleted fractions, depletion purity was ranging from 90.52% to 99.64%.

In all positive donors tested against AAV2 (n=4) and AAV8 (n=16), IFN γ secretion was only detected in CD4-depleted fractions (**Fig. 3b for a representative assay**). No any IFN γ secretion was observed in the CD8-depleted fraction for all donors tested. Therefore, anti-AAV8 T cell response seems to be mainly mediated by CD8⁺ T cells. Interestingly, depletion of CD4⁺ T cells from the PBMCs of ELISpot responders led to higher amplitudes of responses as compared to total PBMCs condition without significantly increasing the background noise (**Fig. 3b**).

Seven IFN γ ELISpot positive donors were tested for AAV9 serotype and here again CD4-depleted fractions have shown IFN γ secretion similarly to the whole PBMCs condition. Nevertheless, in 3 out of 7 donors, we have also observed a significant IFN γ secretion in CD8-depleted fraction despite the efficiency of depletion (90.52%; 97.26% and 97.39% CD4⁺/CD3⁺-cells) (**Fig. 3c for a representative assay**). Therefore, anti-AAV9 IFN γ T cell response seems to be mainly mediated by CD8⁺ T cells, but CD4⁺ T cells seem to also secrete IFN γ in some donors.

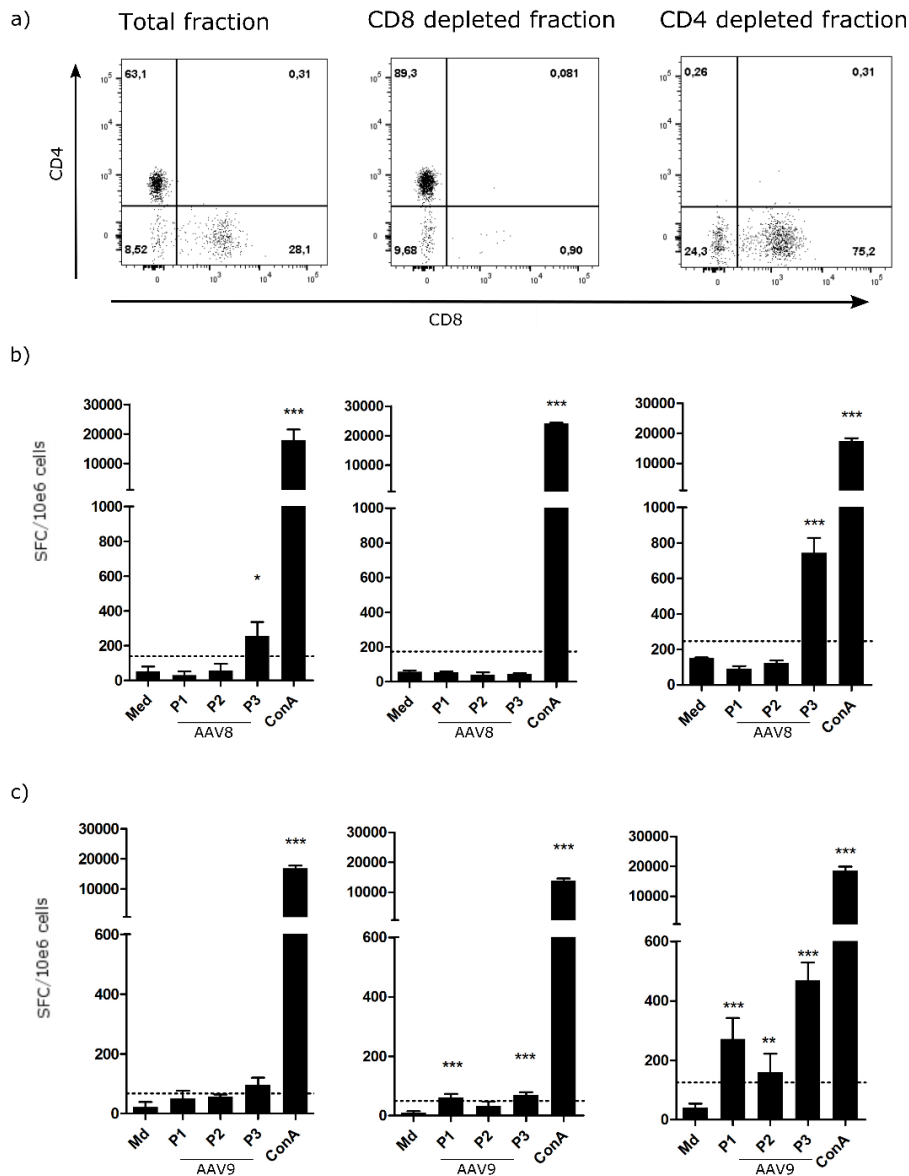


Figure 3: Representative anti-AAV IFN γ ELISpot responses with CD4/CD8 depletion.

Representative anti-AAV8 and anti-AAV9 IFN γ responses detected after CD4⁺ or CD8⁺ T cell depletion of PBMCs. CD4⁺ or CD8⁺ T cells were depleted from PBMCs using a magnetic sorting method, prior to IFN γ ELISpot assays. (a) Example of purity assessment. Purity of CD4- or CD8-depleted fractions was assessed through flow cytometry. Anti-AAV2, anti-AAV8 and anti-AAV9 IFN γ ELISpot responses were assessed after 48H-stimulation of whole PBMCs from donors with 3 pools of overlapping peptides (P1, P2, P3) covering the whole AAV2, AAV8 or AAV9 capsid sequences. As negative control, PBMCs were cultured in medium alone (Md). Concanavaline A (Con A)-stimulated PBMCs served as positive control. Results are represented as the number of Spot Forming Cells (SFC) per million PBMCs.

Positive threshold (dotted line) was calculated as three times the value obtained with medium alone or at least 50 SFC/10e6 cells. Statistical significance was determined using the DFR(2x) statistical test. ** : $p < 0.01$. *** : $p < 0.001$. (b) Representative anti-AAV8 IFN γ responses detected after CD4⁺ or CD8⁺ T cell depletion of PBMCs. (c) Representative anti-AAV9 IFN γ responses detected after CD4⁺ or CD8⁺ T cell depletion of PBMCs.

Poly-functional assessment of AAV-specific T cell responses using fluorospot assays

In order to further investigate the response of circulating AAV-specific T cells, we performed Fluorospot assays to simultaneously evaluate the secretion of 3 cytokines following PBMCs stimulation with overlapping AAV8 and AAV9 peptide pools. We tested 2 panels: T helper/T cytotoxic 1 profile (IFN γ /TNF α /IL-2) (**Fig. 4a for representative assays**) and T helper/T cytotoxic 2 profile (IFN γ /IL-5/IL-10) (**Fig. 4b for representative assays**). For each panel, a representative donor is shown for AAV peptide pool stimulation and positive control (Concanavalin A). Positive control for IL-10 and IL-5 was found less intense compared to IFN γ but is still significantly positive ($p < 0.001$) for each donor tested. Six IFN γ ELISpot positive donors for AAV8 and 8 donors for AAV9 serotype were tested using the two fluorospot panels. IFN γ secretion was found similar between enzymatic ELISpot and the two Fluorospot assays in all donors tested which allowed us to validate the fluorospot method (**Fig. S1 for representative responses**).

Using the IFN γ /IL-5/IL-10 fluorospot panel (**Fig. 4d**), only IFN γ was detected for all donors but no IL-5 or IL-10 cytokine secretion for both AAV8 and AAV9 serotypes.

Using IFN γ /TNF α /IL-2 fluorospot panel, we were able to detect in addition to IFN γ secretion TNF α and IL-2 cytokines. However, cytokinic profiles were found different between AAV8 and AAV9 serotypes. Whereas, cytokine secretion has shown a variability in AAV8-positive donors with both TNF α ⁺/IL-2⁺ secretion by IFN γ secreting cells (n=3), or only either TNF α (n=2) or IL-2 (n=1) secretion by IFN γ positive cells. On the other hand, responses against AAV9 serotype have shown the same cytokine profile in all donors tested. Indeed, only TNF α and no IL-2 secretion was observed in IFN γ -positive cells for the 8 donors tested. Thus, Anti-AAV8 and anti-AAV9 T cell responses seem to be mediated by a T helper/T cytotoxic cytokinic profile with potentially capsid-dependent specific functional responses to be confirmed in a larger human cohort.

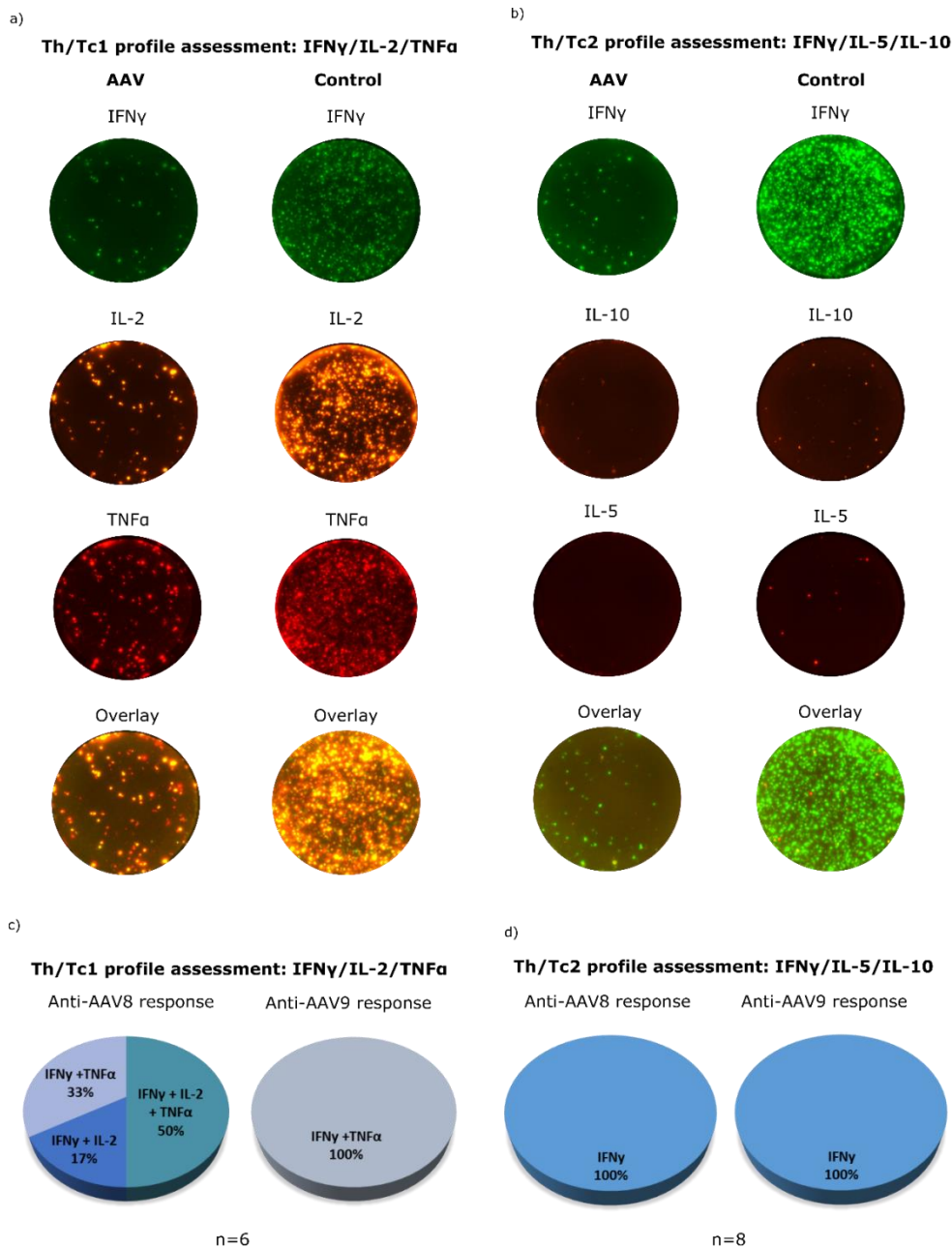


Figure 5 : Example of anti-AAV8 and anti-AAV9 Fluorospot responses.

Anti-AAV Fluorospot responses were assessed after 48H-stimulation of whole PBMCs from donors with 3 pools of overlapping peptides (P1, P2, P3) covering the whole AAV8 or AAV9 capsid sequences. (a) Representative anti-AAV (left) or positive control (right) response with IFN γ /IL-2/TNF α Fluorospot assay. (b) Representative anti-AAV (left) or positive control (right) response with IFN γ /IL-5/IL-10 Fluorospot assay. Results were quantified as the number of Spot Forming Cells (SFC) per million PBMCs. Positive threshold (dotted line) was calculated as three times the value obtained with medium alone or at least 50 SFC/10e6 cells. (c) Th/Tc1 profile assessment. Percentage of different cytokine profiles in response to AAV8 (n=6) and AAV9 (n=8) among all donors tested are represented on pie chart. (d) Th/Tc2 profile assessment. Percentage of different cytokine profiles in response to AAV8 (n=6) and AAV9 (n=8) among all donors tested are represented on pie chart.

4. Discussion

Pre-existing immunity to AAV capsid is one of the major hurdles for successful clinical translation of rAAV gene therapy products. To our knowledge, only the prevalence of pre-existing cellular immunity directed against AAV8, AAV5, AAV2 and AAV1 has been assessed in the general populations so far^{16–18,21}. Cellular immunity against recently emerging serotype AAV9 haven't been reported yet whereas it is used to date in no less than 16 active or imminent clinical trials (clinicaltrials.gov database). Moreover, the latest approved AAV product for the market, Zolgensma®, is a rAAV9 administered intravenously at high doses for the treatment of severe SMA disease in paediatric patients.

Here, we have assessed and compared the prevalence of T cell responses against AAV2, AAV4, AAV5, AAV8 and AAV9 serotype in the same PBMCs samples of 91 healthy human donors among which 71 samples assessed for all studied serotypes to evaluate their cross reactivity. Cellular anti-AAV8 responses (21%) appeared to be more frequent than anti-AAV2's (6%) in our cohort. These results were unexpected as AAV2 was isolated in humans and the wild-type AAV8 serotype was in contrast first isolated from non-human primate samples. In that line, AAV2 antibody seroprevalence was the highest prevalence reported in humans²². However, previous studies reported an absence of correlation between cellular and humoral AAV responses for serotypes 1, 2 and 8^{15,16,18}. This could explain the highest AAV8 cellular immunity prevalence in our study. However, our cohort has also shown a higher seroprevalence for AAV8 as compared to AAV2 and another explanation could be a geographic cohort-specific feature. Indeed Calcedo *et al.*²³ have previously shown variations in prevalence of neutralizing antibodies against AAV around the world and even between countries located in the same continent. One additional explanation to keep in mind is the absence of standardization of assays making sensitivity as well as threshold of positivity difficult to compare between studies.

Interestingly, we have observed in our cohort a high prevalence of T cell responses against AAV9 serotype (49% of positive donors) with the majority of responses observed for peptide pool 3. Although AAV9 has been isolated from humans, its discovery is quite recent²⁴ and no yet cellular prevalence studies were reported to our knowledge. Again and similarly to previous studies, we did not observe a correlation between anti-AAV9 humoral and cellular responses. Indeed, no correlation was observed between the frequency of IFN γ secreting cells in AAV9 donors and anti-AAV antibody titers similarly to AAV2 and AAV8 serotypes in our

study. The reasons or mechanisms by which cellular and humoral immunities are disconnected for AAV antigens are not yet known.

We have highlighted one predominant immunogenic peptide pool for each serotype (**Table 1**). Pool 2 for AAV2 (80%), pool 3 for AAV4 (50%), pool 3 for AAV8 (84.2%) and pool 3 for AAV9 (92%). Two AAV8 immunodominant peptides have been described in the literature (A2-restricted and B7-restricted)^{15,25}. These 2 peptides are present within peptide pool 2 which induces allows IFN γ secretion in 57.9% of AAV8 positive donors for whom we don't know HLA typing. Pool 3 is shared by several serotypes and may also contain immunodominant peptides. None have been described for AAV9 so far.

AAV capsid presents strong homologies between serotypes and a high level of antibody as well as epitope cross reactivity²⁴⁻²⁶. Here, 71 donors were tested using IFN γ ELISpot for all 5 serotypes (**Table 2 and Fig 1 B**) and confirmed the high epitope cross reactivity. All donors displaying a positive response after AAV2 peptide pool stimulation also responded to AAV8 and AAV9. These results are in line with the phylogenetic proximity between AAV2, 8 and 9 capsids as described by Calcedo²³. On the other hand, although considered phylogenetically distant²³, AAV4 has shown cross-reactivity with other serotype tested in 3 of 8 positive donors. However, given the small number of AAV4 positive donors, the results may not be statistically significant to reflect the phylogenic distance. Finally, no AAV5 positive donor was found in our cohort which is in line with the phylogenetic distance of AAV5 as compared to other studied serotypes²⁴.

In addition to AAV capsid cross reactivity between serotypes, we cannot exclude a particular cross reactivity of AAV9 capsid peptide pool 3 with unrelated antigenic epitopes that would be frequent in humans and responsible for the high positivity of AAV9 responses. In our cohort, we didn't observe a correlation between age and prevalence although all our donors were adults (data not shown). AAV prevalence was shown indeed to increase with age during early childhood^{15,21,27,28}.

Using CD4 and CD8-depleted PBMC, we have shown that IFN γ secretion is mainly mediated by CD8⁺ T cells following AAV8 and AAV9 capsid stimulation which consistent with the cytotoxic responses observed in AAV-based hemophilia trials^{4,29}. A recent study has already reported a limited CD4 activation following capsid stimulation³⁰. It is worth noting that our ELISpot setting allows the detection of CD4⁺ T cells responses as we have also detected IFN γ secretion in CD8-depleted fraction in 3 donors for AAV9.

In addition, we noticed that depletion of CD4⁺ T cells prior to ELISpot assay noticeably increased the intensity of responses (which is expected as when CD4⁺ T cells are removed, CD8⁺ T cells are proportionally more frequent in samples), without increasing the background signal. As such, CD4⁺ T cell depletion is a quick and an efficient method that might be used to enhance ELISpot detection sensitivity before or during rAAV-mediated clinical trials.

The reactivation of memory AAV T cells in rAAV-based clinical trials may depend on many parameters, such as the injection route, the vector dose, the target organ and its inflammatory state. IFN γ ELISpot responses didn't systematically translate into liver transaminase level peaks or loss of transgene expression in hemophilic patients^{2,10}. A multiparametric characterization of AAV cellular immunity remains mandatory to better predict the outcome of those T cells following AAV delivery. For that purpose, we used Fluorospot technology which allows the detection of several cytokines simultaneously using the same cell number which could be a significant advantage in clinical immunomonitoring where PBMC sample size is generally limiting. Fluorospot assays were performed with 2 panels: T helper/cytotoxic 1 profile (IFN γ /TNF α /IL-2) and Th/c2 profile (IFN γ /IL-5/IL-10). IFN γ secretion was comparable between the conventional enzymatic ELISpot and the 2 Fluorospot kits. Only TNF α and IL2 secretions were detectable in our donors. Type 1 responses are dedicated to intracellular viral or bacterial infections and are classically described in viral infections as hepatitis C^{31,32}. Although the analyzed cohort is small and the results need to be confirmed, no IL-2 secretion was observed for all AAV9 donors tested. The loss of IL2 secretion could be related to a potential exhaustion of the CD8⁺ LTs responses³³. T cell exhaustion is a feature already reported in chronic viral infections related to hepatitis B virus, hepatitis C virus or HIV infections³⁴⁻³⁶. Whereas chronicity of WT AAV infection has never been clearly demonstrated in humans, it is likely because a significant portion of individuals, aged less than 60 years old, who harbour anti-AAV1 IgG antibodies also exhibit anti-AAV1 IgM antibodies, an immunoglobulin subtype classically encountered during the course of a running infection^{28,37}. During chronic viral infection, the loss of IL2 and subsequently TNF α T cell responses are responsible of a decrease of effector responses. IFN γ is generally maintained a long time, but can also extinguish in the most severely exhausted subsets³⁸. In the context of AAV immunity, upregulation of exhaustion marker PD1 has been described in CD8⁺ cells in response to AAV2 capsid stimulation³⁰. Regulatory and exhausted capsid T cells were also described in a muscle directed gene transfer clinical trial³⁹⁻⁴¹. T cell

exhaustion could explain why IFN γ ELISpot responses didn't systematically translate into liver transaminase in previous clinical trials⁴² and that not major transaminatis responses were reported using AAV9 serotype although the only available data to date were reported in paediatric patients under corticosteroid treatment^{6,9}.

In conclusion, our study points out the interest of multiparametric assessment of capsid responses to better understand the course of AAV infection and the type of induced capsid- specific T cell immunity. The development of immune monitoring assays combining both accrued detection sensitivity and relevant functional assessment should prove to be the way to efficient clinical pre-screening of patients. However, the induction of cytotoxic and tolerogenic/exhausted T cell responses still to be understood in order to better predict the outcome of rAAV gene transfer in patients with preexisting immunity as well as the impact of the type of serotype on host responses.

5. Conflict of Interest

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

6. Author Contributions

R.X, M.D., C.V. and O.A. conceived and designed the experiments; R.X., M.D., C.V., N.J., C.C., J.L., and A.C. performed the experiments; R.X, M.D., C.V., N.J., C.C., J.L., A.C. and M.G. analyzed the data; R.X, M.G. and O.A. contributed to the writing of the manuscript.

7. Acknowledgments.

The authors thank the Cytometry Facility Cytocell from Nantes for expert technical assistance (<https://cytocell.univ-nantes.fr/>). We also thank “Etablissement Français du sang” for providing us with buffy coat. This work was supported by the Inserm, the French Ministry of Research, the FRM (Fondation pour la Recherche Médicale), the University Hospital of Nantes, the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de Loire, the AFM-Téléthon

(Association Française contre les Myopathies), Région Pays de Loire (IMBIO-DC consortium) and the IHU-CESTI which is supported by the French National Research Agency (ANR) via the “Investment Into The Future” program ANR-10-IBHU-005.

8. References

1. Srivastava, A (2016). In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr. Opin. Virol.* **21**: 75–80.
2. Bainbridge, JWB, Mehat, MS, Sundaram, V, Robbie, SJ, Barker, SE, Ripamonti, C, *et al.* (2015). Long-term effect of gene therapy on Leber’s congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* **372**: 1887–1897.
3. Maguire, AM, High, KA, Auricchio, A, Wright, JF, Pierce, EA, Testa, F, *et al.* (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber’s congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Lond. Engl.* **374**: 1597–1605.
4. Nathwani, AC, Reiss, UM, Tuddenham, EGD, Rosales, C, Chowdary, P, McIntosh, J, *et al.* (2014). Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **371**: 1994–2004.
5. Mendell, Jerry. Systemic Gene Delivery Clinical Trial for Duchenne Muscular Dystrophy - NCT03375164 - ClinicalTrials.gov at <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03375164>>.
6. Mendell, JR, Al-Zaidy, S, Shell, R, Arnold, WD, Rodino-Klapac, LR, Prior, TW, *et al.* (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N. Engl. J. Med.* **377**: 1713–1722.
7. Simonelli, F, Maguire, AM, Testa, F, Pierce, EA, Mingozzi, F, Bennicelli, JL, *et al.* (2010). Gene therapy for Leber’s congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **18**: 643–650.
8. Gaudet, D, de Wal, J, Tremblay, K, Déry, S, van Deventer, S, Freidig, A, *et al.* (2010). Review of the clinical development of alipogene tiparvovec gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Atheroscler. Suppl.* **11**: 55–60.
9. Hoy, SM (2019). Onasemnogene Apeparvovec: First Global Approval. *Drugs* **79**: 1255–1262.
10. Nathwani, AC, Tuddenham, EGD, Rangarajan, S, Rosales, C, McIntosh, J, Linch, DC, *et al.* (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **365**: 2357–2365.
11. Basner-Tschakarjan, E and Mingozzi, F (2014). Cell-Mediated Immunity to AAV Vectors, Evolving Concepts and Potential Solutions. *Front. Immunol.* **5**: 350.

12. Blacklow, NR, Hoggan, MD, Kapikian, AZ, Austin, JB and Rowe, WP (1968). Epidemiology of adenovirus-associated virus infection in a nursery population. *Am. J. Epidemiol.* **88**: 368–378.
13. Blacklow, NR, Hoggan, MD and Rowe, WP (1968). Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *J. Natl. Cancer Inst.* **40**: 319–327.
14. Manno, CS, Glenn F. Pierce, Arruda, VR, Pierce, GF, Glader, B, Ragni, M, *et al.* (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* **12**: 342–347.
15. Mingozzi, F, Maus, MV, Hui, DJ, Sabatino, DE, Murphy, SL, Rasko, JEJ, *et al.* (2007). CD8+ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* **13**: 419–422.
16. Kruzik, A, Fetahagic, D, Hartlieb, B, Dorn, S, Koppensteiner, H, Horling, FM, *et al.* (2019). Prevalence of Anti-Adeno-Associated Virus Immune Responses in International Cohorts of Healthy Donors. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **14**: 126–133.
17. Li, H, Lasaro, MO, Jia, B, Lin, SW, Haut, LH, High, KA, *et al.* (2011). Capsid-specific T-cell responses to natural infections with adeno-associated viruses in humans differ from those of nonhuman primates. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **19**: 2021–2030.
18. Veron, P, Leborgne, C, Monteilhet, V, Boutin, S, Martin, S, Moullier, P, *et al.* (2012). Humoral and cellular capsid-specific immune responses to adeno-associated virus type 1 in randomized healthy donors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **188**: 6418–6424.
19. Rangarajan, S, Walsh, L, Lester, W, Perry, D, Madan, B, Laffan, M, *et al.* (2017). AAV5-Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* **377**: 2519–2530.
20. Miesbach, W, Meijer, K, Coppens, M, Kampmann, P, Klamroth, R, Schutgens, R, *et al.* (2018). Gene therapy with adeno-associated virus vector 5-human factor IX in adults with hemophilia B. *Blood* **131**: 1022–1031.
21. Chirmule, N, Propert, K, Magosin, S, Qian, Y, Qian, R and Wilson, J (1999). Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* **6**: 1574–1583.
22. Louis Jeune, V, Joergensen, JA, Hajjar, RJ and Weber, T (2013). Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum. Gene Ther. Methods* **24**: 59–67.
23. Calcedo, R, Vandenberghe, LH, Gao, G, Lin, J and Wilson, JM (2009). Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *J. Infect. Dis.* **199**: 381–390.
24. Gao, G, Vandenberghe, LH, Alvira, MR, Lu, Y, Calcedo, R, Zhou, X, *et al.* (2004). Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues. *J. Virol.* **78**: 6381–6388.

25. Hui, DJ, Edmonson, SC, Podsakoff, GM, Pien, GC, Ivanciu, L, Camire, RM, *et al.* (2015). AAV capsid CD8⁺ T-cell epitopes are highly conserved across AAV serotypes. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **2**: 15029.
26. Boutin, S, Monteilhet, V, Veron, P, Leborgne, C, Benveniste, O, Montus, MF, *et al.* (2010). Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Hum. Gene Ther.* **21**: 704–712.
27. Halbert, CL, Miller, AD, McNamara, S, Emerson, J, Gibson, RL, Ramsey, B, *et al.* (2006). Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: Implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum. Gene Ther.* **17**: 440–447.
28. Erles, K, Sebökova, P and Schlehofer, JR (1999). Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J. Med. Virol.* **59**: 406–411.
29. Mingozzi, F, Maus, MV, Hui, DJ, Sabatino, DE, Murphy, SL, Rasko, JEJ, *et al.* (2007). CD8⁺ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* **13**: 419–422.
30. Kuranda, K, Jean-Alphonse, P, Leborgne, C, Hardet, R, Collaud, F, Marmier, S, *et al.* (2018). Exposure to wild-type AAV drives distinct capsid immunity profiles in humans. *J. Clin. Invest.* **128**: 5267–5279.
31. Bertoletti, A, D’Elios, MM, Boni, C, De Carli, M, Zignego, AL, Durazzo, M, *et al.* (1997). Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* **112**: 193–199.
32. Napoli, J, Bishop, GA, McGuinness, PH, Painter, DM and McCaughan, GW (1996). Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* **24**: 759–765.
33. Wherry, EJ, Ha, S-J, Kaech, SM, Haining, WN, Sarkar, S, Kalia, V, *et al.* (2007). Molecular signature of CD8⁺ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **27**: 670–684.
34. Boni, C, Fisicaro, P, Valdatta, C, Amadei, B, Di Vincenzo, P, Giuberti, T, *et al.* (2007). Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J. Virol.* **81**: 4215–4225.
35. El-Far, M, Halwani, R, Said, E, Trautmann, L, Doroudchi, M, Janbazian, L, *et al.* (2008). T-cell exhaustion in HIV infection. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **5**: 13–19.
36. Radziewicz, H, Ibegbu, CC, Fernandez, ML, Workowski, KA, Obideen, K, Wehbi, M, *et al.* (2007). Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J. Virol.* **81**: 2545–2553.

37. Murphy, SL, Li, H, Mingozzi, F, Sabatino, DE, Hui, DJ, Edmonson, SA, *et al.* (2009). Diverse IgG subclass responses to adeno-associated virus infection and vector administration. *J. Med. Virol.* **81**: 65–74.
38. Wherry, EJ, Blattman, JN, Murali-Krishna, K, van der Most, R and Ahmed, R (2003). Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* **77**: 4911–4927.
39. Mueller, C, Gernoux, G, Gruntman, AM, Borel, F, Reeves, EP, Calcedo, R, *et al.* (2017). 5 Year Expression and Neutrophil Defect Repair after Gene Therapy in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **25**: 1387–1394.
40. Gernoux, G, Wilson, JM and Mueller, C (2017). Regulatory and Exhausted T Cell Responses to AAV Capsid. *Hum. Gene Ther.* **28**: 338–349.
41. Mueller, C, Chulay, JD, Trapnell, BC, Humphries, M, Carey, B, Sandhaus, RA, *et al.* (2013). Human Treg responses allow sustained recombinant adeno-associated virus-mediated transgene expression. *J. Clin. Invest.* **123**: 5310–5318.
42. Mingozzi, F and High, KA (2007). Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr. Gene Ther.* **7**: 316–324.

9. Supplemental Methods and Materials

AAV2 sequence used to generate the peptide bank:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
 YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADADEFQERLKE
 DTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAG
 QQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGAD
 GVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGY
 STPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTI
 ANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVG
 RSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFTSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLS
 RTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWT
 GATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMIT
 DEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQG
 PIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYST
 GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLT
 RNL

AAV4 sequence used to generate the peptide bank:

MTDGYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYK
YLGPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQKAGDNPYLKYNHADADEFQQRLQ
GDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQQPDSSTGIGKKG
KQPAKKKLVFEDETGAGDGPPEGSTSGAMSDDSEMRAAAGGAAVEGGQGADGVGN
ASGDWHCDSTWSEGHVTTTSTRTWVLPTYNNHLYKRLGESLQSNTYNGFSTPWGYF
DFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGMRPKAMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANNLTS
TVQIFADSSYELPYVMDAGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGLVTGNTSQQQTRNA
FYCLEYFPSQMLRTGNNFEITYSFEKVPFHSMY AHSQSLDRLMNPLIDQYLWGLQSTT
TGTTLNAGTATTNFTKLRPTNFSNFKKNWLPGPSIKQQGFSKTANQNYKIPATGSDSL
IKYETHSTLDGRWSALTPGPPMATAGPADSKFSNSQLIFAGPKQNGNTATVPGTLIFT
SEEELAATNATDMDWGNLPGGDQSNLPTVDRLTALGAVPGMVWQNRDIYYQG
PIWAKIPHTDGHFHPSPILIGGFGLKHPPPQIFIKNTPVPANPATTFSSTPVNSFITQYSTG
QVSVQIDWEIQKERSKRWNPEVQFTSNYGQQNSLLWAPDAAGKYTEPRAIGTRYLT
HHL

AAV5 sequence used to generate the peptide bank:

MSFVDHPPDWLEEVGEGLEFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYL
GPGNGLDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDT
FGGNLKGAVFQAKKRVLPEFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTS
SDAEAGPSGSQQQLQIPASSLGADTMSAGGGGGLGDNNQGADGVGNASGDWHC
DSTWMGDRVVTKSTRTWVLPYNNHLYREIKSGSV DGSNANAYFGYSTPWGYFDF
NRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANLSTVQ
VFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSFFCLE
YFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGV
QFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSASFATTNRMELEGASY
QVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVN
RVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETG
AHFHPSPAMGGFGLKHPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEW
ELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL

AAV8 sequence used to generate the peptide bank:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGY
KYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQ
EDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLPLGLVEEGAKTAPGKKRVPVEPSPQRSPPDSSTGIGKK

GQQPARKRLNFGQTGDSESVDPDPQPLGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGA
DGVGSSSGNWHCDSTWLGDREVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTY
FGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGT
KTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAV
GRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYYL
SRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNFA
WTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDEERFFPSNGILIFGKQNAARDNADYSDV
MLTSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTVNSQGALPGMVWQNRDVYL
QGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFITQY
STGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYL
TRNL

AAV9 sequence used to generate the peptide bank:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGY
KYLGPNGLDKGEVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERL
KEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGK
SGAQAQKRLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPPAAPSGVGSMTMASGGGAPVADNNEGA
DGVGSSSGNWHCDSQWLGDREVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAY
FGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNG
VKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQ
AVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLY
YLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFA
WPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKV
MITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVY
LQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFIT
QYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGT
RYLTRNL

10. Supplemental Data

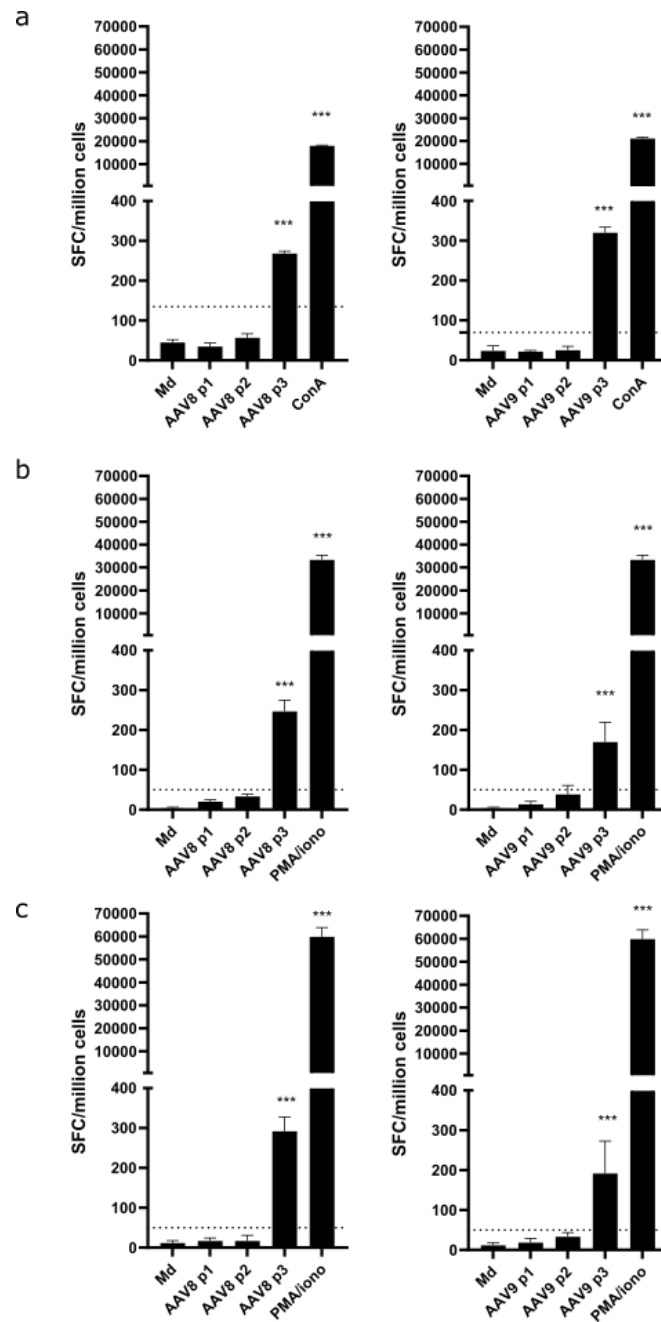


Figure S1: Comparison of the anti-AAV cellular immune responses detected by enzymatic ELISpot and Fluorospot. Anti-AAV IFN γ ELISpot responses were assessed after 36-48H-stimulation of whole PBMCs from donors with 3 pools of overlapping peptides (P1, P2, P3) covering the whole AAV8 or AAV9 capsid sequences. As negative control, PBMCs were cultured in medium alone (Md). Concanavaline A (Con A) or PMA/iono-stimulated PBMCs served as positive control. IFN γ secretion measurement against AAV peptides for one donor (a) by enzymatic ELISpot IFN- γ , (b) IFN γ /IL-2/TNF α Fluorospot and (c) IFN γ /IL-5/IL-10 Fluorospot.

Serotype	Donors with titers > 1/10	Donors tested	Percentage of positive donors	Median titer
AAV2	26	58	44.8%	1/5440
AAV8	30	58	51%	1/2560
AAV9	9	36	25%	1/1280

Table S1 : Summary of anti-AAV humoral immune responses in the cohort.

Etude I : Résultats préliminaires supplémentaires: Enrichissement et phénotypage des cellules sécrétant l'IFN- γ en réponse à l'AAV8

A. Contexte et objectifs

Afin d'approfondir l'étude présentée ci-dessus et de mieux caractériser la réponse anti-AAV8, nous avons voulu phénotyper les cellules sécrétant de l'IFN- γ en réponse à l'AAV. L'ELISpot ne permettant pas de récupérer les cellules dans ce but, nous avons utilisé une autre technique : le *cytokine capture assay* (cf. p96) dont le principe repose sur la capture des cellules sécrétrices d'IFN- γ après stimulation antigénique.

B. Matériel et méthodes

Les cellules anti-AAV IFN- γ^+ ont été phénotypées à l'aide d'un test de sécrétion de cytokines sur des PBMC congelées. L'essai a été réalisé en utilisant une banque de peptides chevauchants couvrant l'ensemble de la séquence de capsid d'AAV de sérotype 8, divisée en trois pools peptidiques (cf. p102). Après décongélation, les PBMC ont étéensemencées et restimulées 5h avec les pools de peptides de l'AAV8 à une concentration finale de 10 $\mu\text{g/mL}$. Le témoin négatif a consisté à incuber les cellules dans du milieu sans peptide. Après incubation, les cellules ont été marquées avec l'anticorps de capture anti-IFN- γ provenant du kit *Cell detection and enrichment assay* (Miltenyi) et incubées à nouveau pendant 45min à 37°C, 5%CO₂ sous agitation continue. Les PBMC ont été ensuite marquées avec un anticorps anti-IFN- γ de détection (lié au PE). Après lavages, les cellules IFN- γ^+ ont été enrichies à l'aide de billes immunomagnétiques recouvertes d'anticorps anti-PE sur des colonnes LS (Miltenyi Biotech) conformément aux instructions du fabricant. Après enrichissement, les cellules ont été marquées avec les réactifs suivants : eFluor 506 Fixable Viability Dye (eBiosciences), PerCP-Cy5.5 anti-CD3 (BD Biosciences), APC-H7 anti-CD4 (BD Biosciences), SB600 anti-CD8 (eBiosciences), Alexa Fluor 700- anti-CD14 (BD Biosciences), Alexa Fluor 700 anti-CD16 (BD Biosciences), Alexa Fluor 700 anti-CD19 (BD Biosciences), PE-Dazzle anti-CD45RA (Biolegend), et BV 786 anti-CCR7 (Biolegend). Les cellules ont été analysées sur un cytomètre FACS LSR II (BD Biosciences) et analysées avec le logiciel FlowJo (version 10, Tree Star Inc.). Pour le dénombrement des cellules marquées au PE, les LT CD3⁺ vivants ont été sélectionnés et les lymphocytes CD14⁺ CD16⁺ CD19⁺ ont été exclus. L'expression de CD45RA et CCR7 a ensuite été évaluée sur les LT PE⁺ CD4⁺ et CD8⁺.

C. Résultats

Dans le but de caractériser plus précisément les LT responsables de la sécrétion d'IFN- γ contre les pools de peptides AAV8, nous avons réalisé un test de sécrétion de cytokines pour les isoler et effectuer une analyse en cytométrie en flux (**Figure 28a**). Avant et après enrichissement, nous avons analysé le pourcentage de cellules IFN- γ^+ afin de valider l'enrichissement (**Figure 28b**), nous avons observé un enrichissement d'un facteur compris entre 6,5 et 181 (moyenne : 77).

Nous avons ensuite testé les PBMC de 6 donneurs positifs en ELISpot anti-AAV8 (pool 3), ils ont été incubés en présence de ce même pool pour réaliser le *capture assay*. Concernant les résultats obtenus, tout d'abord, nous avons analysé le ratio des LT CD4/CD8 sécrétant IFN- γ (**Figure 28c**). Nous avons observé une majorité de LT CD8 $^+$ parmi les cellules enrichies IFN γ^+ (rapport CD4:CD8 entre 0,19 et 0,9, médiane : 0,6) sauf dans un cas (rapport CD4:CD8=1,71) qui est conforme aux résultats obtenus par ELISpot IFN- γ (**Figure 3 de l'Etude I**). Pour déterminer le type de cellules mémoire responsables de cette sécrétion, nous avons analysé l'expression de CD45RA et de CCR7 parmi les lymphocytes T CD4 $^+$ et CD8 $^+$. Cette analyse nous permet de distinguer les sous-populations lymphocytaires TCM (CD45RA $^-$, CCR7 $^+$), TEM (CD45RA $^-$, CCR7 $^-$) et TEMRA (CD45RA $^+$, CCR7 $^+$). Parmi les LT CD4 $^+$ LT, nous avons observé que la sécrétion IFN- γ en réponse à une stimulation avec les peptides de l'AAV8 était principalement médiée par des lymphocytes TEM (entre 38,9 et 79,1% ; moyenne 57,1%) (**Figure 28d**). De la même manière, parmi les LT CD8 $^+$, nous avons observé que la sécrétion d'IFN- γ contre l'AAV8 était médiée par les lymphocytes TEM (entre 15 et 56%, moyenne : 39,4%) mais également par les lymphocytes T_{EMRA} (26,5 et 82,4 ; moyenne : 47,23%) (**Figure 28e**).

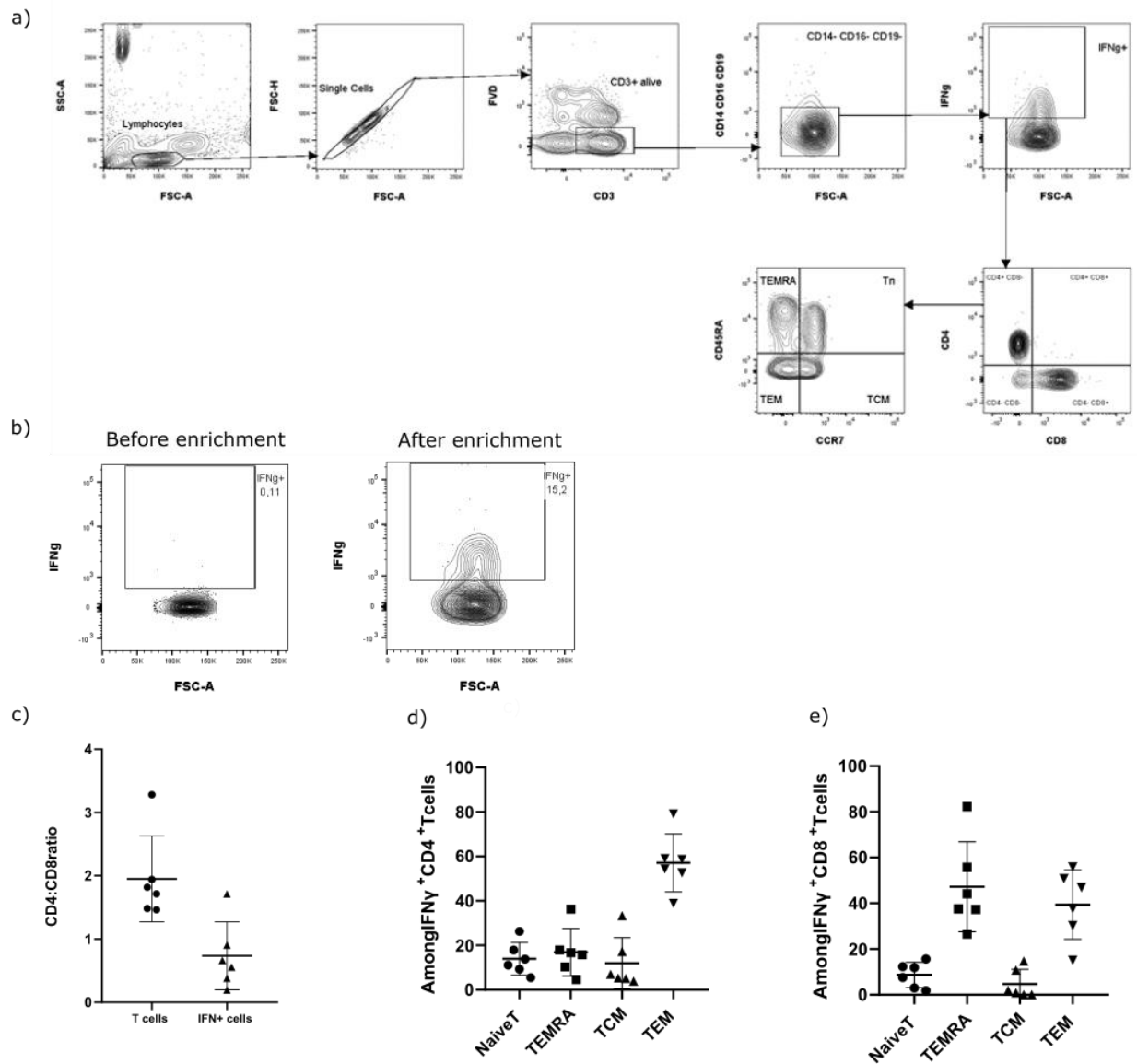


Figure 28 : Détection, enrichissement et phénotypage des LT $\text{IFN-}\gamma^+$ dans les PBMC après stimulation du pool peptidique AAV8.

Après 5h de stimulation avec le pool 3 de peptides de l'AAV8, des PBMC totaux ont été enrichis en cellules $\text{IFN-}\gamma^+$ et marquées pour analyse en cytométrie en flux. (a) Dot plot représentatifs obtenus avant et après enrichissement en cellules $\text{IFN-}\gamma^+$. Le pourcentage de cellules $\text{IFN-}\gamma^+$ parmi les LT est indiqué. (b) Stratégie d'analyse pour la détection des LT $\text{IFN-}\gamma^+$. Après exclusion des cellules mortes, la présence d' $\text{IFN-}\gamma^+$ a été évaluée parmi les cellules $\text{CD14}^- \text{CD16}^- \text{CD19}^- \text{CD3}^+$. Le phénotype des cellules $\text{IFN-}\gamma^+$ a été analysé par l'expression des CD4, CD8, CD45RA et CCR7. (c) Rapport CD4:CD8 parmi les LT totaux et les LT $\text{IFN}\gamma^+$. (d) Pourcentage de la sous-population de LT effecteurs parmi les lymphocytes T $\text{CD4}^+ \text{IFN}\gamma^+$. (e) Pourcentage de la sous-population de lymphocytes T effecteurs parmi les lymphocytes T $\text{CD4}^+ \text{IFN}\gamma^+$. TEM, LT effecteur mémoire ; TCM, LT mémoire centrale ; TEMRA ; LT mémoire effecteur réexprimant CD45RA ; Tn : LT naïf

D. Discussion

Le phénotypage des LT IFN- γ ⁺ après stimulation avec les peptides de l'AAV8 confirme que les LT CD8⁺ sont les principaux responsables de la sécrétion de IFN- γ contre les pools de peptides AAV8, cependant, des LT CD4⁺ sont également détectables. Ces derniers n'avaient pas été détectés en ELISpot IFN- γ , il est possible qu'ils secrètent trop peu ou qu'ils soient trop rares pour être détectés. Ces résultats ne sont toutefois pas surprenants car les LT CD4⁺ sécrétant de l'IFN- γ ont déjà été décrits par Li et al., après stimulation avec des peptides de la capsid de l'AAV2 (Li et al., 2011a). Parmi les LT CD4⁺ anti-AAV8, nous avons mis en évidence une majorité de lymphocytes TEM tandis que parmi les lymphocytes T CD8⁺ anti-AAV8, il y avait des lymphocytes TEM et T_{EMRA}. La majorité des LT sécrétant l'IFN- γ en réponse aux peptides de l'AAV8 sont donc bien des cellules mémoire comme attendu. La présence de T_{EMRA} confirme les résultats présentés et discutés en partie II qui établit une corrélation entre le pourcentage de cellules T_{EMRA} parmi LT anti-AAV8 (isolées par enrichissement des tétramères) et la sécrétion de IFN- γ en réponse aux pools peptidiques AAV8 (évalués par IFN γ ELISpot) (p.135).

En résumé :

- **La prévalence de la réponse cellulaire préexistante anti-AAV9 est la plus élevée, suivie par l'anti-AAV8 et l'anti-AAV2.**
- **La réponse cellulaire préexistante anti-AAV2, anti-AAV8 et anti-AAV9 est majoritairement médié par les LT CD8⁺. Dans le cas de l'AAV9, une réponse des LT CD4⁺ est tout de même détectée chez certains donneurs.**
- **Les LT sécrétant de l'IFN- γ en réponse à l'AAV8 peuvent sécréter de l'IL-2 et/ou du TNF- α selon les donneurs mais pas d'IL-5 ni d'IL-10.**
- **Les LT sécrétant de l'IFN- γ en réponse à l'AAV9 peuvent sécrètent également du TNF- α mais pas d'IL-2, d'IL-5 ou d'IL-10.**
- **Les LT CD8⁺ sécrétant de l'IFN- γ en réponse à l'AAV8 sont majoritairement des TEM et des TEMRA.**
- **Les LT CD8⁺ sécrétant de l'IFN- γ en réponse à l'AAV8 sont majoritairement des TEM.**

Etude II : “Tetramer-based enrichment of preexisting anti-AAV8 CD8⁺ T cells in human donors allows the detection of a TEMRA subpopulation”

Tetramer-based enrichment of preexisting anti-AAV8 CD8⁺ T cells in human donors allows the detection of a T_{EMRA} subpopulation

Céline Vandamme^{1,3,#}, Rebecca Xicluna^{1,#}, Leslie Hesnard², Marie Devaux¹, Nicolas Jaulin¹, Mickaël Guilbaud¹, Johanne Le Duff¹, Célia Couzinié¹, Philippe Moullier¹, Xavier Saulquin^{2*} and Oumeya Adjali^{1*}

¹ INSERM UMR 1089, Université de Nantes, CHU de Nantes, Nantes, France

² CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

³Current Adress: University of Eastern Finland, Department of Clinical Microbiology, Kuopio, Finland

#Céline Vandamme and Rebecca Xicluna contributed equally to this work.

*** Correspondence:**

Oumeya Adjali MD PhD - INSERM UMR 1089

oumea.adjali@univ-nantes.fr

Xavier Saulquin PhD-INSERM UMR 1232

xavier.saulquin@univ-nantes.fr

Keywords: AAV, gene therapy, immune response, CD8⁺ T lymphocytes, gene therapy, tetramer-associated magnetic enrichment

Abstract

Pre-existing immunity to AAV capsid may compromise the safety and efficiency of rAAV-mediated gene transfer in patients. Anti-capsid cytotoxic immune responses have proven to be a challenge to characterize because of the scarcity of circulating AAV-specific CD8⁺ T lymphocytes which can seldom be detected with conventional flow cytometry or ELISpot assays. Here, we used fluorescent MHC class I tetramers combined with magnetic enrichment to detect and phenotype AAV8-specific CD8⁺ T cells in human PBMCs without prior amplification. We showed that all healthy individuals tested carried a pool of AAV8-specific CD8⁺ T cells with a CD45RA⁺ CCR7⁻ terminally-differentiated effector memory cell (T_{EMRA}) fraction. *Ex vivo* frequencies of total AAV-specific CD8⁺ T cells were not predictive of IFN γ ELISpot responses but interestingly we evidenced a correlation between the proportion of T_{EMRA} cells and IFN γ ELISpot positive responses. T_{EMRA} cells may then play a role in recombinant AAV-mediated cytotoxicity in patients with preexisting immunity. Overall, our results encourage the development of new methods combining increased detection sensitivity of AAV-specific T cells and their poly-functional assessment to better characterize and monitor AAV capsid-specific cellular immune responses in the perspective of rAAV-mediated clinical trials.

1. Introduction

Over the past decade, recombinant adeno-associated virus-derived vectors (rAAV) have emerged as a powerful vector platform for *in vivo* gene delivery. With over a hundred gene therapy clinical trials worldwide, sustained therapeutic effect has been achieved in the frame of a variety of inherited diseases such as Leber's congenital amaurosis type 2^{1,2}, haemophilia B³, M-type α -1 antitrypsin deficiency⁴ or lipoprotein lipase deficiency⁵. Already three different AAV-based gene therapy products have received market approval (Glybera⁶, Luxturna⁷, Zolgensma⁸). Nevertheless, all these successes have been tempered by rising concerns over the immunogenicity of the AAV capsid in patients, especially when the vector was delivered *via* a systemic route.

Adeno-Associated Viruses (AAV) are small, non-enveloped, DNA dependo-viruses belonging to the *Parvoviridae* family. Though widely disseminated among the human population⁶, wild-type (WT) AAV human infection has not been clearly associated to clinical outcome. Seroprevalence studies have indicated that initial exposure to WT AAV often occurs early during childhood^{7,8}, when humoral and cellular immune responses directed against the AAV capsid might be mounted^{9,10}. As such, memory AAV-specific T and B cells might be retained throughout lifetime and recalled upon rAAV-mediated gene transfer. While the prevalence of anti-AAV antibodies among the human population is widely studied today¹¹, and their impact on rAAV-mediated gene transfer is fairly well documented¹², the detection and characterization of AAV-specific T cell responses remain somewhat more of a challenge even if this issue was first addressed more than 15 years ago¹³.

Deleterious effects of anti-AAV cellular immune responses were first evidenced in a liver-directed gene transfer clinical trial for severe hemophilia B patients, where an AAV serotype 2 (AAV2) vector carrying the coagulation factor IX transgene was administered *via* the intrahepatic route⁹. In this study, gradual loss of factor IX transgene expression correlated with transient rise in liver transaminase levels and increase in the frequency of AAV-specific CD8⁺ T lymphocytes¹⁰. Those observations were further confirmed in the same clinical indication when the AAV8 serotype was administered intravenously¹¹. Tremendous amount of work has been done to understand the underlying mechanisms of AAV capsid-specific CD8⁺ T cell cytotoxicity. The current working model states that upon rAAV administration, transduced hepatocyte cells are able to process and present capsid-derived epitopes onto

major histocompatibility class I (MHC I) molecules. Those peptide-MHC (p-MHC) complexes serve as docking sites for recognition by memory capsid-specific CD8⁺ T cells which then activate and expand, leading to the destruction of the transduced cells¹². Notwithstanding, it is still currently impossible to predict the onset of AAV-specific CD8⁺ T cell responses in patients and their clinical impact as positive ELISpot responses don't always correlate with loss of transgene expression³. One can put forward three main reasons for these limitations: (1) The absence of a relevant animal model recapitulating what is observed in patients; (2) An outcome shown to be variable between individuals and potentially dependent on the target tissue (*i.e.* liver *versus* skeletal muscle) and route of rAAV delivery; and more importantly (3) The difficulty to monitor AAV-specific CD8⁺ T cells *ex vivo* without prior amplification of PBMCs or splenocytes because of their scarcity leading to a lack of data on their phenotype and functionality.

As recent technological breakthroughs now allow direct *ex vivo* assessment of even scarce antigen-specific CD8⁺ T cell populations, we first addressed the issue of detecting low capsid-specific CD8⁺ T cell frequencies. We applied a p-MHC tetramer-based enrichment approach (later referred to as TAME, for Tetramer-Associated Magnetic Enrichment)^{13,14}, with a flow cytometry-based read out, to analyze the presence and frequency of AAV-specific CD8⁺ T cells within the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy donors. We were able to detect AAV-specific CD8⁺ T cells in a large cohort of donors and we further identified among them a subset of CD45RA⁺ CCR7⁻ terminally-differentiated effector memory cells (T_{EMRA}). After flow cytometric cell sorting we generated primary AAV8-specific CD8⁺ T cell lines that were able to secrete IFN γ , TNF α as well as mediate cytotoxicity towards capsid-loaded targets *in vitro*. Importantly, there was no correlation between anti-AAV IFN γ ELISpot responses and *ex vivo* frequency of total AAV8-specific CD8⁺ T cells, suggesting that frequency of capsid-reactive T cells is not predictive of their functionality. However, we found a correlation between T_{EMRA} frequencies and IFN γ ELISPOT positive responses indicating that T_{EMRA} cells may play a role in recombinant AAV-mediated cytotoxicity in patients with preexisting immunity. In conclusion, our data emphasize the development of new methods combining increased detection sensitivity of AAV-specific T cells and their poly-functional assessment, to better understand capsid-specific cellular immune responses and ultimately predict their impact in rAAV-mediated clinical trials.

2. Material and Methods

All this work was performed under the control of our quality management system that is approved by Lloyd's Register Quality Assurance LRQA to meet requirements of international Management System Standards ISO 9001:2015. It has been implemented to cover all activities in the laboratory, including research experiments and production of research-grade viral vectors.

Vector production

For ELISA and neutralization assays, single-stranded AAV serotypes 2 and 8 vectors were produced by the vector core facility in Nantes (<https://umr1089.univ-nantes.fr/plateaux-technologiques/cpv/>). Vectors were produced through co-transfection of Human Embryonic Kidney 293 cells, purified by cesium-chloride gradient, and titrated by dot plot and quantitative PCR assays. For rAAV vectors used in neutralization assays, the vector plasmid contained the LacZ reporter transgene.

Donor samples

Cytapheresis samples were provided by the local Etablissement Français du Sang (EFS Nantes, Pays de la Loire, agreement N° PLER NTS 2016-25) and originated from consenting healthy donors living in the surrounding area (4 women, 61 men). Median age was 46.5 years old (min: 20; max: 72). Plasma were obtained by centrifuging undiluted cytapheresis samples, and were stored at -80°C. PBMCs were obtained by Ficoll density gradient centrifugation (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare). A fraction of PBMCs was frozen in liquid nitrogen for ELISpot assays, while remaining fresh PBMCs were used for tetramer-based enrichment. HLA-A2 or HLA-B7 phenotyping of PBMCs was performed by flow cytometry using FITC-conjugated anti-HLA-A2 (clone BB7.2, BD Biosciences) or FITC-conjugated anti-HLA-B7 (clone BB7.1, Bio-Rad) antibodies.

Peptides and peptide/MHC (pMHC) tetramer complexes

HLA-A2- and HLA-B7-restricted peptides were purchased from GL Biochem (Singapore) (**Table S1**). Immunodominant peptides (LIDQYLYYL and IPQYGYLTL) were provided by Proteogenix (France). Biotinylated A2- or B7-soluble MHC class I monomers loaded with conditional ligands¹⁵ were produced by the Plateforme de Protéines Recombinantes (P2R,

Nantes, France). Biotinylated A2- or B7- soluble monomers loaded with AAV2 or AAV8 capsid-derived peptides were obtained through UV-mediated peptide exchange as previously described¹⁵. Oligomerization of pMHC monomers was performed with PE- or APC-labelled tetramer-grade streptavidin (PJRS27, Prozyme and BD Biosciences *resp.*) during 1 hour at 4°C, at a molar ratio of 4:1, to form low-order oligomers referred to as “tetramers”.

Tetramer-based enrichment protocol

2×10^8 freshly isolated PBMCs were incubated with a mix containing 100 μ L of AAV capsid-specific PE-conjugated tetramers (20 μ g/mL) and 100 μ L of irrelevant APC-conjugated tetramers (20 μ g/mL). After washes, tetramer-stained cells were enriched using anti-PE antibody-coated immunomagnetic beads on LS columns (Miltenyi Biotech) according to manufactured instructions. After enrichment, cells were stained with an antibody panel that is summarized in **Table S2**. Counting beads (123count eBeads, eBioscience) were used to normalize results. Cells were acquired on a FACS Fortessa X20 cytometer, a FACS LSR II cytometer or a FACS Aria III sorter (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (version 10, Tree Star Inc.). For PE-labelled Tetramer⁺ CD8⁺ T cell detection and phenotyping, CD3⁺ CD8⁺ CD4⁻ T cells were gated on single live dump⁻ (CD14⁻ CD16⁻ CD19⁻) cells. CD45RA, CD45RO and CCR7 expression was then assessed on PE⁺ APC⁻ CD8⁺ T cells.

Cell sorting and T-cell lines

A2- or B7-restricted AAV8-specific CD8⁺ T cells were obtained after sorting PE-conjugated Tetramer⁺ CD8⁺ T cells with a FACS Aria III sorter (BD Biosciences). Cells were then expanded *in vitro* under nonspecific conditions using rIL-2 (300 UI/mL, Novartis), phytohemagglutinin (PHA, 1 μ g/mL, Sigma-Aldrich), irradiated PBMCs and B lymphoblastoid cells as previously described¹⁴. T cell lines were maintained for 3 weeks without restimulation in RPMI 1640 medium containing 1mM L-glutamine (Lonza), and supplemented with 10% FCS (Pierce-Hyclone) and 300 UI/mL rIL-2, before analysis. Additional rounds of amplification were performed with the same conditions if needed. Purity and specificity of CD8⁺ T cell lines were checked through staining with AAV8 capsid-specific PE-conjugated tetramers and irrelevant APC-conjugated tetramers.

Cytokine secretion analysis

To assess degranulation activity and cytokine expression of human primary A2- or B7-restricted AAV8-specific CD8⁺ T cell lines, A2⁺ TAP-deficient T2 cells or B7⁺ 7221.221 cells were loaded overnight at 37°C with 10 µg/mL of irrelevant peptides, or with A2- or B7-restricted AAV8 capsid-derived peptides (the same peptides used for TAME). A2- or B7-restricted AAV8-specific CD8⁺ T lymphocytes were then added at an effector / target *ratio* of 1/1. Effector and target cells were then incubated 4 hours at 37°C in presence of anti-CD107a and anti-CD107b antibodies (clones H4A3 and H4B4 *resp.*, BD Biosciences) and 5 µM of monensin sodium (Sigma-Aldrich). As a positive control, effector cells were stimulated with 10 ng/mL PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma) and 250 ng/mL Ionomycin (Sigma). After incubation, cells were stained with eFluor 506-conjugated FVD and eFluor 605-conjugated anti-CD8. Cells were then fixed with PFA 1% (EMS) overnight at 4°C, and permeabilised with permeabilisation buffer (eBioscience). Finally cells were stained with PE-conjugated anti-IFN γ (clone B27, BD Biosciences) and APC-conjugated anti-TNF α antibodies (clone Mab11, BD Biosciences). Analysis was performed using a FACS Fortessa X20 or a FACS LSR II cytometer. For quantification of degranulation activity, CD107 expression was assessed on single live CD8⁺ T lymphocytes. For quantification of cytokine secretion, IFN γ and TNF α secretion was assessed on single live CD8⁺ T lymphocytes. Each cell line was assessed through 3 independent activation assays.

Cytotoxic Assay

To assess cytotoxic activity of human primary A2-restricted AAV8-specific CD8⁺ T cell lines, lactate dehydrogenase (LDH) release following target cell lysis was measured with CytoTox 96® non-radioactive cytotoxicity assay (Promega). 5x10⁵ A2⁺ TAP-deficient T2 cells were loaded as described for functional assays. AAV8-specific CD8⁺ T lymphocytes were then added at an effector : target *ratio* of 5:1, 10:1 and 20:1. Effector and target cells were then incubated 4 hours at 37°C and LDH release was measured after 4 hours of incubation at 37°C. Target cell maximum LDH release was measured by adding medium with 1% triton. Each condition was made in triplicate. Medium background was subtracted from measurement and lysis percentage were calculated as follow:

% cytotoxicity = (Experimental – Effector spontaneous - Target spontaneous)/(Target Max – Target spontaneous) x100

CD4⁺ or CD8⁺ depletion

CD4⁺ or CD8⁺ T cells have been depleted from total PBMCs using Stem Cell magnetic-based system (Easy Sep St Easy Sep Stem Cell kits #17852 and #17853) according to manufacturer instructions. Then, efficiency of depletion have been controlled by BD LSR II flow cytometer using anti-CD4 APC-H7 (BD Biosciences, #560251) and CD8 eFluor 605 (eBiosciences, #93-0088-42).

IFN γ ELISpot assay

Anti-AAV2 and anti-AAV8 cellular immune responses were evaluated with an IFN γ ELISpot assay using overlapping peptide libraries covering the whole AAV2 or AAV8 capsid sequences (15 per 10 mers, PEPscreen, Sigma) split into three peptide pools each. MultiScreenHTS filter plates, with polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Millipore) were coated overnight at 4°C with human anti-IFN γ antibody (clone MT126L, Mabtech). After coating, 2×10^5 cells per well were plated and restimulated 48H with AAV2- or AAV8-derived peptide pools at a final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Medium alone served as negative control, while cells stimulated with concanavalin A (Con A, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SIGMA) served as a positive control. After incubation with a biotinylated anti-IFN γ antibody (clone 7-B6-1, MabTech) and Streptavidin-ALP (MabTech), enzymatic reaction was revealed using NBT/BCIP (MabTech). Spot number was determined using an ELISpot *iSpot* Spectrum reader (AID, Strassberg, Germany) and analysed with AID ELISpot reader Software V7.0 (AID, Germany). Responses were considered positive when the number of spot-forming colonies per million cells was > 50 and at least threefold higher than the medium alone negative control. For positive responses, statistical analyses were performed using a DFR(2x) test (Distribution Free Resampling).

3. Results

AAV2- and AAV8-specific CD8⁺ T cells are detectable in peripheral blood after *ex vivo* tetramer enrichment.

Due to their low frequencies, detection of AAV-specific CD8⁺ T lymphocytes often requires prior amplification (or stimulation) of PBMCs or splenocytes^{10,16–18}, a process which might induce some bias in the frequency or phenotype of those cells. To circumvent this limitation, we evaluated Tetramer-Associated Magnetic Enrichment (TAME), a flow cytometry-based method that can rapidly and efficiently detect scarce subpopulations of CD8⁺ T cells *ex vivo*^{13,14}. We first proved the technical feasibility of this strategy in our hands using HLA-A*0201 tetramers loaded with the Melan-A tumor-associated antigen ELAGIGILTV (pELA/A2). While Melan-A-specific CD8⁺ T cells displayed frequencies too low to be detected *ex vivo* through conventional tetramer flow cytometry assay, we were able to systematically detect them after TAME in a cohort of 31 HLA-A2⁺ donors, at frequencies ranging from 35 to 2600/10⁶ total CD8⁺ T cells (median: 124/10⁶ total CD8⁺ T cells) (**Figure S1**).

As AAV2 was shown to be the most seroprevalent serotype in humans¹⁹, and HLA-A2 the most prevalent allele among the Caucasian population²⁰, we first investigated the peripheral CD8⁺ T cell repertoire reactivity towards AAV2 capsid-derived peptides restricted to HLA-A*0201 allele (referred to as pAAV2/A2, p for pooled peptides) (**Table S1**). For that purpose, we used soluble phycoerythrin (PE)-labelled pAAV2/A2 tetramers obtained with a previously described UV-mediated peptide exchange technology¹⁵. Thirteen A2-restricted AAV2 capsid peptides were selected using bioinformatical prediction databases tetramer. PBMCs isolated from A2⁺ donors were stained with pAAV2/A2 tetramers (13 tetramers pooled together), enriched with anti-PE para-magnetic microbeads and analyzed through flow cytometry (**Fig. 1A** for gating strategy; **Fig.1B** for an example of enrichment). Following TAME, we were able to readily detect CD8⁺ T cells stained with pAAV2/A2 tetramers *ex vivo* in all A2⁺ donors tested (n =15, **Fig. 2A**). Staining with an irrelevant allophycocyanin (APC)-labelled tetramer confirmed the specificity of pAAV2/A2 tetramer staining, as in all assays, less than 0.1% of PE⁺ APC⁺ CD8⁺ T cells could be seen (**Fig. 1C** for a representative staining). Absolute numbers of AAV2-specific CD8⁺ T cells were determined to calculate their *ex vivo* frequencies and ranged from 1.2 to 80/10⁶ total CD8⁺ T cells in donors (median: 14/10⁶ total CD8⁺ T cells) (**Fig. 2A**), which is in the range of previously described T cell repertoires directed against some viral or tumoral antigens found in healthy donors^{13,14}.

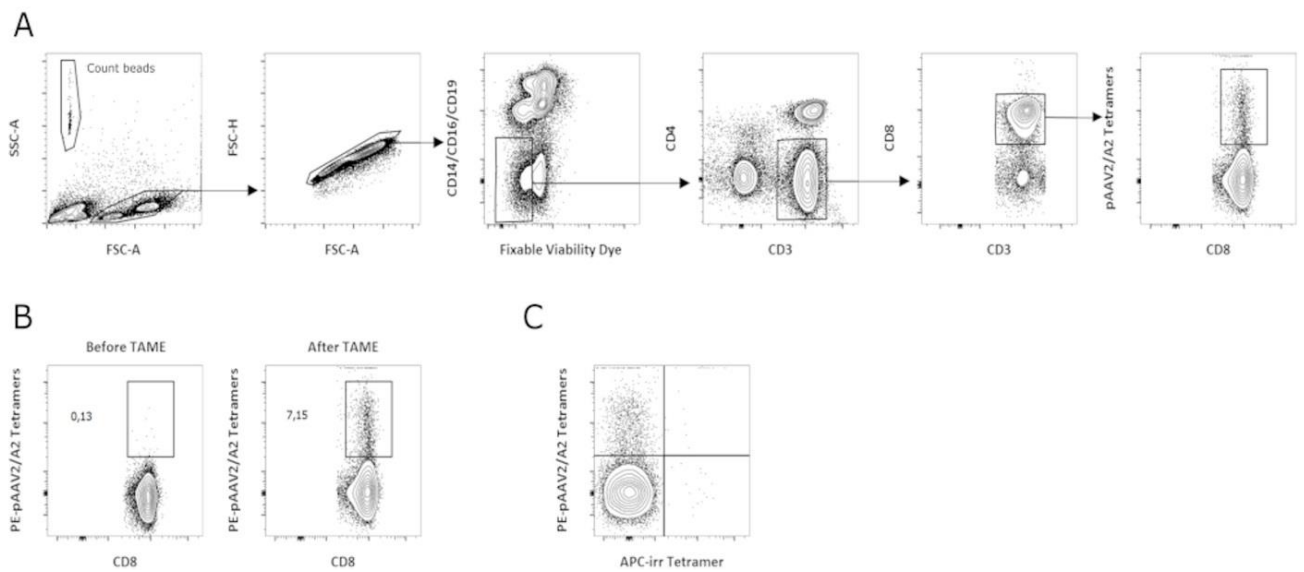


Figure 1: Detection of AAV2-specific CD8⁺ T lymphocytes in PBMCs from A2⁺ donors. (A) Gating strategy for the detection of p-MHC tetramers⁺CD8⁺ T cells *ex vivo*. Tetramer enrichments were performed on freshly isolated PBMCs. After exclusion of dead cells, PE-Tetramers⁺ events were assessed within the CD14⁻ CD16⁻ CD19⁻CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺ compartment. A representative staining following pAAV2/A2 tetramer enrichment is shown. PE: phycoerythrin. Count beads (123count eBeads, eBioscience) were used to normalize results. (B) Representative dot plots obtained before and after tetramer enrichment with pAAV2/A2 complexes. Analyses were performed on CD8⁺ T cells after gating as described above. Percentages of PE-Tetramers⁺ cells among total CD8⁺ T cells obtained before and after tetramer enrichment are indicated. (C) Representative dot plot showing the specificity of tetramer staining after tetramer enrichment with pAAV2/A2 complexes. Analyses were performed after gating as described above. An irrelevant APC-conjugated A2-restricted tetramer (APC-irr tetramer) was used as a specificity control. APC: allophycocyanin.

Following this proof of concept, we moved for the rest of the study to the AAV8 serotype as it is today a clinically relevant serotype in muscle- and liver-directed systemic gene transfer²¹. Peripheral CD8⁺ T cell repertoire reactivity towards AAV8 capsid-derived antigens restricted by the HLA-A*0201 or HLA-B*0702 alleles (referred to as A2 or B7 respectively) was studied in healthy donors expressing at least one of those alleles. Using the same strategy described above, we constituted a pool of 9 pAAV8/A2 tetramers and a pool of 12 AAV8/B7 tetramers (notably containing the previously described HLA B7-restricted AAV8 epitope¹⁰ (**Table S1**) to identify AAV8-specific CD8⁺ T lymphocytes within the PBMCs of A2⁺ or B7⁺ healthy donors, respectively. Once again, following TAME, we were able to detect CD8⁺ T cells stained with pAAV8/A2 or pAAV8/B7 tetramers in all A2⁺ and B7⁺ donors tested without any amplification or stimulation of PBMCs beforehand. Specificity

of the staining was systematically confirmed using irrelevant APC-labelled tetramers. *Ex vivo* frequencies of AAV8-specific CD8⁺ T cells ranged from 0.3 to 920/10⁶ total CD8⁺ T cells in A2⁺ donors (median: 17/10⁶ total CD8⁺ T cells, n=38), and from 5 to 570/10⁶ total CD8⁺ T cells in B7⁺ donors (median: 57/10⁶ total CD8⁺ T cells, n=27) (**Fig. 2B**). Of note, AAV8-specific CD8⁺ T cells tended to be more frequent in B7⁺ donors than A2⁺ samples, although statistical significance wasn't reached (Anova one way: p=0,7653).

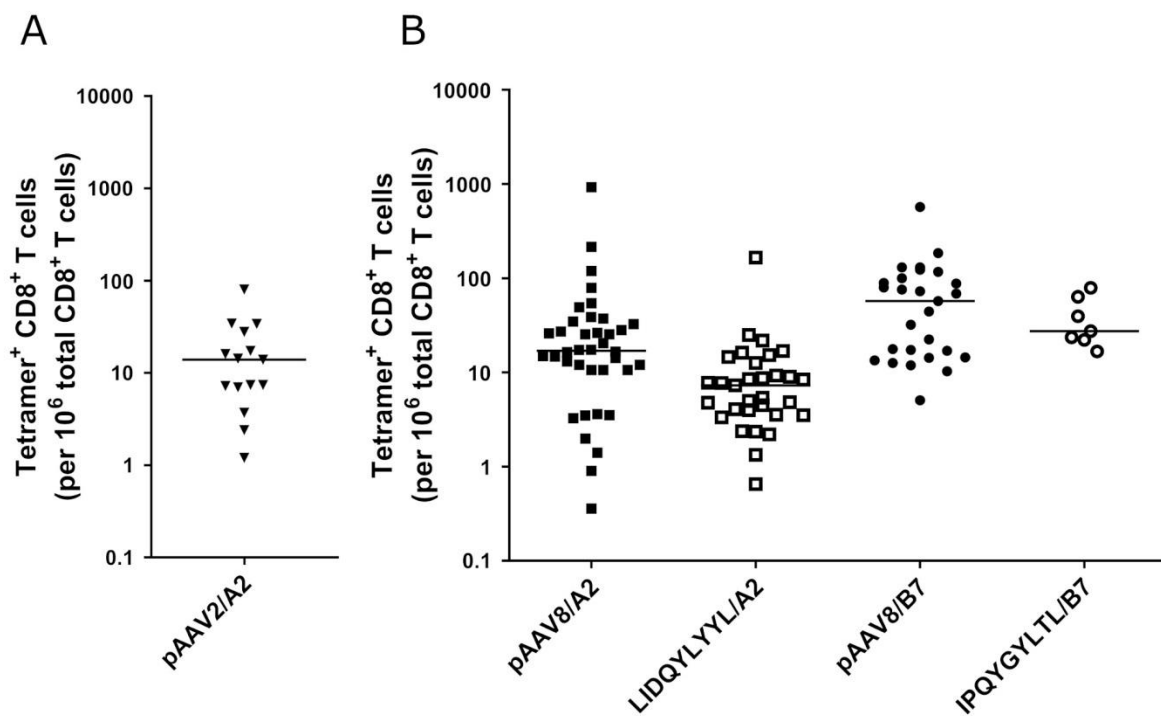


Figure 2: Detection of AAV2- and AAV8-specific CD8⁺ T lymphocytes in PBMCs from A2⁺ and B7⁺ donors. (A) *Ex vivo* frequencies of pAAV2/A2 tetramers⁺ CD8⁺ T lymphocytes in A2⁺ donors. (B) *Ex vivo* frequencies of pAAV8/A2, LIDQYLYYL/A2 (HLA-A2 restricted immunodominant peptide), pAAV8/B7 and IPQYGYLTL/B7 (HLA-B7 restricted immunodominant peptide) Tetramers⁺ CD8⁺ T lymphocytes in A2⁺ and B7⁺ donors. *Ex vivo* frequencies of AAV2- and AAV8-specific CD8⁺ T cells were calculated by dividing the absolute number of PE-Tetramer⁺ CD8⁺ T cells, detected after tetramer enrichment, by the absolute number of total CD8⁺ T cells. Results are represented as the number of tetramers⁺ CD8⁺ T cells per 10⁶ total CD8⁺ T cells. Horizontal bars refer to median values. Each symbol represents an individual: n=15 for pAAV2/A2, n=38 for pAAV8/A2, n=31 for LIDQYLYYL/A2, n=27 for pAAV8/B7 and n=7 for IPQYGYLTL/B7. Statistical analysis: Anova one-way, non significant.

We further assessed the frequency of CD8⁺ T cells specific for the previously described immuno-dominant A2-restricted LIDQYLYYL and B7-restricted IPQYGYLTL peptides^{15, 30}. These peptides were used to construct PE-labelled tetramers for TAME on PBMCs from A2⁺ or B7⁺ healthy donors, respectively. Similar to our previous results using pooled tetramers with various peptide specificities, we were again able to detect AAV8-specific CD8⁺ T cells stained with single tetramers in all donors, although at slightly lower frequencies: 0.653 to 166/10⁶ total CD8⁺ T cells in A2⁺ donors (median: 7.3/10⁶ total CD8⁺ T cells, n=31) and 16 to 78.8/10⁶ total CD8⁺ T cells in B7⁺ donors (median: 27.4/10⁶ total CD8⁺ T cells, n=7) (**Fig. 2B**).

Overall, we evidenced that all healthy donors tested possessed circulating AAV2 or AAV8-specific CD8⁺ T cells, though at very low frequencies among PBMCs, and that TAME is a suitable and feasible method to allow their *ex vivo* detection, even though it does not provide any functional insight.

Human primary AAV8-specific CD8⁺ T cells expanded *in vitro* secrete pro-inflammatory cytokines and can specifically mediate cytotoxicity

In order to investigate the functional properties of AAV8-specific CD8⁺ T cells, tetramer positive CD8⁺ T cells were sorted by flow cytometry after TAME and expanded *in vitro* from PBMCs of A2⁺ or B7⁺ donors. Indeed, low cell numbers were obtained following cell TAME-based enrichment and sorting and did not allow *in vitro* functional assays before amplification. The purity of all tetramer-sorted CD8⁺ T cell lines after expansion was assessed by pAAV8/A2 or pAAV8/B7 tetramer staining and was comprised between 80 and 99%, except for 2 T cell lines with a purity of 71 and 72 %, respectively (**Fig. 3A** for representative A2⁺ and B7⁺ tetramer staining on expanded T cell lines; **Table 1** for overall summary). AAV8-specific CD8⁺ T cell lines were tested for their functionality in the presence of A2⁺ or B7⁺ target cells loaded with AAV8 peptides *versus* irrelevant peptides. The percentage of CD8⁺ effector cells expressing degranulation marker CD107, or secreting IFN γ and TNF α was analyzed by flow cytometry (**Fig. 3B and 3C**) for representative responses; **Table 1** for overall results). Each T cell line was assessed through 3 independent activation assays. Responses were considered positive when the percentage of CD8⁺ effector cells expressing CD107, IFN γ and TNF α was statistically higher in response to AAV8-loaded target cells than in response to target cells loaded with an irrelevant peptide (**Fig. 3C**). Out of the 12 cell lines

tested, 11 showed significant upregulation of activation markers upon incubation with AAV8-loaded target cells. Of note, these markers correlated well with each other, as virtually all cells upregulating CD107 also expressed IFN γ and TNF α . For 3 T cell donors, we also investigated the cytotoxic activity of AAV8-specific CD8⁺ T cell lines using LDH measurement (**Fig 3D**). Each AAV8-specific CD8⁺ T cell line was tested with 2 different effector:target ratio: 5:1 and 10:1. AAV8-specific CD8⁺ T cell lines were able to mediate cytotoxicity specifically in response to AAV8 peptide-loaded target cells and not against irrelevant peptide loaded target cells. Overall, these results indicate that *in vitro* expanded tetramer positive CD8⁺ T cells can secrete pro-inflammatory cytokines and mediate cytotoxicity against target cells loaded with AAV8 peptides.

Cell Lines	HLA restriction	Purity ^a	<i>In vitro</i> functional responses	
			Activation ^b	IFN γ ^c
4374	HLA-A2	84 %	Positive	Negative
3179		87 %	Positive	Negative
4800		79.4%	Positive	Negative
9946		98.9 %	Positive	Negative
6062		91.1 %	Positive	Negative
8279		99,3%	Positive	Negative
3654	HLA-B7	97.4 %	Positive	Negative
2367		84.5 %	Positive	Positive
5576		99.2 %	Negative	Negative
8860		71.1 %	Positive	Negative
7043		82.1 %	Positive	Positive
6714		72.2 %	Positive	Positive
Total			11/12	3/12

Table 1: Overview of *in vitro* functional responses obtained from primary AAV8-specific CD8⁺ T cell lines derived from PBMCs of A2⁺ and B7⁺ donors.

^a Purity of pAAV8 tetramer-sorted CD8⁺ T cell lines was assessed through staining with relevant tetramers right before functional assessment.

^b Activation of AAV8-specific CD8⁺ T cell lines was assessed through flow cytometry-based degranulation assay monitoring the upregulation of CD107 expression, IFN γ and TNF α secretion in response to AAV8-loaded target cells.

^c The last column represents IFN γ ELISpot responses assessed on whole PBMCs from which the AAV8-specific CD8⁺ T cell lines were derived.

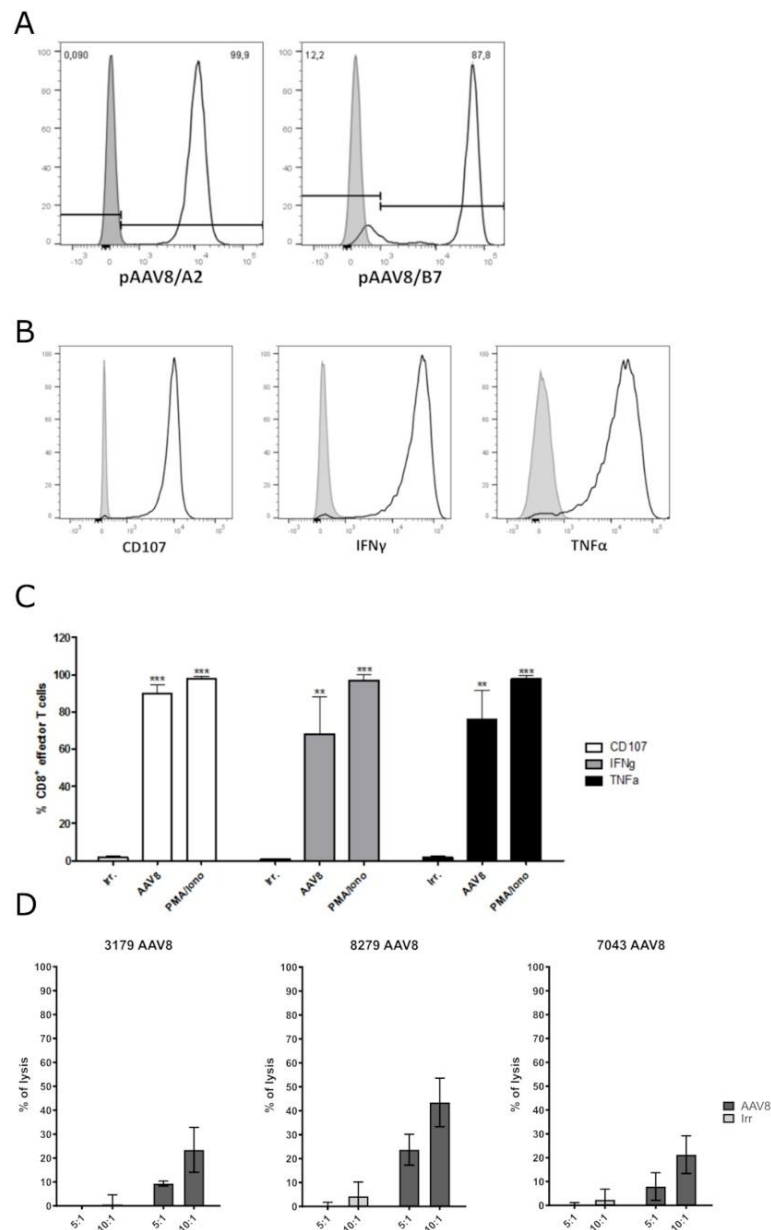


Figure 3: Functional assessment of primary AAV8-specific CD8⁺ T cell lines derived from A2⁺ or B7⁺ donors. (A) Representative histograms of pAAV8/A2 or pAAV8/B7 tetramer staining of AAV8-specific CD8⁺ T cell lines generated from A2⁺ or B7⁺ donors. AAV8-specific CD8⁺ T cell lines were stained with relevant (white) or irrelevant (grey) tetramers. The list of all AAV8-specific CD8⁺ T cell lines generated and their purity are indicated in Table 3. (B) Representative histograms of AAV8-specific CD8⁺ T cell lines

activation. CD107 expression, IFN γ secretion and TNF α secretion were assessed by flow cytometry on AAV8-specific CD8 $^+$ T cell lines after 4H of coculture with target cells loaded with AAV8 peptides (light grey) or irrelevant peptides (dark grey). (C) Representative quantification of AAV8-specific CD8 $^+$ T cell lines activation. Each cell line was assessed through 3 independent activation assays. Results are represented as the mean percentage of AAV8-specific CD8 $^+$ T cells expressing CD107, IFN γ and TNF α in response to target cells loaded with AAV8 peptides (AAV8) or irrelevant peptides (Irr.). Stimulation with PMA/Ionomycin (PMA/Iono) served as positive control. AAV8-specific CD8 $^+$ T cells were considered activated when they expressed a statistically significant higher amount of CD107, IFN γ and TNF α in response to AAV8-loaded target cells. Statistical significance was determined using an unpaired t-test. ***: $p < 0.001$. Overall activation profiles are shown in Table 3. (D) Representative quantification of AAV8-specific CD8 $^+$ T cell lines cytotoxicity. Each cell line was assessed for cytotoxicity through LDH measurement. Results are represented as the percentage of lysis of target cells loaded with AAV8 peptides (AAV8) or irrelevant peptides (Irr.) by AAV8-specific CD8 $^+$ T cells for different effector:target ratio (5:1 and 10:1).

AAV8-specific CD8 $^+$ T cells detected *ex vivo* contain a T_{EMRA} effector memory subset

Since CD8 $^+$ T cell capsid specificity was demonstrated using amplified cells, we further characterized AAV8-specific CD8 $^+$ T cell phenotype immediately after TAME and without the bias of prior amplification. For that purpose, we assessed the expression of CD45RA, CD45RO and CCR7 T cell markers by flow cytometry. We first observed that virtually all AAV8-specific CD8 $^+$ T cells were CD45RA $^+$ CD45RO $^-$ (**Figs. 4A lower panel and 4B**). In contrast, total polyclonal CD8 $^+$ T cells displayed a pool of CD45RO $^+$ conventional memory cells, validating the anti-CD45RO antibody staining (**Fig. 4A, upper panel**). To distinguish between the naïve and terminally differentiated effector memory (T_{EMRA}) phenotypes among capsid specific CD45RA $^+$ CD45RO $^-$ T cells, we next looked at the expression of CCR7 (**Figs. 4A and 4B, right panels**). CD45RA $^+$ /RO $^-$ CCR7-positive naïve cells ranged from 53.84% to 90.19% (73.98 % \pm 11 SD) of total AAV8-specific CD8 $^+$ T cells, while CD45RA $^+$ CD45RO $^-$ CCR7-negative T_{EMRA} cells ranged from 4.54% to 29.24% (11.59 % \pm 7.5 SD) of total AAV8-specific CD8 $^+$ T cells. We therefore concluded that while most of the AAV8-specific CD8 $^+$ T cells detected *ex vivo* had a naïve phenotype, all donors also displayed a subset of antigen-primed T_{EMRA} cells, a phenotype known to be associated with chronic viral infections in humans²²⁻²⁴.

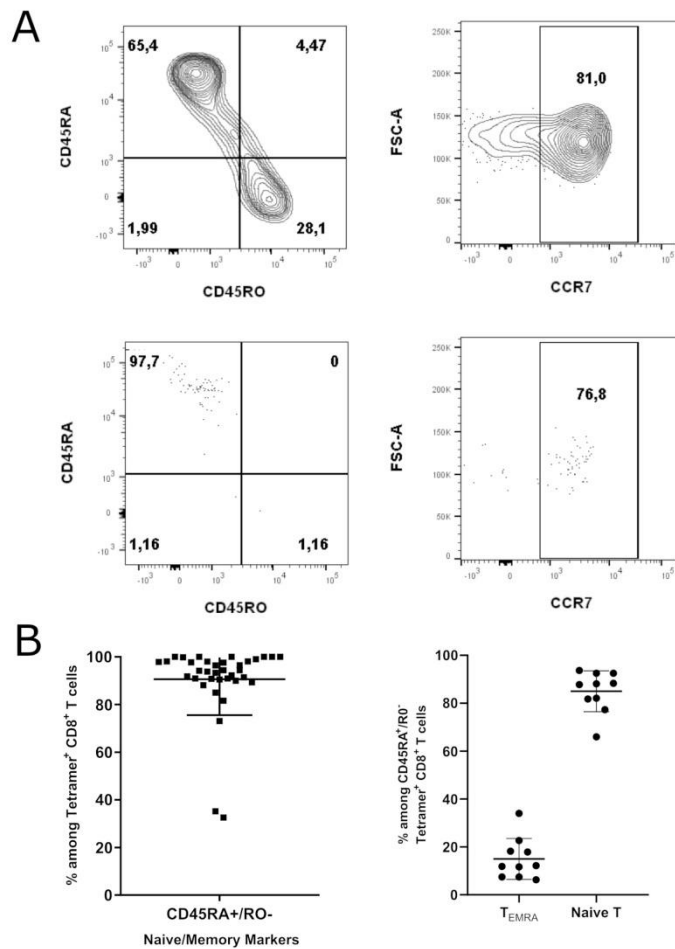


Figure 4: Phenotypic characterization of AAV8-specific CD8⁺ T lymphocytes in PBMCs from A2⁺ and B7⁺ donors. (A) Representative dot plots of CD45RA, CD45RO and CCR7 expression on Tetramer⁺ CD8⁺ T cells. Upper panel: cells were gated on total CD8⁺ T cells. Lower panel: cells were gated on Tetramer⁺ CD8⁺ T cells. (B) Overall phenotype of pAAV8 Tetramer⁺ CD8⁺ T cells. Percentages of AAV8-specific CD8⁺ T cells (isolated with AAV8 peptides pool tetramers) displaying a CD45RA⁺/RO⁻ phenotype. Percentages of AAV8-specific CD8⁺ T cells (isolated with AAV8 immunodominant peptides tetramers) displaying a CCR7⁺ (Naïve T cell) and CCR7⁻ (TEMRA) phenotype among CD45RA⁺/RO⁻ T cells are represented. Each symbol represents an individual donor. Horizontal bars refer to median values.

***Ex vivo* frequencies of T_{EMRA} AAV8-specific CD8⁺ T, but not total AAV8-specific CD8⁺ T cells, show a correlation with anti-AAV8 IFN γ ELISpot responses**

We next wanted to parallel our results with the IFN γ ELISpot assay which is the conventional method used in clinical trials to monitor anti-AAV capsid cellular responses²⁵. Anti-AAV2 and anti-AAV8 IFN γ ELISpot assays were performed on all donors (A2⁺ and

B7⁺) assessed through TAME using total PBMC as classically used for patient immunomonitoring. PBMCs from those donors were stimulated with 3 pools of overlapping peptides covering the whole AAV2 or AAV8 capsids (**Fig. 5A** for a representative assay). Results from the whole cohort are summarized in **Table 2**. Overall, 18.5% of the donors responded to AAV8 only, and 6.2% responded to AAV2 and AAV8. Unexpectedly, no donor responded against AAV2 only, making AAV8 responders more prevalent than AAV2 responders in this cohort. The majority of positive responses against AAV8 capsid were observed with peptide pools 2 and 3 (**Table 2**). Pool 2 contains the majority of peptides selected for AAV2-A2 tetramers (10/13) and for AAV8-A2 tetramers (5/9). Immunodominant peptides LIDQYLYYL and IPQYGYLTL are also in pool 2. Peptides selected for AAV8-B7 tetramers are contained in majority in pool 3 (5/12) and pool 2 (4/12) (**Table S1**). A more detailed analysis of our cohort revealed that B7⁺ donors seem to display a higher rate of positive anti-AAV8 IFN γ ELISpot responses compared to A2⁺ donors (40.0% vs 28.6% responders, respectively), an observation that parallels the results obtained after TAME where higher ex vivo frequencies of AAV8-specific CD8⁺ T cells were observed in B7⁺ donors (**Table 2 and Fig. 2B**). It is nevertheless important to note that TAME and ELISpot methods have different read-outs (tetramer staining on one hand, IFN γ secretion on the other hand using total PBMC).

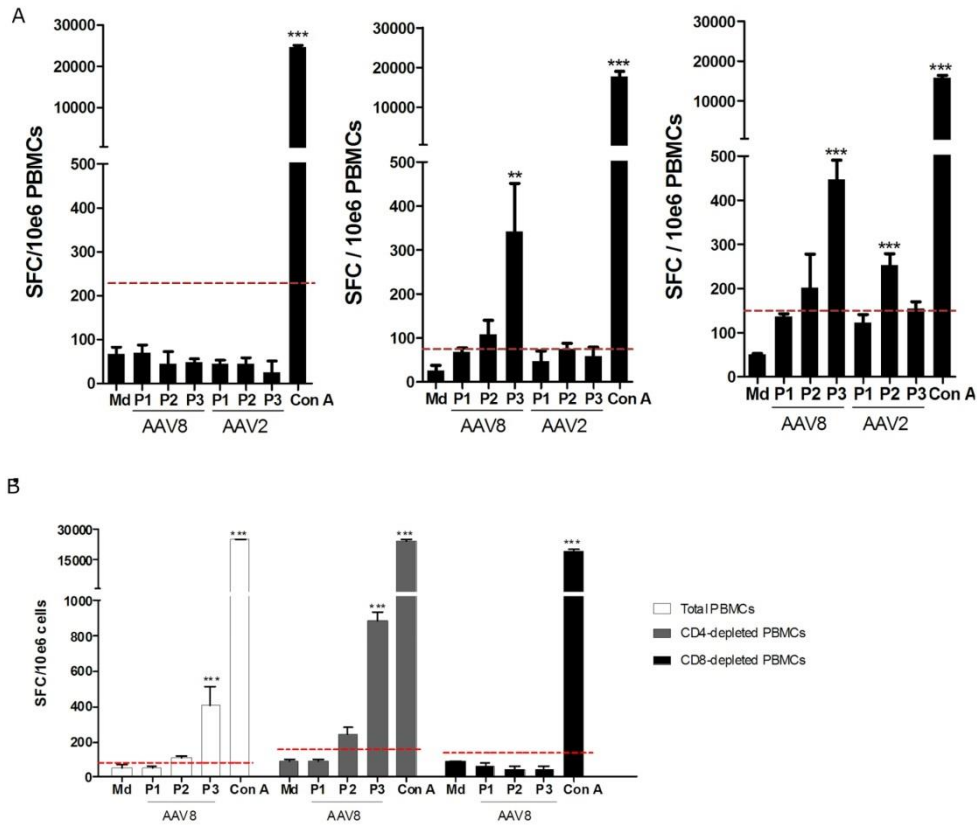


Figure 5: Assessment of anti-AAV2 and anti-AAV8 IFN γ ELISpot responses on PBMCs from A2⁺ and B7⁺ donors. (A) Representative anti-AAV8 and anti-AAV2 IFN γ ELISpot responses. Anti-AAV2 and anti-AAV8 IFN γ ELISpot responses were assessed after 48H-stimulation of whole PBMCs from A2⁺ or B7⁺ donors with 3 pools of overlapping peptides (P1, P2, P3) covering the whole AAV2 or AAV8 capsid sequences. As negative control, PBMCs were cultured in medium alone (Md). Concanavaline A (Con A)-stimulated PBMCs served as positive control. Left: representative donor not responding to AAV2 nor AAV8. Middle: representative donor responding to AAV8 only. Right: representative donor responding to AAV2 and AAV8. Results are represented as the number of Spot Forming Cells (SFC) per million PBMCs. Positive threshold (dotted line) was calculated as three times the value obtained with medium alone or at least 50 SFC/10⁶ cells. Statistical significance was determined using the DFR(2x) statistical test. ** : p < 0.01. *** : p < 0.001. (B) Representative anti-AAV8 and anti-AAV2 IFN γ responses detected after CD4⁺ or CD8⁺ T cell depletion of PBMCs. CD4⁺ or CD8⁺ T cells were depleted from PBMCs of A2⁺ or B7⁺ donors through magnetic sorting, prior to IFN γ ELISpot assays which were performed as indicated above. Purity of CD4- or CD8-depleted fractions was assessed through flow cytometry (data not shown).

Anti-AAV8 and anti-AAV2 IFNγ responses				
Donors responding against				
HLA Alleles	Donors tested	AAV2 only	AAV8 only	AAV2 and AAV8
A2 ⁺ /B7 ⁻	43	0	4 (9.3 %)	1 (2.3 %)
A2 ⁻ /B7 ⁺	15	0	6 (40.0 %)	2 (13.3 %)
A2 ⁺ /B7 ⁺	7	0	2 (28.6 %)	1 (14.3 %)
Total	65	0	12 (18.5 %)	4 (6.2 %)

Anti-AAV8 IFNγ responses				
Responses per peptides pools				
HLA Alleles	Donors responding against AAV8	Pool 1	Pool 2	Pool 3
A2 ⁺ /B7 ⁻	5	2 (40%)	4 (80%)	2 (40%)
A2 ⁻ /B7 ⁺	8	0 (0%)	3 (37,5%)	8 (100%)
A2 ⁺ /B7 ⁺	3	1 (33.3%)	1 (33.3%)	3 (100%)
Total	16	3 (18.7%)	8 (50%)	12 (75%)

Anti-AAV2 IFNγ responses				
Responses per peptides pools				
HLA Alleles	Donors responding against AAV2	Pool 1	Pool 2	Pool 3
A2 ⁺ /B7 ⁻	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
A2 ⁻ /B7 ⁺	2	0 (0%)	2 (100%)	1 (50%)
A2 ⁺ /B7 ⁺	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
Total	4	0 (0%)	4 (100%)	1 (25%)

Table 2: Overview of anti-AAV8 and anti-AAV2 IFN γ responses assessed on PBMCs from A2⁺ and B7⁺ donors.

To further correlate the two assays, we first refined the analysis of anti-AAV cellular responses obtained through ELISpot assays by investigating which circulating lymphocyte sub-population (CD4⁺ or CD8⁺) was responsible for IFN γ secretion. Consequently, PBMCs from anti-AAV IFN γ ELISpot responders were tested a second time, but were subjected to CD4⁺ or CD8⁺ T cell depletion beforehand (**Fig. 5B** for a representative donor). The efficiency of CD4 and CD8 depletions was confirmed through flow cytometry (purity from 94.27% to 99.71% for CD8-depleted fraction and 90.52% to 99.64% for CD4-depleted fraction). In all donors thus tested, CD4-depleted PBMCs responded in the same way as total PBMCs (with a higher sensibility even), while in CD8-depleted PBMCs the response was completely abrogated. These results suggest that AAV-directed IFN γ ELISpot responses was primarily mediated by CD8⁺ T cells.

We then tested the possibility that anti-AAV responses detectable by IFN γ ELISpot assay stemmed from donors displaying the highest *ex vivo* frequencies determined after TAME. We therefore plotted tetramer⁺ AAV8-specific CD8⁺ T cell frequencies against anti-AAV8 IFN γ ELISpot responses (**Fig. 6A**). We focused on AAV8 responses for which the total number of donors tested reached 65 individuals tested with tetramer pools. No obvious correlation could be found between the parameters assessed, and particularly, highest frequencies did not reflect in ELISpot responses above the threshold of positivity (represented by the red dots in **Fig. 6A**).

Finally, we tested the correlation between the proportion of CD45RA⁺/RO⁻ CCR7⁻ T_{EMRA} memory cells after TAME selection and IFN γ ELISpot responses for AAV8 serotype. We observed a positive correlation between the two parameters validated through a Spearman correlation test (**Fig 6B**). This finding suggests that T_{EMRA} specific cells could be among the functional IFN γ -secreting T cell population after capsid AAV8 stimulation.

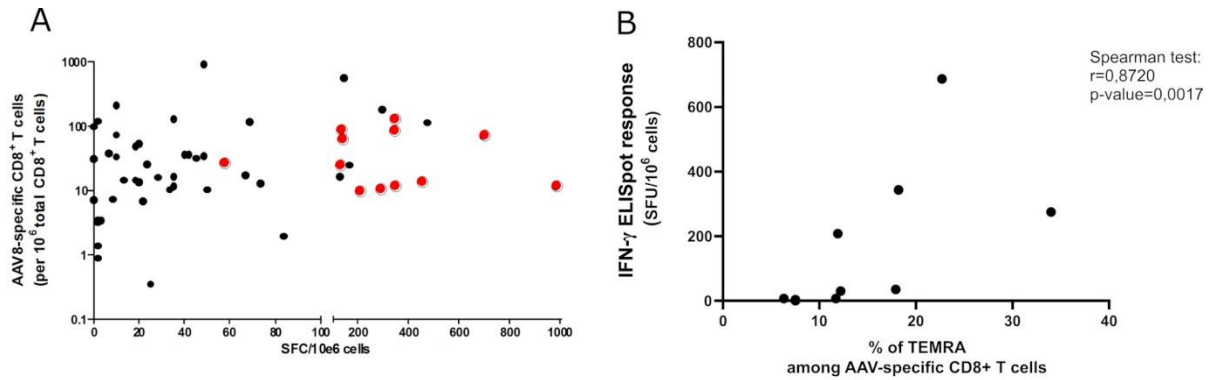


Figure 6 : Correlation studies between TAME and IFN γ ELISpot results. (A) Correlation study between *ex vivo* frequencies of AAV8-specific CD8⁺ T cells and anti-AAV8 IFN γ ELISpot responses. *Ex vivo* frequencies of AAV8-specific CD8⁺ T cells, determined after tetramer enrichment, were plotted against SFC/10e6 cells values obtained through anti-AAV8 IFN γ ELISpot assays. Red dots represent the positive responses (above threshold) in ELISpot assays. Spearman correlation test revealed no correlation between both parameters. (B) Correlation study between percentage of T_{EMRA} cells among AAV8-specific CD8⁺ T cells and anti-AAV8 IFN γ ELISpot responses. Percentage of T_{EMRA} cells among AAV8-specific CD8⁺ T cells determined after tetramer enrichment, were plotted against SFC/10e6 cells values obtained through anti-AAV8 IFN γ ELISpot assays. Spearman correlation test revealed a correlation between both parameters (p-value=0,0042).

4. Discussion

Up until now, phenotypical characterization of AAV-specific CD8⁺ T cells has almost exclusively relied on expansion or stimulation of PBMCs or splenocytes prior to phenotypical or functional assessment^{10,17,18}. Here, to circumvent biases inherent to *in vitro* cell amplification or cell stimulation²⁵, we used the highly sensitive pMHC-based tetramer enrichment method (TAME) to assess *ex vivo* frequencies and phenotypes of AAV2- and AAV8-specific CD8⁺ T cells using PBMCs of healthy A2⁺ and B7⁺ donors. We detected AAV2- and AAV8-specific CD8⁺ T cells in all donors tested (**Figs. 2A and 2B**). Considering that anti-AAV seroprevalence studies have shown that at most 2/3 of human cohorts seem to have encountered WT AAV during their life²⁰, we didn't expect all individuals in our study to carry a pool of AAV capsid-specific CD8⁺ T cells. Because we have no evidence of AAV viral infection in our cohort, we cannot exclude that in some donors the tetramer-stained cells detected stem from potential HLA-cross reactive CD8 T cells that are not AAV-capsid antigen experienced as already shown for tumoral antigens using the same TAME method^{26,27}. Indeed, a large number of pathogen-specific T cells recognizing cross-reactive epitopes within different proteins of the same pathogen, proteins from unrelated pathogens or even self-proteins have now been documented in both human or murine settings²⁸⁻³⁵. In our study, the detection of capsid tetramer-positive CD8 T cells in all donors might be explained by the fact that pools of tetramers relating to different epitope specificities were used for TAME, though when tetramer enrichment was performed using only the A2 or B7-restricted immunodominant epitope, both subsets were still detectable. The frequencies at which we detected AAV capsid-specific CD8⁺ T cells are coherent with other studies using TAME to assess pre-immune CD8⁺ T cell repertoires or virus-specific CD8⁺ T cells in the frame of chronic viral infections, *i.e* situations where the frequencies of CD8⁺ T cells are too low to be evaluated using conventional flow cytometry³⁶⁻³⁸. It is also likely that the frequencies of AAV-specific CD8⁺ T cells we calculated are somewhat underestimated, the main reasons being: 1) the potential loss of cells during the experimental procedure¹⁴; 2) the AAV2- and AAV8-derived peptides selected to construct the tetramers used for TAME (**Table S1**). Indeed, out of the many epitopes derived from AAV2 or AAV8 capsids, only the first 30 with the highest bioinformatics prediction scores were retained for UV-mediated peptide exchange screening. In the end, only 13 peptides served to construct pAAV2/A2 tetramers, 9 peptides for pAAV8/A2's, and 12 peptides for pAAV8/B7's (**Table S1**). Of note, among the B7-restricted epitopes, our selection contained the immunodominant epitope identified by Mingozzi *et al.*¹⁰,

a proof of the soundness of our bioinformatical epitope selection strategy. Therefore, we are far from covering the whole CD8⁺ T cell repertoire potentially associated to capsid antigenicity. Regarding serotype-specific response, the reactivity against the non-human primate serotype AAV8 in our cohort could also reflect epitope cross-reactivity as AAV8 capsid was shown highly crossreactive with other AAV serotypes^{10,39}. This is why we have not included A2-restricted AAV2 peptides in AAV8 peptide pools which could further underestimate specific CD8 T cell frequencies (**Table S1**).

During rAAV-based gene therapy clinical trials, destruction of transduced cells was shown to result from reactivation of capsid-specific cytotoxic CD8⁺ lymphocytes which had previously been established following natural infections with wild-type AAV⁴⁰. Consistent with this working hypothesis was the observation among different human populations that capsid-specific CD8⁺ T cells could exhibit a resting central memory phenotype¹⁰, a central memory phenotype¹⁷ or an effector memory phenotype¹⁸. Nevertheless, up to now, phenotyping of capsid-specific CD8⁺ T cells has generally been performed after *in vitro* stimulation of PBMCs. Here, we addressed the *ex vivo* phenotype of capsid-specific CD8⁺ T cells without prior stimulation and/or expansion, and we evidenced two subpopulations: naïve CD8⁺ T cells (CD45RA⁺/RO⁻ CCR7⁺) and T_{EMRA} effector memory CD8⁺ T cells (CD45RA⁺/RO⁻ CCR7⁻) (**Fig. 4**). The discrepancy we observed with previous studies (where CD45RO⁺ cells were detected) could be explained by the difference in human populations that were analyzed, but could also stem from the fact that we assessed phenotype *ex vivo*, while other studies did so after *in vitro* stimulation. Indeed, in our hands, when we expanded primary AAV8-specific CD8⁺ T cell lines from PBMCs, we observed a change in phenotype, with virtually all cell lines switching from CD45RA⁺/RO⁻ to CD45RA⁻/RO⁺ phenotype (data not shown). The detection of capsid-specific T_{EMRA} effector memory cells in the AAV context could help understanding the natural history of AAV infection in humans. T_{EMRA} effector memory CD8⁺ T cells represent the most differentiated memory T cell subset. They exhibit low proliferative capacities, but they express high levels of IFN γ and cytotoxic molecules, such as perforin and Fas ligand, upon TCR activation^{25,41}. It is generally admitted that the presence of T_{EMRA} effector memory CD8⁺ T cells results from chronic exposure of CD8⁺ T cells to their antigens, as can be the case in particular clinical contexts such as graft-versus-host disease⁴¹, cardiac transplantation⁴², chronic viral infections with CMV, HIV or HCV⁴³⁻⁴⁵ or in AAV infection¹⁰. While the chronicity of WT AAV infection has never been clearly

established, a putative evidence of its occurrence is the observation that a significant portion of individuals, aged less than 60 years old, who harbor anti-AAV1 IgG antibodies also exhibit anti-AAV1 IgM antibodies, an immunoglobulin subtype classically encountered during the course of a running infection^{46,47}. Our own results seem to indicate that some AAV8-specific CD8⁺ T cells might be chronically exposed to their antigens, however whether this occurs through WT AAV reinfection cycles or through helper-mediated re-expression of capsid antigens from latent AAV genomes is still up to debate. The detection of whole infectious AAV particles in the bloodstream or in tissues would constitute the most accurate proof of ongoing AAV infections. However, this approach is hardly feasible considering the sensitivity of the detection techniques, and instead it is the presence of infectious AAV DNA in cells that is assessed⁴⁸⁻⁵⁴.

The presence of circulating naïve self-specific and virus-specific CD8⁺ T cells in contexts where these cells should have exhibited antigen experience has already been evidenced^{26,36}. It is now generally known that the distribution of virus-specific CD8⁺ subsets (naïve, central memory, effector memory, T_{EMRA} effector memory) is closely related to the course of viral natural infection and virus wild-type's life cycle, particularly in cases where viruses are able to establish chronic infections or immune tolerance/exhaustion. Unfortunately, few things are known about the natural life cycle of WT AAV throughout lifetime (that might in addition differ among serotypes), so that it is difficult to infer immunological status to state of infection.

To assess the specificity and functionality of AAV8 capsid-reactive CD8⁺ T cells, we sorted cells after TAME to expand primary AAV8-specific CD8⁺ T cell lines *in vitro*. Out of the 11 cell lines that we generated, 10 were responsive, *i.e.* were able to upregulate CD107, IFN γ and TNF α upon incubation with AAV8-loaded target cells (**Fig. 3B-C** and **Table 1**). Three cell lines were also tested for cytotoxicity and exhibit a cytotoxic activity against AAV8 peptides loaded cells (**Fig. 3B**). These results were in line with the results obtained by Kuranda *et al* who observed secretion of granzyme B by T_{EMRA} and T_{EM} cells in response to stimulation with AAV2 peptides³⁶.

We noted higher, but not significant, *ex vivo* frequencies of AAV8-specific CD8⁺ T cells in B7⁺ donors compared to A2⁺ individuals, an observation paralleled for anti-AAV8 IFN γ ELISpot responses where responders were more frequent in B7⁺ than in A2⁺ subjects

(**Fig. 2A** and **Table 2**). Interestingly, the first report of AAV2 capsid-specific immunity in hemophilia B clinical trial happened to have been described in a B7⁺ patient¹⁰. Whether B7⁺ individuals are significantly more likely to develop anti-AAV cellular responses, and as such should be more carefully monitored during clinical trials, is a question that remains to be investigated. While TAME permitted the detection of AAV2- or AAV8-specific CD8⁺ T cells in A2⁺ or B7⁺ donors PBMCs, only 24.6% of donors on the whole were positive when evaluated by anti-AAV2 and anti-AAV8 IFN γ ELISpot assays (**Fig. 2** and **Tab. 2**). Surprisingly, when assessed through IFN γ ELISpot assays, cellular anti-AAV8 responses appeared to be more frequent than anti-AAV2's in our cohort (**Table 2**). This is unexpected because: (1) the wild-type AAV8 serotype was first isolated from non-human primate samples, and is thought to circulate at a lower rate among the human population⁵¹; (2) according to the literature, AAV2 has always shown a higher seroprevalence than AAV8 in humans²⁰. Concerning AAV-directed cellular responses, all donors responding to AAV2 peptide pool stimulation also responded to AAV8, which again likely reflects a cross-reactive response, though not complete, between both serotypes, as discussed above, and has been already reported in other studies³⁹. In our study, anti-AAV8 IgG antibodies were detected in 51.7% of donors (median titer: 1:2560) and neutralizing factors were detected in 50% of donors (median titer: 1:1000) (**Table S3**). Overall, in our cohort, anti-AAV8 humoral responses surprisingly seemed to be more prevalent than in the literature where seroprevalence was generally reported between 20 to 40%^{19,55-57}. A positive correlation was found between anti-AAV2 and anti-AAV8 IgG antibody titers (data not shown) confirming again the cross-reactivity between the two serotypes. When investigating the correlations between anti-AAV8 cellular and humoral responses, we found no correlation between antibody titers and *ex vivo* frequencies of AAV8-specific CD8⁺ T cells assessed by TAME (**Fig. S2 A**) or anti-AAV8 IFN γ ELISpot responses (**Fig. S2 B**). This observation parallels the results already reported for AAV1¹⁸ and AAV2¹⁰. Regarding the discrepancy between anti-capsid humoral *versus* cellular immune responses, a recent study highlighted two new distinct profiles⁵⁸. Indeed, in seronegative individuals, they have shown transient activation of a subset of IFN γ -secreting CD16^{bright}CD56^{dim} NK cells known to rapidly respond to infection without prior sensitization. In contrast, seropositive “AAV-experienced” individuals presented capsid-specific memory CD8⁺ T cells that secrete TNF α upon capsid peptide stimulation.

Ex vivo frequencies of total AAV-specific CD8⁺ T cells were not predictive of the functionality of AAV-specific CD8⁺ T cells, at least in terms of IFN γ secretion, as we could not evidence any correlation between TAME results and anti-AAV IFN γ ELISpot responses. Appraisal of other parameters (TNF α , Granzyme B, Perforin, IL-10...) might have yielded to different conclusions. In addition, we noticed that depletion of CD4⁺ T cells prior to ELISpot assay noticeably increased the intensity of responses (which is expected as when CD4⁺ T cells are removed, CD8⁺ T cells are proportionally more frequent in samples), without increasing the background signal (**Fig. 5B**). As such, CD4⁺ T cell depletion is a quick and an efficient method that might be used to enhance ELISpot detection sensitivity before or during rAAV-mediated clinical trials immunomonitoring.

Interestingly, we evidenced a correlation (p-value=0,0042) between the proportion of T_{EMRA} effector memory cells within AAV-specific CD8⁺ T cells detected through TAME method and IFN γ positive ELISpot responses. Whether anti-capsid effector responses reported in gene therapy trials is due to the reactivation of T_{EMRA} preexisting cells remains to be investigated. For instance, higher proportion of CD8⁺ T_{EMRA} cells in early phase of HIV infection were shown to be associated to superior antiviral activity and lower viral load⁵⁹. It remains important to better characterize AAV-specific T_{EMRA} CD8⁺ T cells to determine their functionality and how they are potentially recalled after administration of rAAV. Indeed, because AAV could result in a viral chronic infection setting as CMV or EBV with changes in immunological memory⁴⁵, T_{EMRA} CD8⁺ cells could have an exhausted/non effector functional phenotype with PD1 regulation in some individuals or infection settings. This could explain why all patients displaying AAV positive IFN γ ELISpot assay did not show transaminitis and subsequent loss of transgene expression in hemophilia gene therapy trials⁶⁰.

In conclusion, overall, our study evidenced the difficulty to predict the impact of AAV capsid-specific cellular immunity on the safety and efficiency of rAAV-based gene transfer as it is not only a matter of detection sensitivity, but also a matter of functionality. Both qualitative and quantitative aspects of the CD8⁺ T-cell response need to be considered. Therefore, the development of assays combining both improved detection sensitivity and multiparametric polyfunctional assessment should prove to be the way to efficient clinical pre-screening and monitoring of patients. Ultimately, as others before us have underlined,

setting up an animal model recapitulating observations done in humans is still an ongoing quest.

5. Conflict of Interest

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

6. Author Contributions

CV, XS, PM and OA conceived the scientific strategy. CV, RX, LH, XS, MD and OA conceived and designed the experiments; CV, RX, MD, NJ, MG, CC and JL performed the experiments; CV, RX, MD, NJ, MG, CC and OA analyzed the data; CV, RX, MG, OA, XS and LH contributed to the writing of the manuscript.

7. Funding

This work was supported by the Inserm, the French Ministry of Research, the FRM (Fondation pour la Recherche Médicale), the University Hospital of Nantes, the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de Loire, the AFM-Téléthon (Association Française contre les Myopathies), Région Pays de Loire (IMBIO-DC consortium), the IHU-CESTI / the French National Research Agency (ANR) *via* the “Investment Into The Future” program ANR-10-IBHU-005 and UPGRADE H2020 Consortium (Grant agreement no. 825825).

8. Acknowledgments

We thank Tom Schumacher (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam) for providing the plasmids of the HLA heavy chains used in this study.

We thank the cytometry facility (Cytocell, Nantes, France) for expert technical assistance and the recombinant protein production platform (P2R, Nantes, France) for HLA monomer production. We also thank our vector core facility at the University Hospital of Nantes (France) for providing the rAAV8 and rAAV2 vectors (<https://umr1089.univ-nantes.fr/plateaux-technologiques/cpv/>).

9. References

1. Maguire, AM, High, KA, Auricchio, A, Wright, JF, Pierce, EA, Testa, F, *et al.* (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber’s congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* **374**: 1597–1605.

2. Bainbridge, JWB, Mehat, MS, Sundaram, V, Robbie, SJ, Barker, SE, Ripamonti, C, *et al.* (2015). Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* **372**: 1887–1897.
3. Nathwani, AC, Reiss, UM, Tuddenham, EGD, Rosales, C, Chowdary, P, McIntosh, J, *et al.* (2014). Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **371**: 1994–2004.
4. Mueller, C, Chulay, JD, Trapnell, BC, Humphries, M, Carey, B, Sandhaus, RA, *et al.* (2013). Human Treg responses allow sustained recombinant adeno-associated virus–mediated transgene expression. *J Clin Invest* **123**: 5310–5318.
5. Ferreira, V, Twisk, J, Kwikkers, K, Aronica, E, Brisson, D, Methot, J, *et al.* (2014). Immune responses to intramuscular administration of alipogene tiparvec (AAV1-LPL(S447X)) in a phase II clinical trial of lipoprotein lipase deficiency gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **25**: 180–188.
6. Melchiorri, D, Pani, L, Gasparini, P, Cossu, G, Ancans, J, Borg, JJ, *et al.* (2013). Regulatory evaluation of Glybera in Europe - two committees, one mission. *Nat Rev Drug Discov* **12**: 719.
7. Russell, S, Bennett, J, Wellman, JA, Chung, DC, Yu, Z-F, Tillman, A, *et al.* (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* **390**: 849–860.
8. Hoy, SM (2019). Onasemnogene Apeparvec: First Global Approval. *Drugs* **79**: 1255–1262.
9. Manno, CS, Glenn F. Pierce, Arruda, VR, Pierce, GF, Glader, B, Ragni, M, *et al.* (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **12**: 342–347.
10. Mingozi, F, Maus, MV, Hui, DJ, Sabatino, DE, Murphy, SL, Rasko, JEJ, *et al.* (2007). CD8+ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* **13**: 419–422.
11. Nathwani, AC, Tuddenham, EGD, Rangarajan, S, Rosales, C, McIntosh, J, Linch, DC, *et al.* (2011). Adenovirus-Associated Virus Vector–Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *N Engl J Med* **365**: 2357–2365.
12. Pien, GC, Basner-Tschakarjan, E, Hui, DJ, Mentlik, AN, Finn, JD, Hasbrouck, NC, *et al.* (2009). Capsid antigen presentation flags human hepatocytes for destruction after transduction by adeno-associated viral vectors. *J Clin Invest* **119**: 1688–1695.
13. Alanio, C, Lemaitre, F, Law, HKW, Hasan, M and Albert, ML (2010). Enumeration of human antigen-specific naive CD8+ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood* **115**: 3718–3725.
14. Legoux, F, Debeaupuis, E, Echasserieau, K, De La Salle, H, Saulquin, X and Bonneville, M (2010). Impact of TCR reactivity and HLA phenotype on naive CD8 T cell frequency in humans. *J. Immunol.* **184**: 6731–6738.
15. Rodenko, B, Toebe, M, Hadrup, SR, van Esch, WJE, Molenaar, AM, Schumacher, TNM, *et al.* (2006). Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. *Nat Protoc* **1**: 1120–1132.
16. Chirmule, N, Propert, K, Magosin, S, Qian, Y, Qian, R and Wilson, J (1999). Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* **6**: 1574–1583.
17. Li, H, Lasaro, MO, Jia, B, Lin, SW, Haut, LH, High, KA, *et al.* (2011). Capsid-specific T-cell Responses to Natural Infections With Adeno-associated Viruses in Humans Differ From Those of Nonhuman Primates. *Mol Ther* **19**: 2021–2030.

18. Veron, P, Leborgne, C, Monteilhet, V, Boutin, S, Martin, S, Moullier, P, *et al.* (2012). Humoral and Cellular Capsid-Specific Immune Responses to Adeno-Associated Virus Type 1 in Randomized Healthy Donors. *J Immunol* **188**: 6418–6424.
19. Calcedo, R, Vandenberghe, LH, Gao, G, Lin, J and Wilson, JM (2009). Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *J Infect Dis.* **199**: 381–390.
20. Jeune, VL, Joergensen, JA, Hajjar, RJ and Weber, T (2013). Pre-existing Anti-Adeno-Associated Virus Antibodies as a Challenge in AAV Gene Therapy. *Hum Gene Ther Methods* **24**: 59–67.
21. Balakrishnan, B and Jayandharan, G (2014). Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. *Current Gene Therapy* **14**: 86–100.
22. Eberhard, JM, Ahmad, F, Hong, HS, Bhatnagar, N, Keudel, P, Schulze Zur Wiesch, J, *et al.* (2016). Partial recovery of senescence and differentiation disturbances in CD8+ T cell effector-memory cells in HIV-1 infection after initiation of anti-retroviral treatment. *Clin. Exp. Immunol.* **186**: 227–238.
23. Shen, T, Zheng, J, Xu, C, Liu, J, Zhang, W, Lu, F, *et al.* (2010). Pd-1 Expression on Peripheral Cd8+ Tem/Temra Subsets Closely Correlated with Hcv Viral Load in Chronic Hepatitis C Patients. *Virology* **7**: 310.
24. Weltevrede, M, Eilers, R, de Melker, HE and van Baarle, D (2016). Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: A systematic review. *Experimental Gerontology* **77**: 87–95.
25. Geginat, J, Lanzavecchia, A and Sallusto, F (2003). Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* **101**: 4260–4266.
26. Pittet, MJ, Valmori, D, Dunbar, PR, Speiser, DE, Liénard, D, Lejeune, F, *et al.* (1999). High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J. Exp. Med.* **190**: 705–715.
27. Voelter, V, Rufer, N, Reynard, S, Greub, G, Brookes, R, Guillaume, P, *et al.* (2008). Characterization of Melan-A reactive memory CD8+ T cells in a healthy donor. *Int. Immunol.* **20**: 1087–1096.
28. Bhardwaj, V, Kumar, V, Geysen, HM and Sercarz, EE (1993). Degenerate recognition of a dissimilar antigenic peptide by myelin basic protein-reactive T cells. Implications for thymic education and autoimmunity. *J. Immunol.* **151**: 5000–5010.
29. Evavold, BD, Sloan-Lancaster, J, Wilson, KJ, Rothbard, JB and Allen, PM (1995). Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: evidence for multiple endogenous ligands. *Immunity* **2**: 655–663.
30. Hagerty, DT and Allen, PM (1995). Intramolecular mimicry. Identification and analysis of two cross-reactive T cell epitopes within a single protein. *J. Immunol.* **155**: 2993–3001.
31. Loftus, DJ, Castelli, C, Clay, TM, Squarcina, P, Marincola, FM, Nishimura, MI, *et al.* (1996). Identification of epitope mimics recognized by CTL reactive to the melanoma/melanocyte-derived peptide MART-1(27-35). *J. Exp. Med.* **184**: 647–657.
32. Grogan, JL, Kramer, A, Nogai, A, Dong, L, Ohde, M, Schneider-Mergener, J, *et al.* (1999). Cross-reactivity of myelin basic protein-specific T cells with multiple microbial peptides: experimental autoimmune encephalomyelitis induction in TCR transgenic mice. *J. Immunol.* **163**: 3764–3770.
33. Hemmer, B, Fleckenstein, BT, Vergelli, M, Jung, G, McFarland, H, Martin, R, *et al.* (1997). Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J. Exp. Med.* **185**: 1651–1659.

34. Misko, IS, Cross, SM, Khanna, R, Elliott, SL, Schmidt, C, Pye, SJ, *et al.* (1999). Crossreactive recognition of viral, self, and bacterial peptide ligands by human class I-restricted cytotoxic T lymphocyte clonotypes: implications for molecular mimicry in autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 2279–2284.
35. Brehm, MA, Pinto, AK, Daniels, KA, Schneck, JP, Welsh, RM and Selin, LK (2002). T cell immunodominance and maintenance of memory regulated by unexpectedly cross-reactive pathogens. *Nat. Immunol.* **3**: 627–634.
36. Barnes, E, Ward, SM, Kasprovicz, VO, Dusheiko, G, Klenerman, P and Lucas, M (2004). Ultra-sensitive class I tetramer analysis reveals previously undetectable populations of antiviral CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **34**: 1570–1577.
37. Lima, MA, Marzocchetti, A, Autissier, P, Tompkins, T, Chen, Y, Gordon, J, *et al.* (2007). Frequency and phenotype of JC virus-specific CD8+ T lymphocytes in the peripheral blood of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Virol.* **81**: 3361–3368.
38. Alanio, C, Nicoli, F, Sultanik, P, Flecken, T, Perot, B, Duffy, D, *et al.* (2015). Bystander hyperactivation of preimmune CD8+ T cells in chronic HCV patients. *eLife* **4**: e07916.
39. Hui, DJ, Edmonson, SC, Podsakoff, GM, Pien, GC, Ivanciu, L, Camire, RM, *et al.* (2015). AAV capsid CD8+ T-cell epitopes are highly conserved across AAV serotypes. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development* **2**: 15029.
40. Mingozi, F and High, KA (2013). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* **122**: 23–36.
41. D'Asaro, M, Dieli, F, Caccamo, N, Musso, M, Porretto, F and Salerno, A (2006). Increase of CCR7- CD45RA+ CD8 T cells (T(EMRA)) in chronic graft-versus-host disease. *Leukemia* **20**: 545–547.
42. Barbarash, L, Kudryavtsev, I, Rutkovskaya, N and Golovkin, A (2016). T Cell Response in Patients with Implanted Biological and Mechanical Prosthetic Heart Valves. *Mediators Inflamm.* **2016**: 1937564.
43. Weltevrede, M, Eilers, R, de Melker, HE and van Baarle, D (2016). Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: A systematic review. *Exp. Gerontol.* **77**: 87–95.
44. Eberhard, JM, Ahmad, F, Hong, HS, Bhatnagar, N, Keudel, P, Schulze Zur Wiesch, J, *et al.* (2016). Partial recovery of senescence and differentiation disturbances in CD8(+) T cell effector-memory cells in HIV-1 infection after initiation of ART. *Clin. Exp. Immunol.* doi:10.1111/cei.12837.
45. Shen, T, Zheng, J, Xu, C, Liu, J, Zhang, W, Lu, F, *et al.* (2010). PD-1 expression on peripheral CD8+ TEM/TEMRA subsets closely correlated with HCV viral load in chronic hepatitis C patients. *Virol. J.* **7**: 310.
46. Erles, K, Seböková, P and Schlehofer, JR (1999). Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J. Med. Virol.* **59**: 406–411.
47. Murphy, SL, Li, H, Mingozi, F, Sabatino, D, Hui, D, Edmonson, S, *et al.* (2009). Diverse IgG Subclass Responses to Adeno-associated Virus Infection and Vector Administration. *J Med Virol* **81**: 65–74.
48. Hernandez, YJ, Wang, J, Kearns, WG, Loiler, S, Poirier, A and Flotte, TR (1999). Latent Adeno-Associated Virus Infection Elicits Humoral but Not Cell-Mediated Immune Responses in a Nonhuman Primate Model. *J Virol* **73**: 8549–8558.
49. Salvetti, A, Orève, S, Chadeuf, G, Favre, D, Cherel, Y, Champion-Arnaud, P, *et al.* (1998). Factors Influencing Recombinant Adeno-Associated Virus Production. *Human Gene Therapy* **9**: 695–706.

50. Schnepf, BC, Jensen, RL, Clark, KR and Johnson, PR (2009). Infectious molecular clones of adeno-associated virus isolated directly from human tissues. *J. Virol.* **83**: 1456–1464.
51. Gao, G, Vandenberghe, LH, Alvira, MR, Lu, Y, Calcedo, R, Zhou, X, *et al.* (2004). Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues. *J Virol* **78**: 6381–6388.
52. Schnepf, BC, Jensen, RL, Chen, C-L, Johnson, PR and Clark, KR (2005). Characterization of Adeno-Associated Virus Genomes Isolated from Human Tissues. *J. Virol.* **79**: 14793–14803.
53. Rohde, V, Erles, K, Sattler, HP, Derouet, H, Wullich, B and Schlehofer, JR (1999). Detection of adeno-associated virus in human semen: does viral infection play a role in the pathogenesis of male infertility? *Fertility and Sterility* **72**: 814–816.
54. Hüser, D, Khalid, D, Lutter, T, Hammer, E-M, Weger, S, Heßler, M, *et al.* (2016). High prevalence of infectious adeno-associated virus (AAV) in human peripheral blood mononuclear cells indicative of T lymphocytes as sites of AAV persistence. *J. Virol.*: JVI.02137-16doi:10.1128/JVI.02137-16.
55. Louis Jeune, V, Joergensen, JA, Hajjar, RJ and Weber, T (2013). Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum Gene Ther Methods* **24**: 59–67.
56. Boutin, S, Monteilhet, V, Veron, P, Leborgne, C, Benveniste, O, Montus, MF, *et al.* (2010). Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Human Gene Therapy* **21**: 704–712.
57. Stanford, S, Pink, R, Creagh, D, Clark, A, Lowe, G, Curry, N, *et al.* (2019). Adenovirus-associated antibodies in UK cohort of hemophilia patients: A seroprevalence study of the presence of adenovirus-associated virus vector-serotypes AAV5 and AAV8 neutralizing activity and antibodies in patients with hemophilia A. *Res Pract Thromb Haemost* **3**: 261–267.
58. Kuranda, K, Jean-Alphonse, P, Leborgne, C, Hardet, R, Collaud, F, Marmier, S, *et al.* (2018). Exposure to wild-type AAV drives distinct capsid immunity profiles in humans. *J. Clin. Invest.* **128**: 5267–5279.
59. Northfield, JW, Loo, CP, Barbour, JD, Spotts, G, Hecht, FM, Klenerman, P, *et al.* (2007). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8⁺ T(EMRA) cells in early infection are linked to control of HIV-1 viremia and predict the subsequent viral load set point. *J. Virol.* **81**: 5759–5765.
60. Vandamme, C, Adjali, O and Mingozzi, F (2017). Unraveling the Complex Story of Immune Responses to AAV Vectors Trial After Trial. *Hum. Gene Ther.* **28**: 1061–1074.

Supplementary Material

Anti-AAV ELISA

Detection of anti-AAV2 and anti-AAV8 total IgG antibodies in the plasma of healthy human donors was conducted using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Nunc Maxisorp P96 plates (Sigma-Aldrich) were coated overnight at 4°C with rAAV2 or rAAV8 particles (INSERM UMR 1089 Vector Core Facility). After washing and plate saturation, wells were then incubated for 1 hour at 37°C with 12 serial twofold dilutions of human plasma (from 1/10 to 1/20,480) followed by HRP-conjugated anti-human F(ab')₂ IgG antibody (Jackson) for 1 hour at 37°C. Positive controls consisted in human sera previously identified to contain anti-AAV2 or anti-AAV8 antibodies, as well as in anti-AAV antibodies (Progen). Revelation was performed using 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB, OptEIA, BD Biosciences) and absorbance of duplicate samples was read at 450 nm with a correction at 570 nm on a MultiSkan Go reader (Thermo Scientific). Positive threshold curves for each ELISA were determined from seronegative human sera (> 10 donors) as the mean optic density for each dilution + 2*SD. For each donor, anti-AAV2 or anti-AAV8 IgG titer was defined as the last plasma dilution with an optic density remaining above the threshold curve.

Anti-AAV Neutralization Assay

Detection of anti-AAV8 and anti-AAV2 neutralizing factors in the deplete plasma of healthy human donors was conducted using a neutralization assay based on the principle of a transduction inhibition assay. Briefly, 10-fold serial dilutions of plasma (1:10 to 1:100,000) were incubated 30 min at room temperature with rAAV8-CMV-LacZ or rAAV2-CMV-LacZ vectors and added to the cells at a MOI of 4,000 vg/cell. After a 24H-incubation at 37°C, cells were fixed and β -galactosidase expression was then revealed with an X-gal substrate (Promega). Titers of anti-AAV neutralizing factors were defined as the last dilution where transduction was reduced compared to positive control wells, where cells were transduced with rAAV8 or rAAV2 vectors in the absence of plasma.

Supplementary Figures

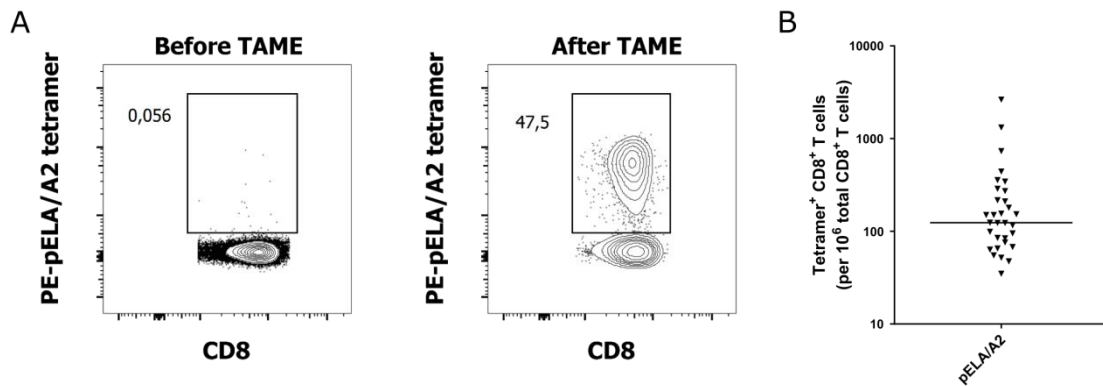


Figure S1. Detection of Melan-A-specific CD8⁺ T lymphocytes in PBMCs from A2⁺ donors. (A) Representative dot plots obtained before and after tetramer enrichment with pELA/A2 tetramer complexes. Percentages of PE-Tetramer⁺ cells among total CD8⁺ T cells obtained before and after tetramer enrichment are indicated. PE: phycoerythrin. (B) *Ex vivo* frequencies of pELA/A2 Tetramer⁺ CD8⁺ T lymphocytes in A2⁺ donors. *Ex vivo* frequencies of Melan-A-specific CD8⁺ T cells were calculated by dividing the absolute number of PE-Tetramer⁺ CD8⁺ T cells, detected after tetramer enrichment, by the absolute number of total CD8⁺ T cells. The horizontal bar refers to the median value. Each symbol represents an individual donor (n=31).

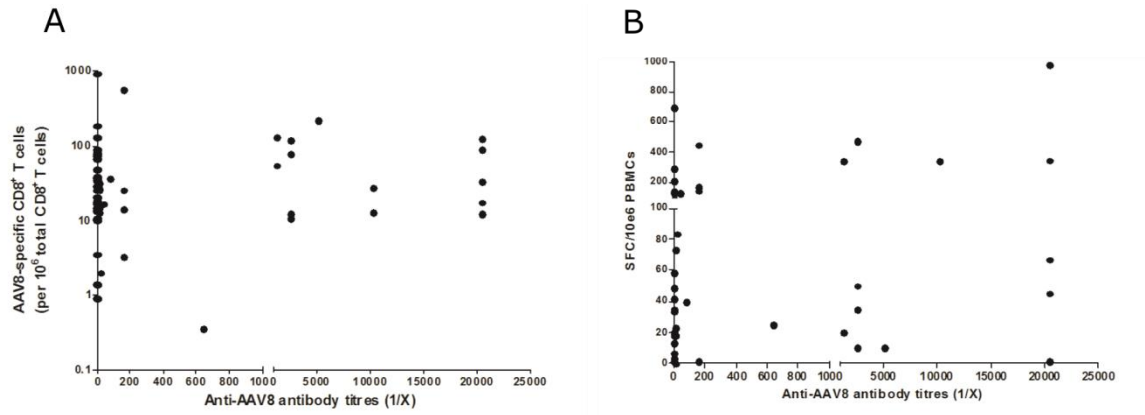


Figure S2. Correlation study between humoral and cellular responses. (A) Correlation study between *ex vivo* frequencies of AAV8-specific CD8⁺ T cells and anti-AAV8 antibody titers. *Ex vivo* frequencies of AAV8-specific CD8⁺ T cells, determined after tetramer enrichment, were plotted against titers of anti-AAV8 total IgG antibodies, determined through ELISA. Spearman correlation test revealed no correlation between both parameters. **(B)** Correlation study between anti-AAV8 IFN γ ELISpot responses and anti-AAV8 antibody titers. SFC/10⁶ cells values obtained through anti-AAV8 IFN γ ELISpot assays were plotted against titers of anti-AAV8 total IgG antibodies, determined by ELISA. Spearman correlation test revealed no correlation between both parameters.

Supplementary Tables

Table S1. Sequences of peptides selected to construct pAAV2/A2, pAAV8/A2 and pAAV8/B7 tetramer complexes.

pAAV2/A2 (A2-restricted AAV2 peptides^a)	pAAV8/A2 (A2-restricted AAV8 peptides^a)	pAAV8/B7 (B7-restricted AAV8 peptides^{a,b})
FMVPQYGYLTL	FMIPQYGYLTL	IPQYGYLTL ^b
RLMNPLIDQYL	FMIPQYGYL	RPKRLSFKL
LMNPLIDQYL	YLPDWLEDNL	SPLMGGFGL
YLQGPIWAKI	RLSFKLFNIQV	VPADPPTTF
LIDQYLYYL	LQAGDNPYL	QPARKRLNF
KLFNIQVKEV	FQFTYTFEDV	FPSNGILIF
FTFSYTFEDV	GMVWQNRDVYL	APSGVGPNTM
RLNFKLFNI	FMIPQYGYLT	SPRDWQRLI
QLDSGDNPYL	ILIKNTPVPA	LPTYNNHL
GMVWQDRDVYL		APGKKRPV
RQLDSGDNPYL		RPIGTRYLTRNL
SLDRLMNPL		RPIGTRYLT
RVLEPLGLV		
Total = 13 peptides	Total = 9 peptides	Total = 12 peptides

^a For each case, candidate epitopes were first issued after interrogation of bioinformatics prediction databases (SYFPEITHI epitope prediction, NetMHC 3.2 Server, IEDB MHC I Processing Cleavage Prediction). The first 30 epitopes were then screened through UV-mediated peptide exchange (Rodenko et al., 2006). Selected epitopes were then used to construct tetramer complexes. For each case, tetramer complexes were used as a single pool to stain PBMCs.

^b Using the method described above, the B7-restricted AAV8 immunodominant peptide originally described by Mingozi *et al.* was selected (Mingozi et al., 2007c).

Table S2. Antibodies used for cytometric analysis.

Antibody	Supplier	Reference	Clone
CD3 PerCP Cy5.5	BD Biosciences	560835	UCHT1
CD4 APC-H7	BD Biosciences	60251	RPA-T4
CD8 eFluor 605	eBiosciences	93-0088-42	
CD14 AF700	BD Biosciences	561029	M5E2
CD16 AF700	BD Biosciences	557920	3G8
CD19 AF700	BD Biosciences	561031	HIB19
CD45RO BV421	BD Biosciences	562641	UCHL1
CD27 PeCy7	BD Biosciences	560609	M-T271
CD45RA PE-Dazzle 594	BioLegend	304146	HI100
CCR7 (CD197) BV785	BioLegend	353229	G043H7
FVD eFluor 506	eBiosciences	65-0866-14	-

Table S3: Overview of anti-AAV8 and anti-AAV2 humoral responses assessed on plasma from A2⁺ and B7⁺ donors.

HLA Allele	Anti-AAV8 total IgG antibodies ^a		Anti-AAV8 neutralizing factors ^b
	Donors tested	Donors with titres $\geq 1/10$	Donors with titres $\geq 1/50$
A2 ⁺ /B7 ⁻	37	20 (54.1 %)	16 (43.2 %)
A2 ⁻ /B7 ⁺	14	8 (57.1 %)	9 (64.3 %)
A2 ⁺ /B7 ⁺	7	2 (28.6 %)	4 (57.1 %)
Total	58	30 (51.7 %)	29 (50 %)
Median Titres		1:2560	1:1000

^aAnti-AAV8 total IgG antibodies were assessed through ELISA.

^bAnti-AAV8 neutralizing factors were assessed through neutralization assay.

Supplementary references

1. Rodenko, B. et al. Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. *Nat. Protoc.* 1, 1120–1132 (2006).
2. Mingozzi, F. et al. CD8⁺ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* 13, 419–422 (2007).

En résumé :

- **L'enrichissement magnétique associé aux tétramères a permis de mettre en évidence la présence de LT CD8⁺ spécifiques de la capsid de l'AAV2 et de l'AAV8 à de faibles fréquences chez tous les donneurs.**
- **Une sous-population de LT effecteurs mémoire TEMRA a été mise en évidence parmi les LT CD8⁺ spécifiques de la capsid de l'AAV8.**
- **Le pourcentage de TEMRA parmi les LT CD8⁺ spécifiques de la capsid de l'AAV8 est corrélé à la sécrétion d'IFN- γ détectée par ELISpot.**
- **L'enrichissement magnétique associé aux tétramères a permis la génération de lignées primaires de LT CD8⁺ spécifiques de la capsid de l'AAV.**
- **La fonctionnalité de ces lignées a été validée par un test de cytotoxicité.**

Etude III : Développement d'un modèle murin de transfert de gène pour l'étude de l'impact des lymphocytes T CD8⁺ anti-AAV *in vivo*.

I. Contexte et stratégie de l'étude

Le manque actuel de modèles animaux pertinents pour l'étude de la réponse cellulaire anti-AAV est un obstacle majeur pour la mise au point de nouvelles stratégies d'immunomodulation. Nous avons donc travaillé à l'élaboration d'un modèle de souris permettant de reproduire la réponse cellulaire anti-capside observée chez l'homme.

Une étude exposée par Martino *et al.* où des LT CD8⁺ murins spécifiques de l'AAV ont été transférés de façon adoptive dans des souris immunodéficientes a montré une destruction des hépatocytes transduits par l'AAVr en présence d'adjuvants (Martino et al., 2013). Ce modèle bien qu'intéressant ne permet pas l'étude de l'impact des LT CD8⁺ humains préexistants d'un patient puisqu'il s'intéresse à la fonction effectrice de LT murins. Dans ce but, nous proposons d'utiliser un modèle de souris humanisées transgéniques pour le HLA-A2 afin de reproduire la réponse cellulaire cytotoxique observée chez l'homme avec des cellules humaines issues de donneurs HLA-A2. Après administration du vecteur AAV8, notre objectif est d'étudier l'impact d'un transfert adoptif de LT CD8⁺ humains issus de donneurs HLA-A2 et positifs pour des tétramères de l'AAV8. L'expression du HLA-A2 par les cellules murines devrait permettre la reconnaissance par les LT anti-AAV8 humains des cellules transduites par l'AAV8 et leur destruction. La complexité de ce modèle réside dans la difficulté à trouver les bons paramètres nécessaires à un transfert adoptif de cellules en nombre suffisant et avec une fonction préservée afin de pouvoir observer la réponse cytotoxique anti-AAV8 *in vivo*, tout en évitant une réaction immune de ces cellules contre l'hôte (Graft Versus Host Disease ou GVHD). La meilleure cinétique des injections (ordre et délai entre les injections du vecteur et des LT CD8⁺) est également un élément clé du modèle qu'il faudra déterminer.

Une étude préliminaire a été réalisée chez ces souris sans injection de cellules afin de vérifier l'efficacité du vecteur et du transfert de gène seul. Dans un second temps, les souris ont reçu en plus du vecteur des cellules immunitaires humaines. Pour cette immunisation, nous avons utilisé plusieurs stratégies : (1) injection de PBMC totaux d'un donneur répondant en ELISpot IFN- γ anti-AAV8 ; (2) injection de lignée primaire de LT CD8⁺ spécifiques du peptide AAV8-A2 obtenue par TAME et amplifiée (3) injection de lignée primaire de LT CD8⁺ spécifiques du peptide AAV8-A2 obtenue par TAME et amplifiée et co-injectée avec des PBMC totaux du même donneur. Ce transfert adoptif a été réalisé 1 jour après l'injection

d'un AAV8r-CAG-mSEAP à 1×10^{14} vg/kg afin que lors du transfert des LT CD8⁺ anti-AAV8, les antigènes dérivés de la capside et les signaux associés soient déjà disponibles pour favoriser l'activation, la survie et la prolifération des LT injectés (**Figure 29**). Du LPS (Lipopolysaccharides) a également été injecté comme adjuvant. Les souris ont été suivies pendant 1 mois avant d'être sacrifiées pour analyse de l'efficacité du transfert de gène et de la réponse immune.

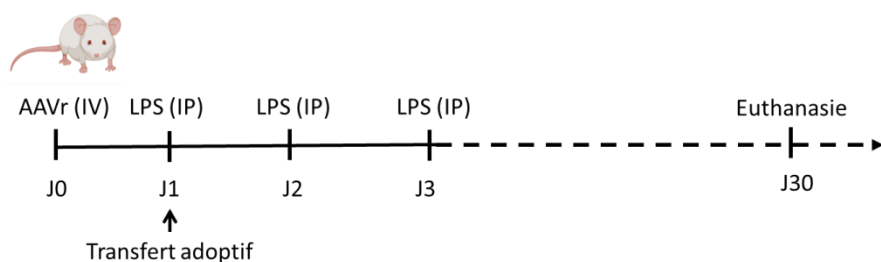


Figure 29: Aperçu du déroulement des expérimentations du modèle murin.

L'AAVr est injecté à J0 par IV. A J1, les souris sont injectées avec du LPS en IP et reçoivent les cellules humaines en IV. Une dose de LPS est également injectée en IP à J2 et J3. Les animaux sont euthanasiés à J30.

II. Matériel et méthodes

A. Production de vecteurs

Les AAV simple brin de sérotype 8 ont été produits par le Centre de Production de Vecteurs de Nantes (<https://umr1089.univ-nantes.fr/plateaux-technologiques/>). Ces vecteurs ont été produits par co-transfection d'HEK293 à l'aide d'un plasmide contenant la séquence codant pour un gène rapporteur murin *Secreted embryonic alkaline phosphatase* (mSEAP) sous le contrôle du promoteur CAG, le signal de polyadénylation de *bovine growth hormone* (BGH) entourée de deux ITR dérivés de l'AAV2 et le plasmide pDP8 contenant les séquences virales nécessaires pour la réplication et l'encapsidation. Les vecteurs ont été purifiés à l'aide d'un gradient de chlorure de césium et les titres ont été déterminés par *Infectious Center Assay* (ICA) et par PCR quantitative (qPCR). Ils sont exprimés en nombre de copies de génome viral par millilitre (vg/mL).

B. Animaux et administration du vecteur

Ces expériences ont été approuvées par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale (CEEA) de Loire-Atlantique et par le ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur (agrément n°7899). Des souris NOD/SCID/HLA-A2 (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl})

Tg(HLA-A/H2-D/B2M)1Dvs/SzJ, Jackson Laboratory) âgées de 6 à 12 semaines ont reçu un ssAAV2/8 CAG mSEAP à 1.10^{14} vg/kg par IV. L'injection des cellules à 1 jour post-injection est également réalisée par IV. L'injection de LPS est réalisée en intrapéritonéale (IP) à J1, 2 et 3 après injection d'AAVr (10ng). Leur poids est ensuite suivi quotidiennement afin de vérifier que la procédure est bien tolérée.

C. Extraction d'ADN et PCR quantitative

L'ADN génomique (ADNg) a été extrait à partir de tissus à l'aide du kit Gentra Puregene (Qiagen). Les ADN du génome vectoriel ont été mesurés par quantification du BGH-pA par PCR quantitative (qPCR) avec le kit Premix Ex-Taq (Takara). Les amorces et la sonde TaqMan utilisées étaient : l'amorce sens 5'-TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT-3', l'amorce anti-sens 5'-TGGGAGTGGCACCTTCCA-3' et la sonde BGH-pA 5'-(6 FAM)-TCCCCCGTGCCTTCCTTGACC-(TAMRA)-3'. La réaction de qPCR était composée d'un cycle de dénaturation de 20 secondes à 95°C suivi de 45 cycles de 1 seconde à 95°C et 20 secondes à 60°C. Les résultats ont été normalisés en quantifiant l'albumine endogène des souris par qPCR avec le kit Sybr Premix Ex Taq (Takara). Les amorces utilisées étaient : amorce sens 5'-ACATAGCTTGCTTCAGAACGGT-3' et amorce anti-sens 5'-AGTGTCTTCATCCTGCCCTAAA-3'. Les qPCR de l'albumine ont été effectués à l'aide du programme suivant : dénaturation initiale de 20 secondes à 95°C suivie de 45 cycles de 3 secondes à 95°C et de 30 secondes à 60°C. Les deux qPCR ont été réalisées avec le thermocycleur StepOne Plus (Thermo Scientific). Pour chaque qPCR, les valeurs seuils du cycle (Ct) ont été comparées à celles obtenues avec des dilutions plasmidiques standard (contenant soit la séquence BGH-pA soit la séquence d'albumine) et les résultats ont été exprimés en génome vecteur par génome diploïde (vg/dg).

D. Isolement des splénocytes

Les splénocytes ont été isolés à partir des rates de souris prélevées à 30 jours post-injection. Les cellules ont été obtenues après dissociation mécanique et enzymatique. Cette dernière consistait en un traitement à la collagénase D (Roche - 2 mg/mL) suivi d'une incubation de 30 à 37°C. De l'EDTA 0,1M pH7,2 est alors ajouté pour arrêter la digestion enzymatique. Les cellules ont été récupérées après passage sur un tamis 70µm (Miltenyi) et centrifugées 10 minutes à 580g à +4°C. Les globules rouges ont été lysés à l'aide d'un tampon de lyse (NH₄Cl, KHCO₃, Na₂EDTA) pendant 10 minutes à température ambiante. Après la lyse, deux lavages ont été réalisés avec 50 mL de PBS-5% SVF. Les culots

cellulaires ont été repris dans du SVF (GE Healthcare) pour la congélation ou dans du milieu RPMI (Lonza) pour une analyse directe.

E. Marquage des PBMC et splénocytes

Après deux lyses des globules rouges avec du tampon de lyse (NH₄Cl, KHCO₃, Na₂EDTA) pendant 10 minutes à température ambiante, les PBMC sont marquées directement alors que les splénocytes sont marqués après isolement. Les anticorps utilisés sont les suivants : anti-mCD45 PercpCy5.5 (BD Biosciences), anti-CD8 evolve 605 (eBiosciences) et anti-hCD45 PeCy7 (BD Biosciences). Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux avec un LSRII (BD Biosciences).

F. Dosage du transgène dans le plasma

Le transgène mSeap est dosé dans le plasma à l'aide du Kit *Phospha-Light System* (Thermo Scientific) selon les recommandations du fabricant. La luminescence est mesurée sur le Victor X-3 Multilabel Plate (Perkin Elmer) et la concentration est calculée par rapport aux mesures obtenues pour la gamme de dilution du standard fournie dans le kit.

III. Résultats

A. Validation de la fonctionnalité du vecteur

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier l'efficacité de notre vecteur dans les souris. Pour cela, 6 souris (3 mâles et 3 femelles) ont été injectées avec le vecteur à une dose de 1×10^{14} vg/kg et 6 souris (3 mâles et 3 femelles) avec du PBS (contrôle négatif).

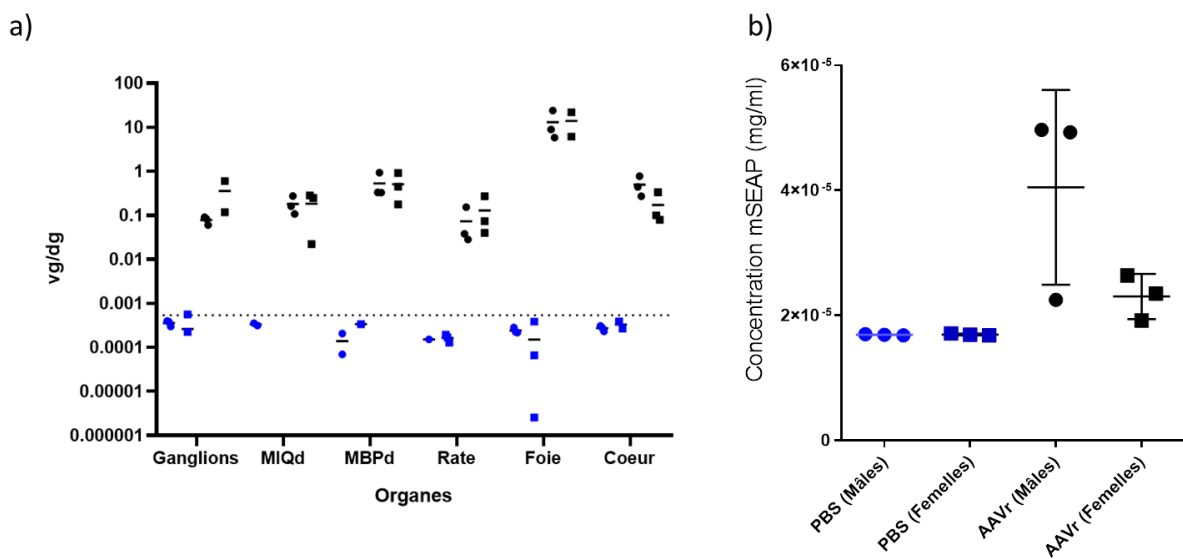


Figure 30 : Validation du transfert de gène via l'AAV2/8-CAG-mSEAP à 30 jours.

Des souris ont été injectées avec AAVr2/8-CAG-mSEAP. Les souris mâles sont représentées par des ronds tandis que les femelles sont représentées par des carrés. Les souris injectées avec du PBS sont en bleu et les souris injectées avec l'AAVr en noir (a) Etude de biodistribution du transgène (b) Dosage du produit du transgène mSeap dans le plasma. MIQd, muscle inférieur quadriceps droit ; MBPd, Muscle pectoral droit.

L'étude de biodistribution de l'ADN viral a permis de détecter la présence de génomes viraux uniquement dans les animaux injectés avec l'AAVr, ils sont détectés dans les muscles (moyenne : 0,35 vg/dg) et dans le foie (moyenne : 13,4 vg/dg) (**Figure 30a**). La transduction est, comme attendue, particulièrement efficace dans le foie. Le produit du transgène (mSeap) a été dosé dans le plasma des souris 30 jours après injection. Celui-ci est bien détecté à de plus fortes concentrations dans les souris injectées avec l'AAVr, le transgène est donc bien exprimé et sécrété (**Figure 30b**). La détection observée dans les souris non injectées est probablement due à un bruit de fond dû aux autres alcalines phosphatases présentes dans le plasma. De manière intéressante, l'expression du transgène était plus faible chez les femelles (moyenne : $2,3 \times 10^{-5}$ mg/ml) par rapport aux mâles (moyenne : 4×10^{-5} mg/ml). Nous avons donc décidé dans un premier temps de mettre au point le modèle sur des souris mâles uniquement.

B. Etude de l'impact du transfert adoptif de PBMC d'un donneur positif en ELISpot IFN- γ anti-AAV8 sur le transfert de gène via un AAV8r.

Une fois le vecteur validé sur le plan fonctionnel, nous avons voulu tester le transfert adoptif de PBMC totales pour immuniser les souris contre l'AAVr. Des souris (n=3) ont donc été injectées avec des PBMC humaines (10M) positives en ELISpot IFN- γ anti-AAV8. En contrôle, des souris (n=2) ont été injectées avec des PBMC (9M) du même donneur mais celle-ci ont été préalablement déplétées en LT CD8⁺ afin d'abroger toute réponse cytotoxique. Les souris ont été suivies pendant 30 jours et n'ont pas présenté de perte de poids. Ils ne semblent donc pas y avoir de GVHD (*Graft versus host disease*) dans ce modèle au moins jusqu'à 30 jours après transfert adoptif. La greffe des PBMC humaines a été évaluée à 30 jours, après euthanasie, dans le sang et les splénocytes (**Figure 31**), les résultats sont résumés dans le **Tableau 6**. Les cellules humaines étaient majoritairement détectables dans les splénocytes (moyenne : 11,81% de hCD45⁺) mais également détectables en faibles quantités dans les PBMC (moyenne : 1,78% de hCD45⁺). De plus, le pourcentage de cellules humaines n'était pas homogène entre les souris. Le pourcentage de LT CD8⁺ parmi ces cellules n'est lui non plus pas homogène.

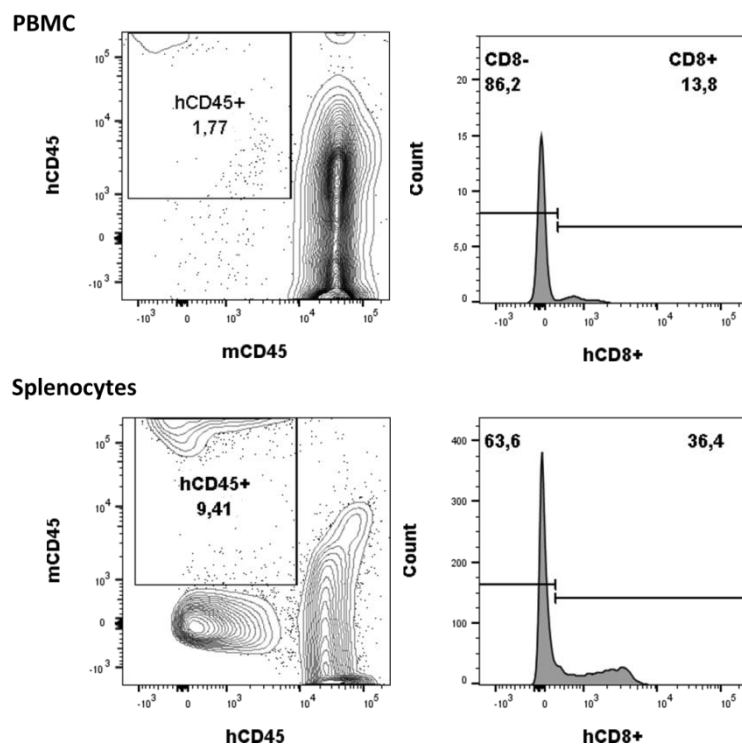


Figure 31: Exemple représentatif de détection des cellules humaines par cytométrie en flux dans le sang et les splénocytes des souris à jour 30, après euthanasie.

L'efficacité du transfert de gène a été également évaluée comme précédemment, les résultats sont regroupés dans le **Tableau 6**. Aucune différence significative n'a été observée entre les 2 groupes, il ne semble donc pas y avoir de destruction des cellules transduites. De plus, les coupes de foies lors de l'euthanasie ont été analysées par coloration HPS (Hémalun, Phloxine, Safran) (**Figure 32**) et aucun infiltrat n'a été observé dans les deux groupes.

Groupe	Souris	Pourcentage de hCD45		Pourcentage de CD8 ⁺ parmi les cellules hCD45 ⁺		Génome vecteur dans le foie (vg/dg)	Concentration du transgène (mg/ml)	Présence d'infiltrats dans le foie
		PBMC	Splénocytes	PBMC	Splénocytes			
Transfert adoptif de PBMC totaux	#394	1,77%	9,41%	13,80%	36,40%	1,02 vg/dg	5,2E-05	Non
	#395	3,35%	34,50%	36,40%	46,60%	0,496 vg/dg	5,2E-05	Non
	#396	0,62%	1,51%	0,27%	18,90%	1,2 vg/dg	5,5E-05	Non
Transfert adoptif de PBMC déplétées en LT CD8 ⁺	#397	3,80%	21,70%	0,36%	9,62%	3,03 vg/dg	8,6E-05	Non
	#398	0,43%	1,57%	1,10%	18,80%	1,28 vg/dg	6,2E-05	Non
	#399	0,60%	2,15%	1,56%	23,70%	0,762 vg/dg	6,7E-05	Non

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des résultats des souris injectées avec des PBMC humaines.

#394 Injectée avec des PBMC

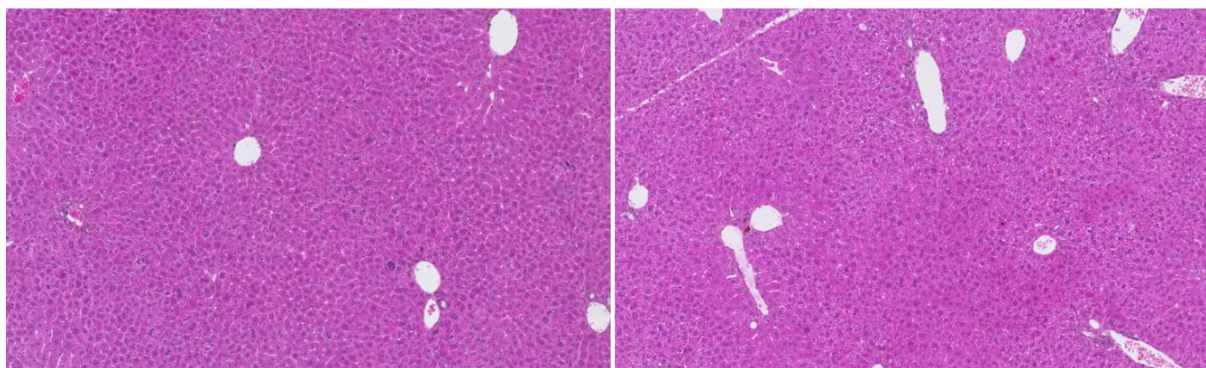
#397 Injectée avec des PBMC déplétées en LT CD8⁺

Figure 32: Exemple représentatif de coupes de foie en coloration Hémalum, Phloxine, Safran (HPS) pour détecter la présence d'infiltrats immuns (x10).

Les PBMC injectées dans les souris, bien que toujours détectables dans le sang et les splénocytes à jour 30 après injection, ne semblent pas avoir d'impact sur le transfert de gène.

C. Etude de l'impact du transfert adoptif de lignée primaire de LT CD8⁺ spécifiques de l'AAV8 sur le transfert de gène via un AAV8r.

Le second groupe a subi un transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifiques du peptide immunodominant AAV8-A2 obtenu par TAME et expansion afin d'immuniser les souris contre l'AAVr (cf. p143). Nous avons choisi des LT CD8⁺ spécifiques de l'AAV8 issus du donneur #8279 en raison de leur forte cytotoxicité *in vivo* (cf. p135). Des souris (n=3) ont donc été injectées avec des LT CD8⁺ anti-AAV8 (5M). En contrôle, des souris (n=2) ont été injectées avec la lignée primaire de LT CD8⁺ non spécifiques de l'AAV (CTRL) du même donneur (5M). Les souris ont été suivies pendant 30 jours et ne présentaient aucune perte de poids suggérant l'absence de GVHD. La greffe des PBMC humaines a été évaluée à jour 30 (euthanasie) dans le sang et les splénocytes (**Tableau 7**). Les cellules humaines ont été détectées à de très faibles fréquences dans le sang (moyenne : 1,48% de hCD45) et les splénocytes (moyenne : 2% de hCD45) dans les 2 groupes. De plus le pourcentage de LT CD8⁺ parmi ces cellules était également faible. La survie des cellules injectées semble donc très faible.

Groupe	Souris	Pourcentage de hCD45 ⁺		Pourcentage de CD8 ⁺ parmi les cellules hCD45 ⁺		Génome vecteur dans le foie (vg/dg)	Concentration du transgène (mg/ml)	Présence d'infiltrats dans le foie
		PBMC	Splénocytes	PBMC	Splénocytes			
Transfert adoptif de LT CD8 ⁺ anti-AAV8	#323	0,69%	1,82%	0,78%	16,50%	11,7	3,2E-05	Non
	#324	1,26%	1,84%	0%	17,60%	9,53	2,4E-05	Non
	#325	0,42%	2,62%	2,80%	27,70%	17,7	3,4E-05	Non
Transfert adoptif de LT CD8 ⁺ CTRL	#326	4,34%	2,10%	0,32%	50,60%	7,28	2,1E-05	Non
	#327	0,70%	1,60%	7,07%	33,80%	8,4	2,6E-05	Non

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des résultats des souris injectées avec les lignées primaires de LT CD8⁺.

L'efficacité du transfert de gène a tout de même été réalisée afin de déterminer si les LT CD8⁺ ont eu un impact sur le transfert de gène. Les résultats sont regroupés dans le **Tableau 7**. La quantification des génomes du vecteur et le dosage du produit du transgène n'ont montré aucune différence significative entre les deux groupes. Il ne semble donc pas y avoir d'impact sur le transgène donc pas de destruction des cellules transduites. De plus, des coupes de foies ont été analysées et aucun infiltrat n'a été observé.

D. Etude de l'impact du transfert adoptif de LT CD8⁺ anti-AAV8 co injectées avec des PBMC totaux sur le transfert de gène via un AAV8r.

Suite aux résultats précédents, nous avons émis l'hypothèse que l'absence de réponse cytotoxique serait due à une faible survie des cellules ou à une faible fonctionnalité en raison de l'absence des signaux de *help* fournis par les autres cellules immunitaires. Pour cela, le troisième groupe a reçu en plus des lignées, les PBMC totales du même donneur. Des souris (n=3) ont donc été injectées avec une lignée primaire de LT CD8⁺ spécifiques du peptide immunodominant de l'AAV8 restreint au HLA-A2 (2M). En contrôle, des souris (n=3) ont été injectées avec des LT CD8⁺ non spécifiques de l'AAV (lignée CTRL) du même donneur (2M). En même temps que les LT CD8⁺, des PBMC du même donneur ont été injectées à chaque souris (8M). Les souris ont été suivies pendant 30 jours et ne présentaient aucune perte de poids. Ils ne semblent donc pas y avoir de GVHD. La greffe des PBMC humaines a été évaluée à jour 30 (euthanasie) dans le sang et les splénocytes (**Tableau 8**). Les cellules injectées semblent majoritairement présentes dans le sang (moyenne : 17,7% d'hCD45⁺) mais sont également présentes dans les splénocytes (moyenne : 3% d'hCD45⁺). Le pourcentage de LT CD8⁺ détectés reste faible.

Groupe	Souris	Pourcentage de hCD45 ⁺		Pourcentage de CD8 ⁺ parmi les cellules hCD45 ⁺		Génome vecteur dans le foie (vg/dg)	Concentration du transgène (mg/ml)	Présence d'infiltrats dans le foie
		PBMC	Splénocytes	PBMC	Splénocytes			
Transfert adoptif de PBMC et LT CD8 ⁺ anti-AAV8	#541	N.A.	3,86%	N.A.	0,66%	7,45	3,9E-05	Non
	#542	7,05%	4,99%	1,62%	0,63%	16	6,4E-05	Non
	#543	2,40%	2,42%	1,62%	2,03%	9,37	4,6E-05	Non
Transfert adoptif de PBMC et LT CD8 ⁺ CTRL	#544	14,90%	3,08%	0,57%	1,54%	9,25	4,2E-05	Non
	#549	13,60%	1,16%	0,73%	1,39%	10,5	5,2E-05	Non
	#555	48,40%	2,66%	0,09%	3,35%	7,86	3,3E-05	Non

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des résultats des souris injectées avec les LT CD8⁺ et les PBMC.

La détection de transgène dans le foie n'a pas montré de différence entre les deux groupes, tout comme le dosage de la mSEAP. Là encore, les coupes de foie ne montrent aucun infiltrat. Les résultats semblent indiquer qu'il n'y a pas eu de réponse dirigée contre les cellules transduites par l'AAV.

IV. Conclusion et discussion

Dans cette partie, nous avons travaillé à l'élaboration d'un modèle de souris permettant reproduire la réponse cellulaire anti-capside observée chez l'homme.

Le premier groupe, nous a permis de valider notre vecteur mais a également montré une expression moindre du transgène chez les femelles malgré une efficacité de de transduction du même ordre que chez les mâles. Cette différence dans l'expression du transgène entre les sexes lors d'un transfert de gène via un AAV chez la souris a déjà été observée (Ogura et al., 2006). De plus, une autre étude a montré que le sexe pouvait avoir un impact sur l'efficacité de transduction dans le foie avec un AAV (Davidoff et al., 2003). Cela souligne l'impact important du sexe des animaux sur le transfert de gène. Ces résultats nous ont conduits à poursuivre nos expérimentations uniquement sur des souris mâles. Toutefois, nous envisageons une étude ultérieure pour nous permettre d'élucider la question de la différence de réponse immune entre mâles et femelles.

Le groupe de souris injecté avec les PBMC d'un donneur positif contre l'AAV8 en ELISpot IFN- γ n'a pas montré de diminution du transgène dans le foie. Il ne semble donc pas y avoir de destruction des cellules transduites. Néanmoins, il est important de préciser que les 3 souris ont été injectées avec les PBMC d'un seul donneur et qu'il serait intéressant de tester les PBMC d'autres donneurs positifs en ELISpot IFN- γ anti-AAV8 afin de voir si une réponse peut-être observée.

Nous avons ensuite injectés uniquement des LT CD8⁺ spécifiques de l'AAV8 obtenus par TAME afin de favoriser la réponse mais là encore sans succès. Ces cellules avaient pourtant été montrées cytotoxiques en réponse à des cellules chargées avec des peptides de l'AAV8. Mais aucune diminution du nombre de cellules transduites n'a été observé par rapport au groupe contrôle. Il semble donc que ces cellules ne soient pas cytotoxiques *in vivo*. Nous avons émis l'hypothèse que cette absence de cytotoxicité pouvait être due à l'absence du contexte cytokinique fourni par les autres cellules immunitaires du fait du contexte NOD/SCID des souris. Dans le groupe suivant, nous avons donc co-injecté les LT CD8⁺ spécifiques de l'AAV8 avec des PBMC issues du même donneur. Et malgré, le fort

pourcentage de cellules humaines détectées dans le sang et donc la meilleure prise de greffe des cellules, aucun infiltrat n'a été détecté dans le foie et il ne semble pas y avoir de destruction des cellules transduites.

La complexité de la mise au point de ce modèle réside dans les nombreux paramètres à prendre en compte. Si nos tentatives précédentes ont échoué à reproduire la destruction des hépatocytes transduits observée chez l'Homme, de nombreuses pistes restent à explorer. En premier lieu, il est possible que notre choix de cinétique pour l'analyse, nous fasse passer à côté d'une réponse. En effet, dans l'étude Martino et al., des infiltrats de LT CD8⁺ sont détectables dans le foie à 7 jours mais plus à 28 jours (Martino et al., 2013). Il est également possible que les cellules humaines réagissent plus tardivement que les cellules murines. Dans nos conditions expérimentales préliminaires, nous avons opté pour injecter le vecteur un jour avant les cellules afin de permettre le processing intracellulaire de la capsid. Il est néanmoins peut-être nécessaire d'injecter les cellules au préalable avant le vecteur afin de leur permettre de s'installer dans l'environnement murin et donc de favoriser leur fonctionnalité (expériences en cours). Une étude de cinétique avec un suivi par dosage des cytokines ou des transaminases par exemple pourrait être envisagée afin de déterminer la meilleure cinétique.

Au vue de la grande variabilité dans le pourcentage d'humanisation des souris au sein d'un même groupe et du faible pourcentage de LT CD8⁺ observé chez certains individus, il est possible que l'absence de réponse soit due à une forte mortalité des LT CD8⁺ humaines. Le nombre de cellules présentent *in fine* serait alors trop faible pour observer une réponse cytotoxique. Une option serait alors d'augmenter le nombre de cellules injectée. Néanmoins il est important de garder en tête que plus le nombre de cellules injectées est grand plus le risque de voir l'apparition de la GVHD est important. Il faudrait donc déterminer dans notre modèle NSG, comme cela a été fait dans le contexte de modèles infectieux, allogéniques ou tumoraux (Tu et al., 2011; Zheng et al., 2013), les paramètres optimaux pour éviter ou simplement décaler la GVHD sans compromettre la réponse immunes souhaitées des cellules transférées.

Une autre option afin de favoriser, la survie des cellules injectées est d'envisager de les co-injecter avec des cytokines comme l'IL-2 ou l'IL-15 qui favorise la survie et la prolifération des LT CD8⁺ (Durost, 2017; Lodolce et al., 1998).

Dans l'article « *Tetramer-based enrichment of preexisting anti-AAV8 CD8⁺ T cells in human donors allows the detection of a TEMRA subpopulation* » présenté précédemment, nous avons vu que lors de l'amplification des LT CD8⁺ anti-AAV8 ceux-ci perdaient leur

phénotype T_{EMRA}, ce qui pourrait avoir un impact sur la réponse obtenue *in vivo*. Une solution serait donc d'injecter les cellules sans amplification mais au vu du faible nombre de cellules obtenues cela risque d'être non pertinent.

Il est également possible que les cellules de souris ne présentent pas efficacement les peptides de l'AAV8 sur le CMH de classe I. En effet, la biodistribution d'un sérotype varie d'une espèce à l'autre, les interactions entre le vecteur et les cellules sont donc différentes. En absence de présentation du peptide adéquat, la reconnaissance par les LT CD8⁺ anti-AAV8 n'aurait donc pas lieu. Une option serait alors d'utiliser un modèle NSG également humanisé au niveau du foie et injecté avec l'AAV (Hashimoto et al., 2016; Lisowski et al., 2014) afin de favoriser la présentation des épitopes de capside et le ciblage cytotoxique des cellules transduites. Des modèles de souris humanisées à la fois au niveau du système immunitaire et du foie ont également été développés pour l'étude d'infections virales et pourraient également être envisagés dans notre étude (Strick-Marchand et al., 2015).

Les études de souris avec un foie humanisé ont montré que la transduction des hépatocytes murins et humains par l'AAV8 était différente, l'utilisation d'autres sérotypes pourrait donc être envisagée. Nous avons montré dans la première partie des résultats de cette thèse que l'AAV9 semblait avoir un profil particulier. Il serait donc particulièrement intéressant de tenter d'élaborer un modèle avec ce sérotype. Cela nécessiterait la mise au point du TAME pour isoler les LT CD8⁺ spécifiques de l'AAV9.

Enfin et dans le cas où l'injection de PBMC avec les LT s'avèrerait non concluante malgré toutes ces pistes d'optimisation, nous pourrions utiliser un modèle d'humanisation basé sur l'injection de cellules CD34 humaines qui permettrait de reconstituer l'ensemble du système immunitaire. En revanche, ce modèle ne permet pas de screener les donneurs sur la base d'une immunité pré-existante contre l'AAV.

En résumé :

- **Notre vecteur AAV8r-CAG-mSeap permet une bonne transduction du foie et une expression transgène dans le sérum.**
- **L'expression du transgène est plus faible chez les femelles.**
- **Le transfert adoptif de PBMC issus d'un donneur présentant une immunité cellulaire anti-AAV8 n'a pas permis d'observer une destruction des cellules transduites.**
- **Le transfert adoptif de lignée primaire de LT CD8⁺ spécifiques du peptide immunodominant de l'AAV8 restreint au HLA-A2 n'a pas permis la mise en place d'une réponse cytotoxique contre les cellules transduites par l'AAV8 dans le foie.**
- **Le transfert adoptif de lignée primaire de LT CD8⁺ spécifiques de l'AAV8 accompagné de PBMC du même donneur n'a pas non plus permis d'observer une réponse cytotoxique dirigée contre les cellules transduites par l'AAV8 dans le foie.**
- **La variation de différents paramètres comme le nombre de cellules injectées, la cinétique, le serotype du vecteur ou la co-injection de cytokines pourrait nous permettre d'obtenir un modèle pertinent.**

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Afin d'éviter toute redondance avec les articles présentés dans les résultats, dans cette partie nous ne traiterons que les questions qui nécessitent une réflexion plus approfondie.

L'immunité préexistante anti-AAV : une prévalence difficile à évaluer.

Actuellement avant un essai clinique de transfert de gène par voie systémique à l'aide d'AAVr, l'immunité préexistante humorale anti-AAV est évaluée par un test de neutralisation (associé ou non à un ELISA). Dans ce contexte, de nombreuses études de séroprévalences ont été réalisées (**Tableau 3**). La réponse cellulaire quant à elle est évaluée par ELISpot IFN- γ et la prévalence est beaucoup moins décrite (**Tableau 4**). Dans la première partie des résultats, l'importance de l'immunité cellulaire préexistante dans la population contre les différents sérotypes est évaluée. Dans la publication « *Cellular AAV serotype prevalence study in healthy humans reveals particular features for AAV9 serotype* », de façon inattendue, les réponses humorales et cellulaires anti-AAV8 et anti-AAV9 étaient plus fréquentes que les réponses anti-AAV2 dans notre cohorte. La fréquence plus élevée de la réponse immune contre l'AAV8 par rapport à l'AAV2 a également été observée dans la cohorte de la publication « *Tetramer-based enrichment and phenotyping of preexisting anti-AAV CD8⁺ T cells in human donors allows the detection of a Temra subpopulation* ». Une corrélation significative a été mise en évidence entre les titres d'anticorps anti-AAV2 et anti-AAV8 (résultats non présentés), ce qui reflète probablement une réactivité croisée des anticorps entre les deux sérotypes. Par conséquent, la prévalence plus élevée des réponses anticorps anti-AAV8 observée pourrait, en partie, être due à la détection des anticorps à la fois anti-AAV2 et anti-AAV8 en ELISA anti-AAV8. La prévalence pourrait également être cohorte dépendante, il a en effet été montré que la séroprévalence pouvait différer en fonction de l'âge, de l'état de santé et de l'origine géographique de la cohorte. Une séroprévalence élevée pour l'AAV8 (82%) a notamment été déjà montrée dans une cohorte chinoise saine (Liu et al., 2014).

Concernant les résultats des tests ELISpot anti-AAV IFN- γ , aucun donneur n'a répondu uniquement contre l'AAV2 : ils ont tous également répondu à l'AAV8 et à l'AAV9. Cela n'est pas surprenant, car les épitopes des lymphocytes T CD8⁺ dérivés de la capsid d'AAV sont fortement conservés entre les sérotypes (Hui et al., 2015). En revanche, le contraire n'est pas vrai, puisque 70 % des donneurs ayant répondu positivement à l'AAV8 et

88 % des donneurs ayant répondu positivement à l'AAV9 n'ont pas répondu à l'AAV2 ce qui signifie que la réactivité croisée n'est pas forcément à double sens.

Ces résultats semblent indiquer que l'immunité cellulaire anti-AAV8 et anti-AAV9 pourrait être attribuée à un ou plusieurs épitopes dérivés de la capsid de l'AAV8 et de l'AAV9 qui ne sont pas partagés avec la séquence de la capsid de l'AAV2. Comme nous avons identifié les pools de peptides auxquels les donneurs de nos cohortes ont répondu de préférence (**Table I de l'étude I**), il pourrait être envisagé de construire une matrice peptidique pour identifier le(s) peptide(s) responsable(s) des réponses anti-AAV2, anti-AAV8, anti-AAV9 et ainsi voir si ils sont communs aux 3 capsides. Des peptides immunodominants restreints à certains allèles de HLA ont d'ailleurs déjà été identifiés pour l'AAV2 et l'AAV8. Cette forte prévalence de la réponse cellulaire anti-AAV8 et anti-AAV9 dans notre cohorte pourrait être simplement due aux variations dues à l'origine géographique de la cohorte, comme discuté ci-dessus pour la réponse humorale. En effet, l'une des étude de prévalence cellulaire dirigée contre l'AAV a montré une prévalence de l'immunité cellulaire anti-AAV8 similaire à celle de l'AAV2 (Kruzik et al., 2019b).

Afin de confirmer cela, une évaluation de l'histoire naturelle de l'infection par l'AAV sauvage dans notre cohorte serait idéale mais est malheureusement difficilement réalisable du fait de l'indisponibilité des prélèvements. En effet, l'évaluation longitudinale de la présence de particules virales infectieuses AAV2, AAV8 ou AAV9 dans des échantillons humains (sang total, sérum, biopsies tissulaires...) pourrait fournir un aperçu des taux de recirculation de ces sérotypes. Une autre alternative plus accessible est d'évaluer la présence d'anticorps IgM anti-AAV en plus des IgG afin de mieux déterminer la cinétique d'infection.

Nous n'avons pas observé de corrélation entre l'immunité préexistante cellulaire et humorale anti-AAV2, anti-AAV8 et anti-AAV9. Cela avait déjà été montré pour l'AAV1 (Veron et al., 2012), AAV2 (Mingozzi et al., 2007a), l'AAV8 et l'AAV5 (Kruzik et al., 2019b). A l'heure actuelle, les mécanismes à l'origine de ce découplage ne sont pas bien compris, ils sont probablement dépendants de paramètres multiples. Par exemple chez le primate non-humain selon la voie d'infection, des anticorps anti-AAV peuvent-être induits en l'absence de virus *helper* mais à priori pas la réponse cellulaire (Hernandez et al., 1999). L'absence de corrélation entre l'immunité humorale et cellulaire anti-AAV, la cross-réactivité entre les sérotypes, les variations de prévalences géographiques associées à la diversité de sensibilité des protocoles utilisés et l'absence de leur standardisation pour l'évaluation de

cette prévalence rend celle-ci difficile à évaluer pour un sérotype donné. Les études de prévalence bien qu'instructives ne semblent donc pas être la solution pour l'identification d'un sérotype faiblement immunogène parmi les variants naturels et semblent donc plutôt encourager la génération de variants synthétiques échappant à la neutralisation.

Le TAME : une alternative à l'ELISpot IFN- γ ?

Il a été montré que l'ELISpot IFN- γ n'était pas prédictif de la réponse cytotoxique (Mingozzi and High, 2013). Dans un premier temps, la raison principale envisagée a été le manque de sensibilité de la technique. C'est dans l'optique de palier à ce manque de sensibilité, que nous avons utilisé le TAME qui est beaucoup plus sensible (limite de détection de 1×10^{-7} PBMC (versus 5×10^{-5} à 1×10^{-6} pour l'ELISpot). Dans la publication « *Tetramer-based enrichment of preexisting anti-AAV CD8⁺ T cells in human donors allows the detection of a Temra subpopulation* », nous avons démontré que les LT CD8⁺ spécifiques de la capsid de l'AAV2 et de l'AAV8 peuvent être détectés chez tous les donneurs sains grâce à la stratégie d'enrichissement par tétramères soit avec un seul tétramère chargé avec l'épitope immunodominant ou avec un pool de tétramères chargés avec des peptides différents. Néanmoins, chez certains donneurs cette détection pourrait être due à une réaction croisée avec des LT CD8⁺ qui ne sont pas spécifiques des antigènes de la capsid de l'AAV, comme cela a déjà été démontré dans d'autres études utilisant la même méthode (Pittet et al., 1999; Voelter et al., 2008). Aucune corrélation n'a pu être établie entre les fréquences *ex vivo* globales de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'AAV (déterminés après TAME) et de la sécrétion d'IFN- γ (mesurée à l'aide de l'ELISpot sur des PBMC totaux). Ces résultats semblent indiquer que la détection des cellules spécifiques de l'AAV n'est pas suffisante à la prédiction d'une réponse cytotoxique en cas de transfert de gène et que des mécanismes fonctionnels plus complexes sont impliqués.

De plus, le TAME présente plusieurs limitations techniques qui pourraient restreindre son utilisation dans les essais cliniques par rapport à l'ELISpot. L'identification des complexes pertinents afin de construire des tétramères est nécessaire, les épitopes immunodominants de classe I du CMH de type AAV1, AAV2 et AAV8 dérivés pour les types HLA courants (Hui et al., 2015) ont déjà été identifiés mais d'autres sérotypes AAV présentant une homologie moindre avec AAV2 n'ont pas été couverts. Il pourrait également être nécessaire d'identifier des épitopes sous-dominants pour anticiper la possibilité de réponses polyclonales. Même si ce travail était réalisé le risque de passer à côté d'une réponse

via un épitope atypique restera présent. Le nombre de cellules requises pour le TAME (au moins 5 fois supérieur au test ELISpot) est également un inconvénient important lorsque seule une faible quantité de sang peut être prélevée. De plus, contrairement à l'ELISpot, il ne donne pas d'aperçu direct de la fonctionnalité et nécessite une expansion des cellules qui peut induire un biais, du fait du nombre restreint de cellules enrichies. Les tétramères permettent seulement d'évaluer la capacité d'un TCR donné à lier les complexes pCMH (reconnaissance peptidique), mais ils ne donnent aucune information sur la fonctionnalité. En effet cette interaction ne permettra pas forcément une activation et une différenciation des lymphocytes T CD8⁺. Cela est particulièrement vrai dans notre contexte, où nous n'avons observé aucune corrélation entre les fréquences *ex vivo* des LT CD8⁺ spécifiques d'AAV et les réponses en ELISpot IFN γ anti-AAV. Ce sont pourtant bien les LT CD8⁺ spécifiques de la capsid de l'AAV et non les LT CD4⁺ qui répondent en ELISPOT IFN- γ .

Le TAME a néanmoins permis de mettre en évidence la présence simultanée de LT naïfs et d'une sous-population de cellules mémoires effectrices T_{EMRA} parmi les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'AAV8. Une corrélation a été établie entre le pourcentage de T_{EMRA} parmi les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'AAV et de la sécrétion d'IFN- γ en réponse aux peptides de la capsid. Les T_{EMRA} sont des lymphocytes T très différenciés avec une faible capacité de prolifération mais une capacité pro-inflammatoire élevée notamment par une forte sécrétion d'IFN- γ et de molécules cytotoxiques (D'Asaro et al., 2006; Geginat et al., 2003). Le phénotype de mémoire effectrice T_{EMRA} étant souvent décrit dans les infections virales chroniques (Meyer-Olson et al., 2010; Shen et al., 2010b), cela semble montrer que certains LT CD8⁺ spécifiques de l'AAV8 ont été chroniquement exposés à leur antigène. Si la chronicité de l'infection par l'AAV n'a jamais été démontrée, il existe cependant des indices qui la suggèrent fortement comme le fait qu'un fort pourcentage de personnes de moins de 60 ans présentant des IgG anti AAV1 présente également aussi des IgM anti-AAV1. Ce sous-type est souvent rencontré durant une infection en cours (Erles et al., 1999; Murphy et al., 2009). Reste à savoir si ces antigènes résultent de la dégradation de particules AAV infectieuses entières (ce qui indiquerait des infections AAV récurrentes) ou de l'expression de séquences de Cap endogènes persistant en latence dans les cellules hôtes.

L'évaluation fonctionnelle et multiparamétrique : un outil de prédiction plus pertinent ?

Les tétramères pourtant plus sensibles que l'ELISpot IFN- γ suggèrent que la difficulté de prédiction par ELISpot de la réponse cytotoxique observée en essai clinique pourrait être plutôt due à une évaluation de la fonctionnalité inadaptée ou incomplète (un seul paramètre en ELISpot enzymatique).

Afin de tester l'aspect fonctionnel des cellules isolées par TAME, nous avons généré des lignées de LT CD8⁺ spécifiques de l'AAV8. Nous avons montré que celles-ci étaient cytotoxiques *in vitro*. En revanche, il est important de noter que l'expansion entraîne un changement dans le phénotype de ces cellules, il est donc également possible que l'expansion change le profil cytokinique et fonctionnel de ces cellules et ne reflète donc pas la fonctionnalité *in vivo* de ces cellules. Pour avoir un aperçu de la fonctionnalité des LT CD8⁺ spécifiques de l'AAV sans biais dus à l'expansion, il faudrait réaliser un marquage intracellulaire de cytokines (ICS) sur des cellules prélevées après TAME. Malheureusement, la fixation et la perméabilisation de cellules qui avaient déjà été affaiblies après traitement sur une colonne magnétique ont entraîné une perte trop importante de cellules viables pour être interprétées.

Ici, nous avons utilisé l'enrichissement en tétramère de classe I du CMH pour étudier les lymphocytes T CD8⁺, mais il ne faut pas oublier que les lymphocytes T CD4⁺ pourraient également être impliqués dans les réponses cellulaires spécifiques de l'AAV comme semble l'indiquer notre premier axe de recherche (cf. p101) et les résultats de Li *et al.* qui montrent que la stimulation de PBMC humaines avec des peptides dérivés de la capsid AAV2 permet la détection lymphocytes T CD4⁺ (Li et al., 2011a). L'élaboration d'une stratégie d'enrichissement à l'aide de tétramères de CMH de classe II, afin d'étudier le phénotype et la fonctionnalité des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques des AAV, pourrait permettre de mieux comprendre l'état des réponses immunitaires.

Nos résultats obtenus par Fluorospot et présentés dans le manuscrit I montrent des profils cytokiniques variables selon les donneurs et soulignent donc l'importance d'étudier plusieurs cytokines pour caractériser la réponse cellulaire. Chez certains, la détection d'IFN- γ n'est pas systématiquement corrélée avec la détection d'IL-2 ou de TNF- α . D'après une étude récente, la sécrétion de TNF- α a par les LT CD8⁺ spécifiques de l'AAV semble être corrélée avec la séropositivité des donneurs pour l'AAV (Kuranda et al., 2018). Ces résultats

soulignent, là encore, la limitation de l'ELISpot IFN- γ et l'importance d'évaluer d'autres cytokines pour détecter les réponses cytotoxiques. Par ailleurs, la perte de la sécrétion d'IL-2 et de TNF- α pourrait être associée avec un profil cytokinique de LT épuisés (Fuller et al., 2004; Wherry et al., 2003). Ceci est associé à la surexpression de marqueurs sur les cellules T impliqués dans l'inhibition d'une réponse cytotoxique médiée par les LT CD8⁺ ou encore l'initiation d'une tolérance tels que PD1 (*Programmed cell death*). Les LT épuisés ont déjà été décrits dans le contexte de l'injection *in vivo* d'AAVr. En effet, dans un essai clinique pour le déficit en AAT, les résultats à 5 ans post-injection montrent toujours une expression du transgène associée à un épuisement des LT CD8⁺ cytotoxiques spécifiques de la capsid et à l'induction de Treg spécifiques de l'AAV détectés *in situ* au niveau du site d'injection IM du vecteur (Mueller et al., 2013, 2017). La possibilité de détecter la présence de Treg spécifiques de la capsid de l'AAV en périphérie pourrait être envisagée comme un moyen utile dans le suivi de la réponse immune cellulaire.

Dans l'ensemble, bien que nous ayons recueilli plus d'informations concernant la réponse immune cellulaire propre aux AAV, nous ne sommes toujours pas en mesure de prédire son impact sur le transfert de gènes via l'AAVr. Néanmoins, il nous semble évident qu'une caractérisation plus poussée de la réponse cellulaire anti-AAV est nécessaire afin de développer des lectures fonctionnelles permettant d'évaluer plusieurs paramètres à la fois pour établir une "signature" immunologique globale. Il serait notamment intéressant d'utiliser le Fluorospot dans le cadre d'un essai clinique afin d'essayer d'identifier une corrélation entre les différents profils cytokiniques et la réaction cellulaire anti-AAV détectable chez certains patients.

En conclusion, la combinaison de l'enrichissement des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la capsid AAV à partir des PBMC (par TAME par exemple) à des lectures phénotypiques et polyfonctionnelles (comme le Fluorospot) permettrait peut-être d'identifier une corrélation entre les différents profils cytokiniques et la réaction cellulaire anti-AAV détectable chez certains patients ainsi qu'une surveillance en temps réel de cette réponse, permettant ainsi une meilleure gestion clinique. L'un de ces exemples est la mise au point d'approches de type « omics » générales appelées « immunomique » qui à partir de techniques haut débit et d'analyse bio-informatique comme l'analyse de transcriptome par RNAseq ou d'un large éventail de marqueurs cellulaires par CyTOF a permis d'identifier avec succès des marqueurs biologiques de l'évolution de maladie dans un grand nombre d'applications en

immunologie clinique (ex : auto-immunité, infections virales, vaccination, ou encore immunothérapie anti-tumorale...) (Tremoulet and Albani, 2005). Ces techniques sont désormais largement développées et permettent maintenant l'analyse à l'échelle d'une unique cellule. Dans le cas de l'utilisation de ces technologies, la taille de l'échantillon ne serait donc plus un obstacle et l'utilisation de ces technologies est d'ailleurs en cours de développement au sein de notre laboratoire afin d'évaluer la réponse immune innée contre l'AAV et également la réponse immune adaptative *in situ* contre l'AAV.

L'immunité innée anti-AAV : quel impact sur l'immunité adaptative ?

En plus de l'évaluation multiparamétrique et fonctionnelle de l'immunité adaptative, les avancées récentes semblent également indiquer que l'évaluation de l'immunité innée devrait être intégrée dans cette évaluation globale de l'immunité anti-AAV.

Les premières études sur l'interaction entre l'AAV et l'immunité innée ont montré que l'AAV (de sérotype 2 notamment) ne déclenchait pas ou peu l'immunité innée (Zaiss et al., 2002). Mais il a été démontré que si l'AAV déclenchait faiblement une réponse inflammatoire, il semble tout de même avoir un impact sur l'immunité innée qui a son tour peut activer la réponse adaptative. Ces dernières années, de plus en plus d'études s'intéressent à cette thématique. Il a notamment été montré chez la souris que les pDC et cDC pouvaient collaborer pour activer la présentation croisée aux LT CD8⁺ spécifiques de la capsid (Rogers et al., 2017). L'équipe de Mingozzi *et al.* a également montré une activation par l'AAV des moDC dépendante du TLR2 et du CD14, résultant en une sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-6. En revanche, ils n'ont pas déterminé si cette activation était due à une interaction directe avec la capsid ou à une interaction avec un autre type de DC. La neutralisation de l'IL-1 β et de l'IL-6 diminue considérablement la fréquence des cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques des AAV et les taux d'anticorps anti-AAV2, ce qui confirme l'impact de la réponse innée sur la réponse adaptative anti-AAV. Par ailleurs, l'implication de la voie TLR9 MYD88 a été démontrée dans le déclenchement de la réponse adaptative contre la capsid qu'elle soit humorale ou cellulaire (Faust et al., 2013; Martino et al., 2011a; Sudres et al., 2012; Zhu et al., 2009). De même, la signalisation TLR9-MyD88 s'est avérée cruciale pour la réponse des lymphocytes T CD8⁺ contre le produit du transgène dans le transfert de gènes (Butterfield et al., 2019). Les cellules NK pourraient également jouer un rôle important dans l'induction de la réponse anti-AAV. Chez les individus séronégatifs, la sécrétion d'IFN- γ en réponse à

l'AAV (AAV2, 5 et 8) serait due à une sous-population de cellules NK capables de reconnaître l'AAV (Kuranda et al., 2018). Des études récentes ont montré l'existence de cellules NK mémoires spécifiques dans l'immunité virales (Nabekura and Lanier, 2016; Reeves et al., 2015). Il est également intéressant de noter que des LT CD8⁺ présentant des récepteurs de NK, et donc nommé LT CD8⁺ NK-like, ont été décrit dans des cas d'infections virales (Björkström et al., 2008; Tao et al., 2002).

Le système du complément en plus de compléter la réponse immune médiée par les anticorps semble également avoir un impact sur celle-ci en interagissant précocement avec des capsides intactes ou dégradées de l'AAV. Le développement d'anticorps neutralisant anti-AAV est fortement diminué chez des souris déficientes pour le C3 ou des récepteurs du complément (Zaiss et al., 2008). Il pourrait également moduler la réponse des LT soit par une interaction directe soit par une interaction indirecte en modulant la maturation et le profil d'expression des CPA (Kemper and Atkinson, 2007). L'activation du complément dans le cadre d'un transfert de gène a été décrite lors d'un essai clinique avec un AAV9r microdystrophine (5×10^{13} vg/kg). Un patient a montré une diminution des plaquettes et des globules rouges ainsi qu'une activation du complément (Solid Biosciences ; Communiqué de presse du 18/04/2018). Cette activation a également été observée dans un autre essai clinique pour la DMD avec un AAV9r exprimant une minidystrophine (1×10^{14} vg/kg) où un patient a montré une activation du complément associée à des lésions rénales aiguës, une hémolyse et une diminution des plaquettes (Pfizer ; Communiqué de presse du 28/06/2019). Il est important de noter que dans ces deux essais le vecteur est un AAV9r. Or une autre étude pré-clinique menée par l'équipe de Wilson chez le singe et le cochon avec un variant de l'AAV9 a montré une toxicité sévère avec notamment une atteinte rénale. Cette toxicité pourrait être là encore due à une activation du complément (Hinderer et al., 2018). Nous avons montré dans l'étude I que l'AAV9 semblait particulier en terme de réponse immune adaptative, cette différence pourrait donc en partie être due à une activation plus forte du complément par ce serotype.

Cette implication de l'immunité innée dans la mise en place d'une immunité adaptative pourrait également expliquer l'absence d'un modèle animal permettant de reproduire ce qui est observé chez l'Homme. En effet, les mécanismes de l'immunité innée diffèrent d'une espèce à l'autre. Par exemple, chez la souris, le modèle d'expression et la régulation du TLR2 et du TLR9 sont différents (Mestas and Hughes, 2004). Le TLR2 est

impliqué dans la formation d'anticorps anti-AAV chez l'Homme (Hösel et al., 2012) ce qui n'est pas le cas chez la souris (Rogers et al., 2017).

L'ensemble de ces études nous conduit à penser qu'il serait intéressant et utile d'inclure des mesures de l'immunité innée (sécrétion d'IL-1beta et d'IL6, caractérisation des NK, activation des DC) dans l'immunomonitorage en essai clinique afin de mieux comprendre la réponse innée chez l'homme en cas de transfert de gène et peut-être de trouver des paramètres prédictifs de la réponse cytotoxique contre la capsid de l'AAV.

L'immunité anti-AAV en périphérie : un bon indicateur de la réponse *in situ*?

Il est important de noter que dans nos études, nous sommes concentrés sur la caractérisation de l'immunité préexistante anti-AAV en périphérie. Il a été démontré que la rate est un réservoir préférentiel de LT spécifiques de la capsid de l'AAV (Mingozzi et al., 2007a), il serait donc intéressant de comparer le phénotype des LT CD8⁺ spécifiques de la capsid dans le sang et dans les splénocytes. Dans cette perspective, nous cherchons actuellement à générer une cohorte de donneurs. Dans ce but, nous avons établi une convention avec le Centre Hospitalier Universitaire de Nantes afin de récupérer des échantillons de rate. Malheureusement, à l'heure actuelle nous n'avons obtenu que 5 donneurs. Les LT circulants accèdent fréquemment aux organes lymphoïdes secondaires à la recherche de leurs antigènes, leur rétention à long terme est principalement assurée par l'interaction entre le récepteur chimiokine CCR7 et ses ligands (CCL19 et CCL21) (Bronte and Pittet, 2013). Cependant, les cellules de mémoire effectrices T_{EMRA} expriment des taux de CCR7 faibles ou inexistantes (D'Asaro et al., 2006; Geginat et al., 2003), et il est possible que la rate ne soit particulièrement enrichie en cellules T_{EMRA} spécifiques de l'AAV.

Il est également important de garder à l'esprit que les réponses immunitaires observées en périphérie doivent être corrélées aux réponses *in situ* et à l'efficacité/persistance du transfert de gènes pour connaître leur impact. En effet, la distribution des cellules immunitaires à l'état basal peut varier ainsi que le niveau d'expression des molécules de CMH classe I à la surface des cellules ciblées par la réponse cytotoxique. Il existe notamment des différences cruciales entre le foie et le muscle qui pourraient expliquer pourquoi le foie peut être plus prompt à provoquer des réponses cellulaires anti-capsid cytotoxiques que le muscle. L'état inflammatoire du tissu est également un élément clé en termes d'activation de l'immunité *in situ*. A l'heure actuelle, les principaux essais cliniques visant le muscle ou le

foie ont été réalisés dans des conditions non inflammatoires (ex : hémophilie et AAT). Dans un contexte inflammatoire comme cela serait le cas pour la DMD ou la maladie de Wilson, la réponse cellulaire pourrait être différente voir plus importante.

Le muscle squelettique est considéré par certains comme un site immuno-privilégié non classique, car il contient peu ou pas de cellules immunitaires à l'état basal, en particulier peu ou pas de CPA (Sciorati et al., 2016). En cas d'injection d'AAV par voie IM, le muscle semble plutôt recruter préférentiellement des macrophages activés et des cellules Treg ce qui pourrait orienter la balance immunitaire vers une tolérance (Gernoux et al., 2017; Mueller et al., 2013, 2017). Néanmoins, la transduction du muscle par l'AAVr n'est pas toujours homogène, ce qui peut induire un biais dans l'analyse de prélèvements de biopsies. Celles-ci permettent tout de même d'étudier la présence d'infiltrats immunitaires *in situ*, ce qui permet une évaluation de l'immunité locale par laquelle la perte d'expression du transgène peut se produire (Boisgerault and Mingozzi, 2015; Nathwani et al., 2014). Cela permet notamment de confirmer que la perte d'expression est associée à un infiltrat de cellules cytotoxiques avec destruction des cellules transduites à médiation immunitaire.

Le foie, en revanche, contient beaucoup de cellules immunitaires résidentes (cellules de Kupffer, les cellules endothéliales sinusoidales du foie et les cellules dendritiques) (Racanelli and Rehermann, 2006). L'équilibre entre l'immunogénicité et la tolérance dans le foie semble dépendre davantage de signaux *in situ*.

La régulation positive des molécules du CMH de classe I sur les cellules transduites par l'AAVr serait un paramètre *in situ* qu'il serait intéressant d'évaluer et pourrait être un paramètre pertinent pour prédire l'apparition des réponses immunitaires. Mais à l'heure actuelle, ce n'est pas facilement quantifiable dans des essais cliniques. Dans ce sens, la nature des cellules hépatiques transduites par l'AAVr pourrait également être un facteur contribuant à l'apparition de réponses immunitaires spécifiques de la capsid (par l'efficacité de présentation de l'antigène par exemple). Les variations des populations de cellules transduites entre les espèces pourraient également expliquer pourquoi les modèles animaux de transfert de gènes dirigés par le foie n'ont pas réussi à être prédictifs, probablement en raison d'une expression différentielle des récepteurs par lesquels les vecteurs AAVr se lient aux cellules cibles entre les espèces et donc à un profil de transduction différent (Asokan et al., 2012). Au niveau des hépatocytes notamment l'efficacité de la transduction peut différer entre les foies murin et humain (Vercauteren et al., 2016; Wang et al., 2015). Néanmoins, il n'y a pas de

données publiées jusqu'à présent montrant quelle sous-population de cellules hépatiques humaines est transduites lors de la perfusion systémique d'AAVr. La diversité naturelle des individus (répartition des sous-ensembles cellulaires constituant le foie, niveaux d'expression des récepteurs AAVr...) est également un facteur important qui pourrait expliquer pourquoi tous les patients recevant de fortes doses d'AAVr lors de protocoles de transfert de gènes ne développent pas une toxicité immunitaire.

L'induction d'une réponse immune *in situ* effectrice pourrait également être favorisée par les contaminants présents dans les préparations virales qui sont certainement de nature différente d'une étude à une autre en raison du manque de standardisation des bioprocédés de production d'AAVr. En effet, la production d'AAVr entraîne la présence de contaminants (Lecomte et al., 2015) qui pourraient avoir un rôle d'adjuvant, notamment lorsqu'il s'agit d'ADN contaminants potentiellement reconnaissables par les TLR.

Ainsi, l'évaluation de l'immunité *in situ* nécessite des techniques plus invasives (biopsies) que l'évaluation en périphérie (prise de sang) mais pourrait apporter des informations supplémentaires et complémentaires.

L'immunosuppression : la meilleure solution?

Les stratégies actuellement utilisées ou à l'étude pour contourner les réponses immunitaires dirigées contre l'AAV ont été décrites précédemment (cf. p88). Les réponses immunitaires déclenchées par les antigènes dérivés de la capsidè ressemblent étrangement aux problèmes immunologiques rencontrés pendant la transplantation d'organes. C'est pourquoi les médicaments immunosuppresseurs actuellement utilisés dans le transfert de gènes à médiation AAVr sont fortement inspirés des régimes d'immunosuppression initialement conçus pour permettre la survie des greffons allogéniques à long terme (Arruda et al., 2009). Il est intéressant de noter que le régime immunosuppresseur dans les essais cliniques de thérapie génique à l'aide d'AAVr n'est utilisé que de façon transitoire quand il s'agit de moduler la réponse immune anti-capsidè, ce qui limite les risques de complications classiques associées à l'immunosuppression à long terme dans la transplantation d'organes (maladies cardiovasculaires et cancer principalement). Cette immunosuppression n'est que transitoire car la capsidè ne persisterait que quelques semaines dans le corps, ne nécessitant donc pas une immunosuppression à long terme. Néanmoins, il a été montré que des particules d'AAVr pouvait persister, notamment dans la rétine et le muscle (Mueller et al., 2013; Stieger et al.,

2009). L'induction d'une tolérance périphérique robuste à long terme (plutôt que la simple immunosuppression transitoire) serait donc plus sûre.

Dans les essais cliniques où les patients ont présenté des pics de transaminases suite à la réactivation de la réponse cellulaire anti-capside pré-existante, la prednisolone a été utilisée comme traitement immunosuppresseur et s'est avérée efficace si elle était administrée dès les premiers signes d'élévation des enzymes hépatiques. Un délai de quelques jours est suffisant pour annuler considérablement le bénéfice de l'immunosuppression et le traitement doit être appliqué le plus tôt possible (Nathwani et al., 2014). L'immunosuppression initiale est, à l'heure actuelle, la façon la plus sûre de procéder et a donc été mise en place dans les essais cliniques les plus récents.

Néanmoins, les stratégies d'immunosuppression ont des inconvénients non négligeables. Ces médicaments pourraient influencer la biodistribution tissulaire des particules virales et l'efficacité de la transduction (qui englobe l'internalisation du vecteur, le trafic intracellulaire et l'expression transgénique). Les organismes de réglementation pourraient donc recommander un régime immunosuppresseur plus ciblé ou de nouvelles stratégies immunomodulatrices conformes aux exigences clés suivantes : spécificité de l'antigène dérivé de la capside, portée spatiale limitée (idéalement, immunosuppression *in situ* où les antigènes sont présentés localement) et aucune intervention supplémentaire lourde pour le patient.

L'immunosuppression par les lymphocytes Treg a été explorée comme stratégie cellulaire immunomodulatrice en transplantation et en auto-immunité. Les Treg maintiennent en effet la tolérance périphérique et le contrôle des réponses immunitaires. Ce type d'immunomodulation semble particulièrement adapté au transfert de gène par AAVr puisque qu'elle s'est développée naturellement en réponse au produit du transgène ou à la capside dans certains essais cliniques et a permis d'établir une tolérance à long terme spécifique de l'antigène (Flotte et al., 2011; Herzog et al., 2017; Mingozzi et al., 2007b; Mueller et al., 2013, 2017). Des épitopes du CMH de classe II (CMH II) situés dans la région Fc des IgG permettent également de moduler l'immunité en induisant une réponse T régulatrice, ils sont appelés épitopes régulateurs des cellules T (Tregitopes) (Cousens et al., 2013; Hui et al., 2013; De Groot et al.). Dans le contexte de l'AAVr, il a été montré que leur administration associée au vecteur immunogène réduit la réponse immunitaire *in vitro* et *in vivo* (Hui et al., 2013). Les

Tregitopes impliquent la présentation des peptides par le CMH II aux LT CD4⁺ par des CPA, entraînant la sécrétion précoce d'IL-10 et favorisant la prolifération des Treg.

Des stratégies impliquant des nanoparticules comme la rapamycine ont été développées et elles permettent de prévenir l'induction de réponses humorales et cellulaires anti-capside rendant possible la ré-administration de vecteur. Cependant, elles ne semblent pas permettre de contourner la réponse immune préexistante (Meliani et al., 2018). L'équipe de Li *et al.* a également exploité une stratégie d'immunosuppression naturelle employée par certains virus qui permet d'éviter les CTL dans les cellules infectées. En effet, certains peptides viraux ont la capacité de diminuer la présentation antigénique d'épitopes viraux. Les séquences codantes de ces peptides ajoutées à la suite du transgène dans le génome de l'AAVr ont permis l'inhibition de la réponse CTL et une expression persistante du transgène après administration systémique chez la souris (Shao et al., 2018). En revanche, leur efficacité n'a pas encore été montrée chez l'Homme.

En parallèle du développement d'immunosuppresseurs plus spécifiques, il est important d'optimiser d'autres paramètres qui peuvent influencer la réponse immunitaire dirigée contre l'AAVr. Plusieurs équipes travaillent à l'heure actuelle sur la caractérisation des contaminants présents dans les productions d'AAVr avec des techniques de plus en plus précises (Lecomte et al., 2015; Penaud-Budloo et al., 2017; Ye et al., 2011). L'implication des contaminants dans la réponse immune n'est pas complètement comprise, mais il ne fait aucun doute que la présence d'ADN viraux contaminants peut favoriser cette réponse notamment en activant la réponse innée.

L'optimisation des vecteurs est également un axe à développer car il semble que la réponse cellulaire soit dose dépendante. Un médicament de thérapie génique plus efficace permettra une diminution des doses et ainsi la réduction du risque d'induction d'une potentielle réaction immunitaire. Pour cela plusieurs approches sont possibles et la combinaison de ces approches serait probablement plus efficace : Ingénierie de vecteurs à meilleure efficacité de transduction (meilleur ciblage et trafic intracellulaire...), l'utilisation de transgènes thérapeutiques optimisés (variants hyperactifs), aux profils immunogènes réduits. Des traitements additionnels (tels que les interventions pharmacologiques) améliorant l'état général du patient pourraient également contribuer à abaisser le seuil thérapeutique et donc la dose de vecteur AAV à administrer. Un potentiel traitement pharmacologue associé pourrait

également contribuer dans certains cas à éviter un milieu inflammatoire qui pourrait également favoriser la réponse immune anti-capside.

Le développement de nouvelles stratégies immunosuppressives dans le cadre du transfert de gènes à médiation par l'AAVr doit être poursuivi. En revanche, il pourrait être considérablement freiné par l'absence de modèles animaux pertinents pour l'évaluation préclinique de l'efficacité de ces stratégies.

Les modèles animaux : les pistes à explorer

Comme nous l'avons mentionné plus tôt dans ce manuscrit, les modèles animaux récapitulant les réponses immunitaires anti-capside observées chez les patients sont toujours absents (cf. p87), même les modèles de primate non humains se sont avérés non pertinents (Herzog et al., 2011). Compte tenu des considérations éthiques et économiques liées à l'utilisation des NHP, pour le développement de modèles animaux dans notre étude nous nous sommes concentrés sur de petits animaux. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence de modèle prédictif : le types de cellules hépatiques transduits par les vecteurs AAVr pourraient différer entre les modèles animaux et les humains (Asokan et al., 2012) ; l'efficacité de la transduction différente entre les espèces murins / humains (Vercauteren et al., 2016; Wang et al., 2015), une réactivité plus importante des LT humains à la stimulation via le TCR (Nguyen et al., 2006), l'existence d'une réponse immune preexistante contre la capsid, le seuil de réactivité des lymphocytes mémoires...

Une étude exposée par Martino *et al.* où des LT CD8⁺ murins spécifiques de l'AAV ont été transférées chez des souris immunodéficientes a montré une destruction des hépatocytes transduits par le AAVr en présence d'adjuvants (Martino et al., 2013). Notre approche était similaire, des souris transgéniques NOD/SCID HLA-A2 ont reçu de LT CD8⁺ humains spécifiques du peptide immunodominant de l'AAV8 restreint au HLA-A2 et un AAV8 par voie systémique. Comme nous avons démontré que les lignées de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'AAV8 humain présentaient des profils fonctionnels *in vitro*, nous cherchions à évaluer si ces observations demeuraient vraies *in vivo* et si un changement dans le statut immunologique pourrait être identifié. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une réponse cytotoxique dirigée contre les cellules transduites par l'AAV dans nos souris. Les possibles raisons de cette absence de cytotoxicité et les perspectives concernant ce modèle sont détaillées ci-dessus dans la discussion (cf. p181). A l'heure actuelle, nous sommes donc encore dans l'incapacité de proposer un modèle cliniquement

pertinent d'immunité cellulaire dirigée contre l'AAV. Il est important de noter que la caractérisation et la compréhension plus approfondie de l'immunité cellulaire anti-AAV chez l'Homme pourrait permettre d'identifier précisément les facteurs limitants dans la mise au point d'un modèle animal pertinent. En revanche, pour des raisons éthiques et si aucun modèle ne devait être mis au point, il serait alors nécessaire de se concentrer sur le développement d'outils plus efficaces d'immunomonitorage, sur l'identification des situations à risque et sur la mise en place de régimes immunosuppresseurs adéquats.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse avait pour objectif d'améliorer l'état de compréhension de l'immunité cellulaire spécifique de l'AAV dans la population humaine générale. Il a montré une prévalence élevée de l'immunité cellulaire préexistante ainsi que des différences fonctionnelles entre les sérotypes de l'AAV. Il a également montré que c'est la présence plus ou moins importante des cellules mémoire effectrices T_{EMRA} qui semble être responsable de la réponse IFN- γ dans le cas de l'AAV8. En revanche, la présence de T_{EMRA} ne semble être qu'un seul paramètre, parmi d'autres, intervenant dans la complexité des mécanismes régulant la fonctionnalité de l'immunité anti-capside. Dans l'objectif de prédire les réponses cytotoxiques dans les essais cliniques de thérapie génique à l'aide d'AAVr, des méthodes novatrices combinant une sensibilité accrue de détection des cellules spécifiques de l'AAV et une évaluation polyfonctionnelle des réponses doivent encore être élaborées pour un immunomonitorage efficace.

Les cas de réponses cellulaires cytotoxiques contre la capsidie semblent concerner principalement les protocoles cliniques où des doses élevées d'AAVr sont administrées par voie systémique ou intramusculaire. Dans ces cas, les particules peuvent en effet atteindre le foie en grandes quantités. Ce type de protocole est de plus en plus utilisé chez l'Homme avec des doses dépassant 1×10^{14} vg/kg. Actuellement dans la plupart des essais cliniques de thérapie génique médiée par l'AAVr, la réponse immunitaire cellulaire est contrôlée par des traitements immunosuppresseurs ou des injections de corticostéroïdes. Afin d'améliorer la prise en charge des patients et faciliter l'approbation des essais cliniques de thérapie génique par agences réglementaires de santé, il reste néanmoins nécessaire de mieux caractériser la réponse cellulaire dirigée contre les vecteurs viraux et de développer des modèles animaux pertinents pour tester de nouvelles stratégies d'immunomodulation. Les résultats de cette thèse ont montré que l'élaboration d'un modèle animal était complexe et nécessitait la prise en compte de nombreux paramètres. Néanmoins, cette thèse fournit de nouvelles informations et des pistes de recherches quant à l'élaboration d'une nouvelle stratégie d'immunomonitorage plus complète et prédictive. En raison de son absence de pathogénicité, on sait peu de choses sur les infections par l'AAV naturelles, ce qui ajoute sans aucun doute un niveau de difficulté dans nos tentatives de prédire les réponses dirigées contre la capsidie dans les essais cliniques de thérapie génique par AAVr.

Il est important de signaler que la résolution des problèmes immunitaires ne signifie pas qu'il faille travailler uniquement sur l'immunologie. Tous les domaines de la recherche en thérapie génique sont nécessaires et complémentaires pour apporter des solutions. En plus de nouvelles stratégies d'immunosuppression, la compilation de diverses solutions d'optimisation des vecteurs viraux permettrait de réduire la dose des vecteurs nécessaires pour atteindre une efficacité thérapeutique qui à son tour diminue le risque de déclenchement immunitaire. Il est donc important de continuer à travailler sur l'ingénierie de vecteurs avec une meilleure efficacité de transduction (meilleur ciblage et trafic intracellulaire...), porteurs de transgènes thérapeutiques optimisés et aux profils immunogènes réduits (génome appauvri en CpG, capsides inertes ...). L'optimisation des procédés de bioproduction est également une piste de travail essentielle aujourd'hui pour améliorer la qualité des vecteurs et réduire leurs potentiels contaminants (réduction et meilleure caractérisation des contaminants, quantité minimale de capsides vides...).

La thérapie génique malgré ses nombreux succès possède toujours son lot de questions en suspens : l'efficacité thérapeutique à long terme est-elle synonyme d'efficacité tout au long de la vie? Le génome AAVr persiste-t-il indéfiniment dans les cellules transduites? L'intégration de l'AAVr dans le génome est-elle si peu fréquente? Les cancers sont-ils favorisés par l'intégration du génome recombinant de l'AAV dans l'ADN de l'hôte? Combien de temps des particules entières d'AAVr peuvent-elles persister *in vivo*? Les réponses immunitaires dirigées contre la capside peuvent-elles réapparaître des années après l'administration du vecteur? La recherche autour de l'AAV doit donc continuer.

Devant l'ampleur du nombre d'essai cliniques de thérapie génique par AAVr, l'arrivée de nouveaux outils d'édition du génome et la mise sur le marché de traitement très onéreux (Zolgensma®, le médicament à 2M de dollars est le médicament le plus cher au monde), il nous paraît donc nécessaire de continuer à étudier l'AAV en couvrant toute la chaîne translationnelle, du fondamental au lit du patient. A long terme, cela permettrait de rendre cette thérapie plus accessible et ainsi d'éviter que l'incroyable travail fourni par la communauté scientifique mondiale et les succès dans ce domaine ne s'avèrent bénéfique qu'à quelques patients privilégiés.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787–793.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2016). *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique* (ELSEVIER).
- Acland, G.M., Aguirre, G.D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Pearce-Kelling, S.E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A.M., et al. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat. Genet.* 28, 92–95.
- Adamson-Small, L., Potter, M., Falk, D.J., Cleaver, B., Byrne, B.J., and Clément, N. (2016). A scalable method for the production of high-titer and high-quality adeno-associated type 9 vectors using the HSV platform. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 3, 16031.
- Adamson-Small, L., Potter, M., Byrne, B.J., and Clément, N. (2017). Sodium Chloride Enhances Recombinant Adeno-Associated Virus Production in a Serum-Free Suspension Manufacturing Platform Using the Herpes Simplex Virus System. *Hum. Gene Ther. Methods* 28, 1–14.
- Akache, B., Grimm, D., Pandey, K., Yant, S.R., Xu, H., and Kay, M.A. (2006). The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J. Virol.* 80, 9831–9836.
- Alanio, C., Lemaitre, F., Law, H.K.W., Hasan, M., and Albert, M.L. (2010). Enumeration of human antigen-specific naive CD8⁺ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood* 115, 3718–3725.
- Alanio, C., Bouvier, I., Jusforgues-Saklani, H., and Albert, M.L. (2013). Tracking antigen-specific CD8⁺ T cells using MHC class I multimers. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 960, 309–326.
- Aldrich, W.A., Ren, C., White, A.F., Zhou, S.-Z., Kumar, S., Jenkins, C.B., Shaw, D.R., Strong, T.V., Triozzi, P.L., and Ponnazhagan, S. (2006). Enhanced transduction of mouse bone marrow-derived dendritic cells by repetitive infection with self-complementary adeno-associated virus 6 combined with immunostimulatory ligands. *Gene Ther.* 13, 29–39.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738.
- Altman, J.D., and Davis, M.M. (2003). MHC-peptide tetramers to visualize antigen-specific T cells. *Curr. Protoc. Immunol. Chapter 17*, Unit 17.3.
- Anel, A., Buferne, M., Boyer, C., Schmitt-Verhulst, A.M., and Golstein, P. (1994). T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *Eur. J. Immunol.* 24, 2469–2476.

- Arechavaleta-Velasco, F., Ma, Y., Zhang, J., McGrath, C.M., and Parry, S. (2006). Adeno-associated virus-2 (AAV-2) causes trophoblast dysfunction, and placental AAV-2 infection is associated with preeclampsia. *Am. J. Pathol.* *168*, 1951–1959.
- Arruda, V.R., Stedman, H.H., Nichols, T.C., Haskins, M.E., Nicholson, M., Herzog, R.W., Couto, L.B., and High, K.A. (2005). Regional intravascular delivery of AAV-2-F.IX to skeletal muscle achieves long-term correction of hemophilia B in a large animal model. *Blood* *105*, 3458–3464.
- Arruda, V.R., Stedman, H.H., Haurigot, V., Buchlis, G., Baila, S., Favaro, P., Chen, Y., Franck, H.G., Zhou, S., Wright, J.F., et al. (2010). Peripheral transvenular delivery of adeno-associated viral vectors to skeletal muscle as a novel therapy for hemophilia B. *Blood* *115*, 4678–4688.
- Asokan, A., Conway, J.C., Phillips, J.L., Li, C., Hegge, J., Sinnott, R., Yadav, S., DiPrimio, N., Nam, H.-J., Agbandje-McKenna, M., et al. (2010). Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat. Biotechnol.* *28*, 79–82.
- Asokan, A., Schaffer, D.V., and Samulski, R.J. (2012). The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *20*, 699–708.
- Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* *149*, 754–755.
- Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M. (1966). Electron microscopy of adenovirus-associated virus (AAV) in cell cultures. *Virology* *29*, 353–357.
- Ayuso, E. (2016). Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors: new technologies are welcome. *Mol. Ther. — Methods Clin. Dev.* *3*, 15049.
- Bainbridge, J.W.B., Mehat, M.S., Sundaram, V., Robbie, S.J., Barker, S.E., Ripamonti, C., Georgiadis, A., Mowat, F.M., Beattie, S.G., Gardner, P.J., et al. (2015). Long-term effect of gene therapy on Leber’s congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* *372*, 1887–1897.
- Balagúe, C., Kalla, M., and Zhang, W.W. (1997). Adeno-associated virus Rep78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome. *J. Virol.* *71*, 3299–3306.
- Balakrishnan, B., and Jayandharan, G.R. (2014). Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr. Gene Ther.* *14*, 86–100.
- Barbarash, L., Kudryavtsev, I., Rutkovskaya, N., and Golovkin, A. (2016). T Cell Response in Patients with Implanted Biological and Mechanical Prosthetic Heart Valves. *Mediators Inflamm.* *2016*, 1937564.
- Bartel, M., Schaffer, D., and Büning, H. (2011). Enhancing the Clinical Potential of AAV Vectors by Capsid Engineering to Evade Pre-Existing Immunity. *Front. Microbiol.* *2*, 204.
- Bartlett, J.S., Wilcher, R., and Samulski, R.J. (2000). Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* *74*, 2777–2785.

Basner-Tschakarjan, E., and Mingozi, F. (2014). Cell-Mediated Immunity to AAV Vectors, Evolving Concepts and Potential Solutions. *Front. Immunol.* 5, 350.

Bennett, J., Ashtari, M., Wellman, J., Marshall, K.A., Cyckowski, L.L., Chung, D.C., McCague, S., Pierce, E.A., Chen, Y., Bennicelli, J.L., et al. (2012). AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Sci. Transl. Med.* 4, 120ra15.

Bentzen, A.K., and Hadrup, S.R. (2017). Evolution of MHC-based technologies used for detection of antigen-responsive T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 66, 657–666.

Berns, K.I., and Adler, S. (1972). Separation of two types of adeno-associated virus particles containing complementary polynucleotide chains. *J. Virol.* 9, 394–396.

Berns, K.I., and Giraud, C. (1996). Biology of adeno-associated virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 218, 1–23.

Berns, K.I., and Kelly, T.J. (1974). Letter: Visualization of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J. Mol. Biol.* 82, 267–271.

Berns, K.I., Pinkerton, T.C., Thomas, G.F., and Hoggan, M.D. (1975). Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 68, 556–560.

Bieback, K., Lien, E., Klagge, I.M., Avota, E., Schneider-Schaulies, J., Duprex, W.P., Wagner, H., Kirschning, C.J., Ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (2002). Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J. Virol.* 76, 8729–8736.

Björkström, N.K., Gonzalez, V.D., Malmberg, K.-J., Falconer, K., Alaeus, A., Nowak, G., Jorns, C., Ericzon, B.-G., Weiland, O., Sandberg, J.K., et al. (2008). Elevated numbers of Fc gamma RIIIa+ (CD16+) effector CD8 T cells with NK cell-like function in chronic hepatitis C virus infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 4219–4228.

Blacklow, N.R., Hoggan, M.D., Kapikian, A.Z., Austin, J.B., and Rowe, W.P. (1968a). Epidemiology of adenovirus-associated virus infection in a nursery population. *Am. J. Epidemiol.* 88, 368–378.

Blacklow, N.R., Hoggan, M.D., and Rowe, W.P. (1968b). Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *J. Natl. Cancer Inst.* 40, 319–327.

Boisgerault, F., and Mingozi, F. (2015). The Skeletal Muscle Environment and Its Role in Immunity and Tolerance to AAV Vector-Mediated Gene Transfer. *Curr. Gene Ther.* 15, 381–394.

Bossi, G., and Griffiths, G.M. (2005). CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Semin. Immunol.* 17, 87–94.

Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M.F., and Masurier, C. (2010). Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Hum. Gene Ther.* 21, 704–712.

- Bowles, D.E., McPhee, S.W., Li, C., Gray, S.J., Samulski, J.J., Camp, A.S., Li, J., Wang, B., Monahan, P.E., Rabinowitz, J.E., et al. (2012). Phase 1 Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy Using a Translational Optimized AAV Vector. *Mol. Ther.* *20*, 443–455.
- Boyton, R.J., and Altmann, D.M. (2002). Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol.* *23*, 526–529.
- Brantly, M.L., Chulay, J.D., Wang, L., Mueller, C., Humphries, M., Spencer, L.T., Rouhani, F., Conlon, T.J., Calcedo, R., Betts, M.R., et al. (2009). Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 16363–16368.
- Brister, J.R., and Muzyczka, N. (2000). Mechanism of Rep-Mediated Adeno-Associated Virus Origin Nicking. *J. Virol.* *74*, 7762–7771.
- Bronte, V., and Pittet, M.J. (2013). The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* *39*, 806–818.
- Brooks, D.G., Teyton, L., Oldstone, M.B.A., and McGavern, D.B. (2005). Intrinsic functional dysregulation of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection. *J. Virol.* *79*, 10514–10527.
- Buller, R.M., Janik, J.E., Sebring, E.D., and Rose, J.A. (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J. Virol.* *40*, 241–247.
- Burzyn, D., Rassa, J.C., Kim, D., Nepomnaschy, I., Ross, S.R., and Piazzon, I. (2004). Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. *J. Virol.* *78*, 576–584.
- Butterfield, J.S.S., Biswas, M., Shirley, J.L., Kumar, S.R.P., Sherman, A., Terhorst, C., Ling, C., and Herzog, R. (2019). TLR9-activating CpG-B ODN but not TLR7 Agonists Trigger Antibody Formation to Factor IX in Muscle Gene Transfer. *Hum. Gene Ther. Methods.*
- Calcedo, R., and Wilson, J.M. (2013). Humoral Immune Response to AAV. *Front. Immunol.* *4*.
- Calcedo, R., and Wilson, J.M. (2016). AAV Natural Infection Induces Broad Cross-Neutralizing Antibody Responses to Multiple AAV Serotypes in Chimpanzees. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* *27*, 79–82.
- Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Gao, G., Lin, J., and Wilson, J.M. (2009). Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *J. Infect. Dis.* *199*, 381–390.
- Calcedo, R., Morizono, H., Wang, L., McCarter, R., He, J., Jones, D., Batshaw, M.L., and Wilson, J.M. (2011). Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* *18*, 1586–1588.
- Cao, M., Zhu, H., Bandyopadhyay, S., You, H., and Hermonat, P.L. (2012). HPV-16 E1, E2 and E6 each complement the Ad5 helper gene set, increasing rAAV2 and wt AAV2 production. *Gene Ther.* *19*, 418–424.

- Cao, M., You, H., and Hermonat, P.L. (2014). The X gene of adeno-associated virus 2 (AAV2) is involved in viral DNA replication. *PloS One* 9, e104596.
- Chadeuf, G., and Salvetti, A. (2010). Stable producer cell lines for adeno-associated virus (AAV) assembly. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010, pdb.prot5496.
- Chadeuf, G., Ciron, C., Moullier, P., and Salvetti, A. (2005). Evidence for encapsidation of prokaryotic sequences during recombinant adeno-associated virus production and their in vivo persistence after vector delivery. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 12, 744–753.
- Chandler, R.J., and Venditti, C.P. (2012). Pre-clinical efficacy and dosing of an AAV8 vector expressing human methylmalonyl-CoA mutase in a murine model of methylmalonic acidemia (MMA). *Mol. Genet. Metab.* 107, 617–619.
- Chandler, M., de la Cruz, F., Dyda, F., Hickman, A.B., Moncalian, G., and Ton-Hoang, B. (2013). Breaking and joining single-stranded DNA: the HUH endonuclease superfamily. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 525–538.
- Chejanovsky, N., and Carter, B.J. (1990). Mutation of a consensus purine nucleotide binding site in the adeno-associated virus rep gene generates a dominant negative phenotype for DNA replication. *J. Virol.* 64, 1764–1770.
- Chen, C.-L., Jensen, R.L., Schnepf, B.C., Connell, M.J., Shell, R., Sferra, T.J., Bartlett, J.S., Clark, K.R., and Johnson, P.R. (2005). Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J. Virol.* 79, 14781–14792.
- Cheung, A.K., Hoggan, M.D., Hauswirth, W.W., and Berns, K.I. (1980). Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J. Virol.* 33, 739–748.
- Chicoine, L.G., Montgomery, C.L., Bremer, W.G., Shontz, K.M., Griffin, D.A., Heller, K.N., Lewis, S., Malik, V., Grose, W.E., Shilling, C.J., et al. (2014). Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on microdystrophin gene expression following vascular delivery. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 22, 338–347.
- Chiorini, J.A., Afione, S., and Kotin, R.M. (1999). Adeno-associated virus (AAV) type 5 Rep protein cleaves a unique terminal resolution site compared with other AAV serotypes. *J. Virol.* 73, 4293–4298.
- Chirmule, N., Propert, K., Magosin, S., Qian, Y., Qian, R., and Wilson, J. (1999). Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* 6, 1574–1583.
- Chirmule, N., Xiao, W., Truneh, A., Schnell, M.A., Hughes, J.V., Zoltick, P., and Wilson, J.M. (2000). Humoral immunity to adeno-associated virus type 2 vectors following administration to murine and nonhuman primate muscle. *J. Virol.* 74, 2420–2425.
- Clark, K.R., and Penaud-Budloo, M. (2011). Evaluation of the fate of rAAV genomes following in vivo administration. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 807, 239–258.

- Collaco, R.F., Kalman-Maltese, V., Smith, A.D., Dignam, J.D., and Trempe, J.P. (2003). A biochemical characterization of the adeno-associated virus Rep40 helicase. *J. Biol. Chem.* *278*, 34011–34017.
- Compton, T., Kurt-Jones, E.A., Boehme, K.W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D.T., and Finberg, R.W. (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* *77*, 4588–4596.
- Cottard, V., Valvason, C., Falgarone, G., Lutomski, D., Boissier, M.-C., and Bessis, N. (2004). Immune response against gene therapy vectors: influence of synovial fluid on adeno-associated virus mediated gene transfer to chondrocytes. *J. Clin. Immunol.* *24*, 162–169.
- Cousens, L.P., Najafian, N., Mingozzi, F., Elyaman, W., Mazer, B., Moise, L., Messitt, T.J., Su, Y., Sayegh, M., High, K., et al. (2013). In vitro and in vivo studies of IgG-derived Treg epitopes (Tregitopes): a promising new tool for tolerance induction and treatment of autoimmunity. *J. Clin. Immunol.* *33 Suppl 1*, S43-49.
- Crawford, A., Angelosanto, J.M., Kao, C., Doering, T.A., Odorizzi, P.M., Barnett, B.E., and Wherry, E.J. (2014). Molecular and transcriptional basis of CD4⁺ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity* *40*, 289–302.
- D’Asaro, M., Dieli, F., Caccamo, N., Musso, M., Porretto, F., and Salerno, A. (2006). Increase of CCR7- CD45RA+ CD8 T cells (T(EMRA)) in chronic graft-versus-host disease. *Leukemia* *20*, 545–547.
- Davidoff, A.M., Ng, C.Y.C., Zhou, J., Spence, Y., and Nathwani, A.C. (2003). Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood* *102*, 480–488.
- Davis, M.M., Altman, J.D., and Newell, E.W. (2011). Interrogating the repertoire: broadening the scope of peptide–MHC multimer analysis. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 551–558.
- 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.
- Daya, S., Cortez, N., and Berns, K.I. (2009). Adeno-Associated Virus Site-Specific Integration Is Mediated by Proteins of the Nonhomologous End-Joining Pathway. *J. Virol.* *83*, 11655–11664.
- Dayton, R.D., Wang, D.B., and Klein, R.L. (2012). The advent of AAV9 expands applications for brain and spinal cord gene delivery. *Expert Opin. Biol. Ther.* *12*, 757–766.
- Delhem, N., Cottrez, F., Carpentier, A., Miroux, C., Moralès, O., François, V., Groux, H., Auriault, C., and Pancre, V. (2008). [Role of the Regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression]. *Bull. Cancer (Paris)* *95*, 1029–1038.
- Denard, J., Beley, C., Kotin, R., Lai-Kuen, R., Blot, S., Leh, H., Asokan, A., Samulski, R.J., Moullier, P., Voit, T., et al. (2012). Human Galectin 3 Binding Protein Interacts with Recombinant Adeno-Associated Virus Type 6. *J. Virol.* *86*, 6620–6631.

- Di Pasquale, G., Davidson, B.L., Stein, C.S., Martins, I., Scudiero, D., Monks, A., and Chiorini, J.A. (2003). Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat. Med.* 9, 1306–1312.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Sousa, C.R. e (2004). Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. *Science* 303, 1529–1531.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857–902.
- Dong, J.Y., Fan, P.D., and Frizzell, R.A. (1996). Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum. Gene Ther.* 7, 2101–2112.
- Duan, D., Sharma, P., Yang, J., Yue, Y., Dudus, L., Zhang, Y., Fisher, K.J., and Engelhardt, J.F. (1998). Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J. Virol.* 72, 8568–8577.
- Duan, D., Li, Q., Kao, A.W., Yue, Y., Pessin, J.E., and Engelhardt, J.F. (1999). Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J. Virol.* 73, 10371–10376.
- Durost, P. (2017). Evaluation of IL2 and HLA on the Homeostasis and Function of Human CD4 and CD8 T Cells. *Univ. Mass. Med. Sch.*
- Dutheil, N., Shi, F., Dupressoir, T., and Linden, R.M. (2000). Adeno-associated virus site-specifically integrates into a muscle-specific DNA region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4862–4866.
- Eberhard, J.M., Ahmad, F., Hong, H.S., Bhatnagar, N., Keudel, P., Schulze Zur Wiesch, J., Schmidt, R.E., and Meyer-Olson, D. (2016). Partial recovery of senescence and differentiation disturbances in CD8+ T cell effector-memory cells in HIV-1 infection after initiation of anti-retroviral treatment. *Clin. Exp. Immunol.* 186, 227–238.
- Edwards, L.J., and Evavold, B.D. (2011). T cell recognition of weak ligands: roles of signaling, receptor number, and affinity. *Immunol. Res.* 50, 39–48.
- Ellsworth, J.L., O’Callaghan, M., Rubin, H., and Seymour, A. (2018). Low Seroprevalence of Neutralizing Antibodies Targeting Two Clade F AAV in Humans. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 29, 60–67.
- Erles, K., Seböková, P., and Schlehofer, J.R. (1999). Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J. Med. Virol.* 59, 406–411.
- Erles, K., Rohde, V., Thaele, M., Roth, S., Edler, L., and Schlehofer, J.R. (2001). DNA of adeno-associated virus (AAV) in testicular tissue and in abnormal semen samples. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 16, 2333–2337.
- Faust, S.M., Bell, P., Cutler, B.J., Ashley, S.N., Zhu, Y., Rabinowitz, J.E., and Wilson, J.M. (2013). CpG-depleted adeno-associated virus vectors evade immune detection. *J. Clin. Invest.* 123, 2994–3001.

- Fechheimer, M., Boylan, J.F., Parker, S., Siskin, J.E., Patel, G.L., and Zimmer, S.G. (1987). Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *84*, 8463–8467.
- Finn, J.D., Hui, D., Downey, H.D., Dunn, D., Pien, G.C., Mingozzi, F., Zhou, S., and High, K.A. (2010). Proteasome Inhibitors Decrease AAV2 Capsid derived Peptide Epitope Presentation on MHC Class I Following Transduction. *Mol. Ther.* *18*, 135–142.
- Fisher, K.J., Gao, G.P., Weitzman, M.D., DeMatteo, R., Burda, J.F., and Wilson, J.M. (1996). Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J. Virol.* *70*, 520–532.
- Flotte, T.R., Trapnell, B.C., Humphries, M., Carey, B., Calcedo, R., Rouhani, F., Campbell-Thompson, M., Yachnis, A.T., Sandhaus, R.A., McElvaney, N.G., et al. (2011). Phase 2 clinical trial of a recombinant adeno-associated viral vector expressing $\alpha 1$ -antitrypsin: interim results. *Hum. Gene Ther.* *22*, 1239–1247.
- Fotakis, G., and Timbrell, J.A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* *160*, 171–177.
- Freitas, L.B., Pereira, C.C., Checon, R., Leite, J.P.G., Nascimento, J.P., and Spano, L.C. (2009). Adeno-associated virus and human papillomavirus types in cervical samples of pregnant and non-pregnant women. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *145*, 41–44.
- Fuller, M.J., Khanolkar, A., Tebo, A.E., and Zajac, A.J. (2004). Maintenance, loss, and resurgence of T cell responses during acute, protracted, and chronic viral infections. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 4204–4214.
- Galibert, L., and Merten, O.-W. (2011). Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases. *J. Invertebr. Pathol.* *107 Suppl*, S80-93.
- Gao, G., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X., and Wilson, J.M. (2004). Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues. *J. Virol.* *78*, 6381–6388.
- Gao, G., Wang, Q., Calcedo, R., Mays, L., Bell, P., Wang, L., Vandenberghe, L.H., Grant, R., Sanmiguel, J., Furth, E.E., et al. (2009). Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer to Nonhuman Primate Liver Can Elicit Destructive Transgene-Specific T Cell Responses. *Hum. Gene Ther.* *20*, 930–942.
- Gao, G.-P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11854–11859.
- Geginat, J., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2003). Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* *101*, 4260–4266.

- Georg-Fries, B., Biederlack, S., Wolf, J., and zur Hausen, H. (1984). Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology* 134, 64–71.
- Gernoux, G., Guilbaud, M., Dubreil, L., Larcher, T., Babarit, C., Ledevin, M., Jaulin, N., Planel, P., Moullier, P., and Adjali, O. (2015). Early interaction of adeno-associated virus serotype 8 vector with the host immune system following intramuscular delivery results in weak but detectable lymphocyte and dendritic cell transduction. *Hum. Gene Ther.* 26, 1–13.
- Gernoux, G., Wilson, J.M., and Mueller, C. (2017). Regulatory and Exhausted T Cell Responses to AAV Capsid. *Hum. Gene Ther.* 28, 338–349.
- Gil-Farina, I., Fronza, R., Kaepfel, C., Lopez-Franco, E., Ferreira, V., D’Avola, D., Benito, A., Prieto, J., Petry, H., Gonzalez-Aseguinolaza, G., et al. (2016). Recombinant AAV Integration Is Not Associated With Hepatic Genotoxicity in Nonhuman Primates and Patients. *Mol. Ther.* 24, 1100–1105.
- 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.
- Gonçalves, M.A.F.V. (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virol. J.* 2, 43.
- Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougerousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J.-C., Garcia, L., and Danos, O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 306, 1796–1799.
- Grossman, Z., Mendelson, E., Brok-Simoni, F., Mileguir, F., Leitner, Y., Rechavi, G., and Ramot, B. (1992). Detection of adeno-associated virus type 2 in human peripheral blood cells. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 4), 961–966.
- Guilbaud, M., Devaux, M., Couzinié, C., Le Duff, J., Toromanoff, A., Vandamme, C., Jaulin, N., Gernoux, G., Larcher, T., Moullier, P., et al. (2019). Five Years of Successful Inducible Transgene Expression Following Locoregional Adeno-Associated Virus Delivery in Nonhuman Primates with No Detectable Immunity. *Hum. Gene Ther.* 30, 802–813.
- Gunhild M Maelandsmo, P.J.R. (2005). Use of a murine secreted alkaline phosphatase as a non-immunogenic reporter gene in mice. *J. Gene Med.* 7, 307–315.
- Hajjar, R.J., Zsebo, K., Deckelbaum, L., Thompson, C., Rudy, J., Yaroshinsky, A., Ly, H., Kawase, Y., Wagner, K., Borow, K., et al. (2008). Design of a phase 1/2 trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with heart failure. *J. Card. Fail.* 14, 355–367.
- Halbert, C.L., Miller, A.D., McNamara, S., Emerson, J., Gibson, R.L., Ramsey, B., and Aitken, M.L. (2006). Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: Implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum. Gene Ther.* 17, 440–447.

- Han, L., Parmley, T.H., Keith, S., Kozlowski, K.J., Smith, L.J., and Hermonat, P.L. (1996). High prevalence of adeno-associated virus (AAV) type 2 rep DNA in cervical materials: AAV may be sexually transmitted. *Virus Genes* 12, 47–52.
- Hansen, J., Qing, K., Kwon, H.J., Mah, C., and Srivastava, A. (2000). Impaired intracellular trafficking of adeno-associated virus type 2 vectors limits efficient transduction of murine fibroblasts. *J. Virol.* 74, 992–996.
- Hartikka, J., Sukhu, L., Buchner, C., Hazard, D., Bozoukova, V., Margalith, M., Nishioka, W.K., Wheeler, C.J., Manthorp, M., and Sawdey, M. (2001). Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 4, 407–415.
- Hasenkrug, K.J., Chougnet, C.A., and Dittmer, U. (2018). Regulatory T cells in retroviral infections. *PLoS Pathog.* 14.
- Hashimoto, H., Mizushima, T., Ogura, T., Kagawa, T., Tomiyama, K., Takahashi, R.-I., Yagoto, M., Kawai, K., Chijiwa, T., Nakamura, M., et al. (2016). Study on AAV-mediated gene therapy for diabetes in humanized liver mouse to predict efficacy in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478, 1254–1260.
- Haurigot, V., Mingozzi, F., Buchlis, G., Hui, D.J., Chen, Y., Basner-Tschakarjan, E., Arruda, V.R., Radu, A., Franck, H.G., Wright, J.F., et al. (2010). Safety of AAV factor IX peripheral transvenular gene delivery to muscle in hemophilia B dogs. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 1318–1329.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 126–134.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526–1529.
- 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.
- Hermonat, P.L., Santin, A.D., De Greve, J., De Rijcke, M., Bishop, B.M., Han, L., Mane, M., and Kokorina, N. (1999). Chromosomal latency and expression at map unit 96 of a wild-type plus adeno-associated virus (AAV)/Neo vector and identification of p81, a new AAV transcriptional promoter. *J. Hum. Virol.* 2, 359–368.
- Hernandez, Y.J., Wang, J., Kearns, W.G., Loiler, S., Poirier, A., and Flotte, T.R. (1999). Latent adeno-associated virus infection elicits humoral but not cell-mediated immune responses in a nonhuman primate model. *J. Virol.* 73, 8549–8558.
- Herrmann, A.-K., and Grimm, D. (2018). High-Throughput Dissection of AAV-Host Interactions: The Fast and the Curious. *J. Mol. Biol.* 430, 2626–2640.

- Herzenberg, L.A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., and Herzenberg, L.A. (2002). The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin. Chem.* *48*, 1819–1827.
- Herzog, R.W., Hagstrom, J.N., Kung, S.H., Tai, S.J., Wilson, J.M., Fisher, K.J., and High, K.A. (1997). Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 5804–5809.
- Herzog, R.W., Davidoff, A.M., Markusic, D.M., and Nathwani, A.C. (2011). AAV vector biology in primates: finding the missing link? *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *19*, 1923–1924.
- Herzog, R.W., Cooper, M., Perrin, G.Q., Biswas, M., Martino, A.T., Morel, L., Terhorst, C., and Hoffman, B.E. (2017). Regulatory T cells and TLR9 activation shape antibody formation to a secreted transgene product in AAV muscle gene transfer. *Cell. Immunol.*
- Hildinger, M., Baldi, L., Stettler, M., and Wurm, F.M. (2007). High-titer, serum-free production of adeno-associated virus vectors by polyethyleneimine-mediated plasmid transfection in mammalian suspension cells. *Biotechnol. Lett.* *29*, 1713–1721.
- Hinderer, C., Katz, N., Buza, E.L., Dyer, C., Goode, T., Bell, P., Richman, L.K., and Wilson, J.M. (2018). Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Hum. Gene Ther.* *29*, 285–298.
- Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabet, K., Kim, S.O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., et al. (2003). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* *424*, 743–748.
- Hoggan, M.D., Blacklow, N.R., and Rowe, W.P. (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *55*, 1467–1474.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 4531–4537.
- Hösel, M., Broxtermann, M., Janicki, H., Esser, K., Arzberger, S., Hartmann, P., Gillen, S., Kleeff, J., Stabenow, D., Odenthal, M., et al. (2012). Toll-like receptor 2-mediated innate immune response in human nonparenchymal liver cells toward adeno-associated viral vectors. *Hepatol. Baltim. Md* *55*, 287–297.
- Hoy, S.M. (2019). Onasemnogene Apeparvovec: First Global Approval. *Drugs* *79*, 1255–1262.
- Hui, D.J., Basner-Tschakarjan, E., Chen, Y., Davidson, R.J., Buchlis, G., Yazicioglu, M., Pien, G.C., Finn, J.D., Haurigot, V., Tai, A., et al. (2013). Modulation of CD8+ T cell responses to AAV vectors with IgG-derived MHC class II epitopes. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *21*, 1727–1737.

- Hui, D.J., Edmonson, S.C., Podsakoff, G.M., Pien, G.C., Ivanciu, L., Camire, R.M., Ertl, H., Mingozi, F., High, K.A., and Basner-Tschakarjan, E. (2015). AAV capsid CD8+ T-cell epitopes are highly conserved across AAV serotypes. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2, 15029.
- Hurlbut, G.D., Ziegler, R.J., Nietupski, J.B., Foley, J.W., Woodworth, L.A., Meyers, E., Bercury, S.D., Pande, N.N., Souza, D.W., Bree, M.P., et al. (2010). Preexisting Immunity and Low Expression in Primates Highlight Translational Challenges for Liver-directed AAV8-mediated Gene Therapy. *Mol. Ther.* 18, 1983–1994.
- Hüser, D., Gogol-Döring, A., Lutter, T., Weger, S., Winter, K., Hammer, E.-M., Cathomen, T., Reinert, K., and Heilbronn, R. (2010). Integration preferences of wildtype AAV-2 for consensus rep-binding sites at numerous loci in the human genome. *PLoS Pathog.* 6, e1000985.
- Im, D.S., and Muzyczka, N. (1992). Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization. *J. Virol.* 66, 1119–1128.
- Ito, T., Yamamoto, S., Hayashi, T., Kodera, M., Mizukami, H., Ozawa, K., and Muramatsu, S. (2009). A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of anti-adeno-associated virus neutralizing antibodies. *Ann. Clin. Biochem.* 46, 508–510.
- Jiang, H., Lillicrap, D., Patarroyo-White, S., Liu, T., Qian, X., Scallan, C.D., Powell, S., Keller, T., McMurray, M., Labelle, A., et al. (2006a). Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2, 6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs. *Blood* 108, 107–115.
- Jiang, H., Couto, L.B., Patarroyo-White, S., Liu, T., Nagy, D., Vargas, J.A., Zhou, S., Scallan, C.D., Sommer, J., Vijay, S., et al. (2006b). Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy. *Blood* 108, 3321–3328.
- Johnson, J.S., and Samulski, R.J. (2009). Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus. *J. Virol.* 83, 2632–2644.
- Johnson, J.S., Li, C., DiPrimio, N., Weinberg, M.S., McCown, T.J., and Samulski, R.J. (2010). Mutagenesis of adeno-associated virus type 2 capsid protein VP1 uncovers new roles for basic amino acids in trafficking and cell-specific transduction. *J. Virol.* 84, 8888–8902.
- Jooss, K., Yang, Y., Fisher, K.J., and Wilson, J.M. (1998). Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J. Virol.* 72, 4212–4223.
- Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K., and Akira, S. (2001). Endotoxin-Induced Maturation of MyD88-Deficient Dendritic Cells. *J. Immunol.* 166, 5688–5694.
- Kaludov, N., Brown, K.E., Walters, R.W., Zabner, J., and Chiorini, J.A. (2001). Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J. Virol.* 75, 6884–6893.

- Kaplitt, M.G., Xiao, X., Samulski, R.J., Li, J., Ojamaa, K., Klein, I.L., Makimura, H., Kaplitt, M.J., Strumpf, R.K., and Diethrich, E.B. (1996). Long-term gene transfer in porcine myocardium after coronary infusion of an adeno-associated virus vector. *Ann. Thorac. Surg.* *62*, 1669–1676.
- Kaplitt, M.G., Feigin, A., Tang, C., Fitzsimons, H.L., Mattis, P., Lawlor, P.A., Bland, R.J., Young, D., Strybing, K., Eidelberg, D., et al. (2007). Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet Lond. Engl.* *369*, 2097–2105.
- Katwal, A.B., Konkalmatt, P.R., Piras, B.A., Hazarika, S., Li, S.S., John Lye, R., Sanders, J.M., Ferrante, E.A., Yan, Z., Annex, B.H., et al. (2013). Adeno-associated virus serotype 9 efficiently targets ischemic skeletal muscle following systemic delivery. *Gene Ther.* *20*, 930–938.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J. Biochem. (Tokyo)* *141*, 137–145.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* *11*, 373–384.
- Kay, M.A., Manno, C.S., Ragni, M.V., Larson, P.J., Couto, L.B., McClelland, A., Glader, B., Chew, A.J., Tai, S.J., Herzog, R.W., et al. (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat. Genet.* *24*, 257–261.
- Keiser, N.W., Yan, Z., Zhang, Y., Lei-Butters, D.C.M., and Engelhardt, J.F. (2011). Unique characteristics of AAV1, 2, and 5 viral entry, intracellular trafficking, and nuclear import define transduction efficiency in HeLa cells. *Hum. Gene Ther.* *22*, 1433–1444.
- Kemper, C., and Atkinson, J.P. (2007). T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 9–18.
- Kessler, P.D., Podsakoff, G.M., Chen, X., McQuiston, S.A., Colosi, P.C., Matelis, L.A., Kurtzman, G.J., and Byrne, B.J. (1996). Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 14082–14087.
- Kiehl, K., Schlehofer, J.R., Schultz, R., Zugaib, M., and Armbruster-Moraes, E. (2002). Adeno-associated virus DNA in human gestational trophoblastic disease. *Placenta* *23*, 410–415.
- King, J.A., Dubielzig, R., Grimm, D., and Kleinschmidt, J.A. (2001). DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J.* *20*, 3282–3291.
- Klein, R.M., Wolf, E.D., Wu, R., and Sanford, J.C. (1992). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987. *Biotechnol. Read. Mass* *24*, 384–386.
- Kleiveland, C.R. (2015). Peripheral Blood Mononuclear Cells. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-

Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, and H. Wichers, eds. (Cham (CH): Springer), p.

Koczot, F.J., Carter, B.J., Garon, C.F., and Rose, J.A. (1973). Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus-associated virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *70*, 215–219.

Kotin, R.M., Siniscalco, M., Samulski, R.J., Zhu, X.D., Hunter, L., Laughlin, C.A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., and Berns, K.I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 2211–2215.

Kotin, R.M., Linden, R.M., and Berns, K.I. (1992). Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J.* *11*, 5071–5078.

Kruzik, A., Koppensteiner, H., Fetahagic, D., Hartlieb, B., Dorn, S., Romeder-Finger, S., Coulibaly, S., Weber, A., Hoellriegl, W., Horling, F.M., et al. (2019a). Detection of Biologically Relevant Low-Titer Neutralizing Antibodies Against Adeno-Associated Virus Require Sensitive In Vitro Assays. *Hum. Gene Ther. Methods* *30*, 35–43.

Kruzik, A., Fetahagic, D., Hartlieb, B., Dorn, S., Koppensteiner, H., Horling, F.M., Scheifflinger, F., Reipert, B.M., and de la Rosa, M. (2019b). Prevalence of Anti-Adeno-Associated Virus Immune Responses in International Cohorts of Healthy Donors. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* *14*, 126–133.

Kuranda, K., Jean-Alphonse, P., Leborgne, C., Hardet, R., Collaud, F., Marmier, S., Costa Verdera, H., Ronzitti, G., Veron, P., and Mingozzi, F. (2018). Exposure to wild-type AAV drives distinct capsid immunity profiles in humans. *J. Clin. Invest.* *128*, 5267–5279.

Kurian, J.J., Lakshmanan, R., Chmely, W.M., Hull, J.A., Yu, J.C., Bennett, A., McKenna, R., and Agbandje-McKenna, M. (2019). Adeno-Associated Virus VP1u Exhibits Protease Activity. *Viruses* *11*.

La Bella, T., Imbeaud, S., Peneau, C., Mami, I., Datta, S., Bayard, Q., Caruso, S., Hirsch, T.Z., Calderaro, J., Morcrette, G., et al. (2019). Adeno-associated virus in the liver: natural history and consequences in tumour development. *Gut*.

Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* *9*, 495–502.

Le Guiner, C., Montus, M., Servais, L., Cherel, Y., Francois, V., Thibaud, J.-L., Wary, C., Matot, B., Larcher, T., Guigand, L., et al. (2014). Forelimb treatment in a large cohort of dystrophic dogs supports delivery of a recombinant AAV for exon skipping in Duchenne patients. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *22*, 1923–1935.

Leborgne, C., Latournerie, V., Boutin, S., Desgue, D., Quéré, A., Pignot, E., Collaud, F., Charles, S., Simon Sola, M., Masat, E., et al. (2019). Prevalence and long-term monitoring of humoral immunity against adeno-associated virus in Duchenne Muscular Dystrophy patients. *Cell. Immunol.* *342*, 103780.

- Lecomte, E., Tournaire, B., Cogné, B., Dupont, J.-B., Lindenbaum, P., Martin-Fontaine, M., Broucq, F., Robin, C., Hebben, M., Merten, O.-W., et al. (2015). Advanced Characterization of DNA Molecules in rAAV Vector Preparations by Single-stranded Virus Next-generation Sequencing. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 4, e260.
- Legoux, F., Debeaupuis, E., Echasserieau, K., De La Salle, H., Saulquin, X., and Bonneville, M. (2010). Impact of TCR reactivity and HLA phenotype on naive CD8 T cell frequency in humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 6731–6738.
- Levy, H.C., Bowman, V.D., Govindasamy, L., McKenna, R., Nash, K., Warrington, K., Chen, W., Muzyczka, N., Yan, X., Baker, T.S., et al. (2009). Heparin binding induces conformational changes in Adeno-associated virus serotype 2. *J. Struct. Biol.* 165, 146–156.
- Li, C., Hirsch, M., Asokan, A., Zeithaml, B., Ma, H., Kafri, T., and Samulski, R.J. (2007a). Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV2) Capsid-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Eliminate Only Vector-Transduced Cells Coexpressing the AAV2 Capsid In Vivo. *J. Virol.* 81, 7540–7547.
- Li, C., Diprimio, N., Bowles, D.E., Hirsch, M.L., Monahan, P.E., Asokan, A., Rabinowitz, J., Agbandje-McKenna, M., and Samulski, R.J. (2012a). Single amino acid modification of adeno-associated virus capsid changes transduction and humoral immune profiles. *J. Virol.* 86, 7752–7759.
- Li, C., Narkbunnam, N., Samulski, R.J., Asokan, A., Hu, G., Jacobson, L.J., Manco-Johnson, M.J., Monahan, P.E., and Joint Outcome Study Investigators (2012b). Neutralizing antibodies against adeno-associated virus examined prospectively in pediatric patients with hemophilia. *Gene Ther.* 19, 288–294.
- Li, H., Murphy, S.L., Giles-Davis, W., Edmonson, S., Xiang, Z., Li, Y., Lasaro, M.O., High, K.A., and Ertl, H.C. (2007b). Pre-existing AAV capsid-specific CD8+ T cells are unable to eliminate AAV-transduced hepatocytes. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 15, 792–800.
- Li, H., Lasaro, M.O., Jia, B., Lin, S.W., Haut, L.H., High, K.A., and Ertl, H.C.J. (2011a). Capsid-specific T-cell responses to natural infections with adeno-associated viruses in humans differ from those of nonhuman primates. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 19, 2021–2030.
- Li, H., Tuyishime, S., Wu, T.-L., Giles-Davis, W., Zhou, D., Xiao, W., High, K.A., and Ertl, H.C.J. (2011b). Adeno-associated virus vectors serotype 2 induce prolonged proliferation of capsid-specific CD8+ T cells in mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 19, 536–546.
- Libri, V., Azevedo, R.I., Jackson, S.E., Di Mitri, D., Lachmann, R., Fuhrmann, S., Vukmanovic-Stejic, M., Yong, K., Battistini, L., Kern, F., et al. (2011). Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4+CD45RA+CD27+ T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process. *Immunology* 132, 326–339.
- Linden, R.M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E., and Berns, K.I. (1996). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11288–11294.
- Ling, C., Wang, Y., Lu, Y., Wang, L., Jayandharan, G.R., Aslanidi, G.V., Li, B., Cheng, B., Ma, W., Lentz, T., et al. (2015a). Enhanced transgene expression from recombinant single-

stranded D-sequence-substituted adeno-associated virus vectors in human cell lines in vitro and in murine hepatocytes in vivo. *J. Virol.* *89*, 952–961.

Ling, C., Wang, Y., Feng, Y., Zhang, Y., Li, J., Hu, X., Wang, L., Zhong, M., Zhai, X., Zolotukhin, I., et al. (2015b). Prevalence of neutralizing antibodies against liver-tropic adeno-associated virus serotype vectors in 100 healthy Chinese and its potential relation to body constitutions. *J. Integr. Med.* *13*, 341–346.

Lisowski, L., Dane, A.P., Chu, K., Zhang, Y., Cunningham, S.C., Wilson, E.M., Nygaard, S., Grompe, M., Alexander, I.E., and Kay, M.A. (2014). Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. *Nature* *506*, 382–386.

Lisowski, L., Tay, S.S., and Alexander, I.E. (2015). Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* *24*, 59–67.

Liu, Q., Huang, W., Zhang, H., Wang, Y., Zhao, J., Song, A., Xie, H., Zhao, C., Gao, D., and Wang, Y. (2014). Neutralizing antibodies against AAV2, AAV5 and AAV8 in healthy and HIV-1-infected subjects in China: implications for gene therapy using AAV vectors. *Gene Ther.* *21*, 732–738.

Liu, Z., Fan, H., and Jiang, S. (2013). CD4⁺ T-cell subsets in transplantation. *Immunol. Rev.* *252*, 183–191.

Lock, M., McGorray, S., Auricchio, A., Ayuso, E., Beecham, E.J., Blouin-Tavel, V., Bosch, F., Bose, M., Byrne, B.J., Caton, T., et al. (2010). Characterization of a recombinant adeno-associated virus type 2 Reference Standard Material. *Hum. Gene Ther.* *21*, 1273–1285.

Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S., and Ma, A. (1998). IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* *9*, 669–676.

Logan, G.J., Dane, A.P., Hallwirth, C.V., Smyth, C.M., Wilkie, E.E., Amaya, A.K., Zhu, E., Khandekar, N., Ginn, S.L., Liao, S.H.Y., et al. (2017). Identification of liver-specific enhancer-promoter activity in the 3' untranslated region of the wild-type AAV2 genome. *Nat. Genet.* *49*, 1267–1273.

Lotery, A.J., Yang, G.S., Mullins, R.F., Russell, S.R., Schmidt, M., Stone, E.M., Lindbloom, J.D., Chiorini, J.A., Kotin, R.M., and Davidson, B.L. (2003). Adeno-associated virus type 5: transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina. *Hum. Gene Ther.* *14*, 1663–1671.

Louis Jeune, V., Joergensen, J.A., Hajjar, R.J., and Weber, T. (2013). Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum. Gene Ther. Methods* *24*, 59–67.

Lusby, E., Fife, K.H., and Berns, K.I. (1980). Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* *34*, 402–409.

Lusby, E., Bohenzky, R., and Berns, K.I. (1981). Inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA: independence of the orientation at either end of the genome. *J. Virol.* *37*, 1083–1086.

- Lux, K., Goerlitz, N., Schlemminger, S., Perabo, L., Goldnau, D., Endell, J., Leike, K., Kofler, D.M., Finke, S., Hallek, M., et al. (2005). Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. *J. Virol.* *79*, 11776–11787.
- Mackerness, K.J., Cox, M.A., Lilly, L.M., Weaver, C.T., Harrington, L.E., and Zajac, A.J. (2010). Pronounced virus-dependent activation drives exhaustion but sustains IFN- γ transcript levels. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 3643–3651.
- Madsen, D., Cantwell, E.R., O'Brien, T., Johnson, P.A., and Mahon, B.P. (2009). Adeno-associated virus serotype 2 induces cell-mediated immune responses directed against multiple epitopes of the capsid protein VP1. *J. Gen. Virol.* *90*, 2622–2633.
- Maguire, A.M., High, K.A., Auricchio, A., Wright, J.F., Pierce, E.A., Testa, F., Mingozzi, F., Bannicelli, J.L., Ying, G., Rossi, S., et al. (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Lond. Engl.* *374*, 1597–1605.
- Malhomme, O., Dutheil, N., Rabreau, M., Armbruster-Moraes, E., Schlehofer, J.R., and Dupressoir, T. (1997). Human genital tissues containing DNA of adeno-associated virus lack DNA sequences of the helper viruses adenovirus, herpes simplex virus or cytomegalovirus but frequently contain human papillomavirus DNA. *J. Gen. Virol.* *78 (Pt 8)*, 1957–1962.
- Manno, C.S., Glenn F. Pierce, Arruda, V.R., Pierce, G.F., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J.J.E., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., et al. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* *12*, 342–347.
- van der Marel, S., Comijn, E.M., Verspaget, H.W., van Deventer, S., van den Brink, G.R., Petry, H., Hommes, D.W., and Ferreira, V. (2011). Neutralizing antibodies against adeno-associated viruses in inflammatory bowel disease patients: Implications for gene therapy. *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 2436–2442.
- Martino, A.T., Suzuki, M., Markusic, D.M., Zolotukhin, I., Ryals, R.C., Moghimi, B., Ertl, H.C.J., Muruve, D.A., Lee, B., and Herzog, R.W. (2011a). The genome of self-complementary adeno-associated viral vectors increases Toll-like receptor 9-dependent innate immune responses in the liver. *Blood* *117*, 6459–6468.
- Martino, A.T., Herzog, R.W., Anegon, I., and Adjali, O. (2011b). Measuring immune responses to recombinant AAV gene transfer. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *807*, 259–272.
- Martino, A.T., Basner-Tschakarjan, E., Markusic, D.M., Finn, J.D., Hinderer, C., Zhou, S., Ostrov, D.A., Srivastava, A., Ertl, H.C.J., Terhorst, C., et al. (2013). Engineered AAV vector minimizes in vivo targeting of transduced hepatocytes by capsid-specific CD8⁺ T cells. *Blood* *121*, 2224–2233.
- Matsushita, T., Elliger, S., Elliger, C., Podsakoff, G., Villarreal, L., Kurtzman, G.J., Iwaki, Y., and Colosi, P. (1998). Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther.* *5*, 938–945.

- 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. *Gene Ther.* *8*, 1248–1254.
- McCarty, D.M., Fu, H., Monahan, P.E., Toulson, C.E., Naik, P., and Samulski, R.J. (2003). Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther.* *10*, 2112–2118.
- McLaughlin, S.K., Collis, P., Hermonat, P.L., and Muzyczka, N. (1988). Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J. Virol.* *62*, 1963–1973.
- McPherson, R.A., Rosenthal, L.J., and Rose, J.A. (1985). Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* *147*, 217–222.
- Mehrle, S., Rohde, V., and Schlehofer, J.R. (2004). Evidence of chromosomal integration of AAV DNA in human testis tissue. *Virus Genes* *28*, 61–69.
- Meliani, A., Leborgne, C., Triffault, S., Jeanson-Leh, L., Veron, P., and Mingozzi, F. (2015). Determination of Anti-Adeno-Associated Virus Vector Neutralizing Antibody Titer with an In Vitro Reporter System. *Hum. Gene Ther. Methods* *26*, 45–53.
- Meliani, A., Boisgerault, F., Haret, R., Marmier, S., Collaud, F., Ronzitti, G., Leborgne, C., Costa Verdera, H., Simon Sola, M., Charles, S., et al. (2018). Antigen-selective modulation of AAV immunogenicity with tolerogenic rapamycin nanoparticles enables successful vector re-administration. *Nat. Commun.* *9*, 4098.
- Mestas, J., and Hughes, C.C.W. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 2731–2738.
- Meyer-Olson, D., Simons, B.C., Conrad, J.A., Smith, R.M., Barnett, L., Lorey, S.L., Duncan, C.B., Ramalingam, R., and Kalams, S.A. (2010). Clonal expansion and TCR-independent differentiation shape the HIV-specific CD8⁺ effector-memory T-cell repertoire in vivo. *Blood* *116*, 396–405.
- Miller, R.G., and Dunkley, M. (1974). Quantitative analysis of the ⁵¹Cr release cytotoxicity assay for cytotoxic lymphocytes. *Cell. Immunol.* *14*, 284–302.
- Mimuro, J., Mizukami, H., Shima, M., Matsushita, T., Taki, M., Muto, S., Higasa, S., Sakai, M., Ohmori, T., Madoiwa, S., et al. (2014). The prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. *J. Med. Virol.* *86*, 1990–1997.
- Mingozzi, F., and High, K.A. (2013). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* *122*, 23–36.
- Mingozzi, F., Maus, M.V., Hui, D.J., Sabatino, D.E., Murphy, S.L., Rasko, J.E.J., Ragni, M.V., Manno, C.S., Sommer, J., Jiang, H., et al. (2007a). CD8⁺ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* *13*, 419–422.
- Mingozzi, F., Hasbrouck, N.C., Basner-Tschakarjan, E., Edmonson, S.A., Hui, D.J., Sabatino, D.E., Zhou, S., Wright, J.F., Jiang, H., Pierce, G.F., et al. (2007b). Modulation of tolerance to

the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood* *110*, 2334–2341.

Mingozzi, F., Maus, M.V., Hui, D.J., Sabatino, D.E., Murphy, S.L., Rasko, J.E.J., Ragni, M.V., Manno, C.S., Sommer, J., Jiang, H., et al. (2007c). CD8⁺ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* *13*, 419–422.

Mingozzi, F., Meulenbergh, J.J., Hui, D.J., Basner-Tschakarjan, E., Hasbrouck, N.C., Edmonson, S.A., Hutnick, N.A., Betts, M.R., Kastelein, J.J., Stroes, E.S., et al. (2009). AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood* *114*, 2077–2086.

Mingozzi, F., Chen, Y., Edmonson, S.C., Zhou, S., Thurlings, R.M., Tak, P.P., High, K.A., and Vervordeldonk, M.J. (2013). Prevalence and pharmacological modulation of humoral immunity to AAV vectors in gene transfer to synovial tissue. *Gene Ther.* *20*, 417–424.

Monahan, P.E., Sun, J., Gui, T., Hu, G., Hannah, W.B., Wichlan, D.G., Wu, Z., Grieger, J.C., Li, C., Suwanmanee, T., et al. (2015). Employing a gain-of-function factor IX variant R338L to advance the efficacy and safety of hemophilia B human gene therapy: preclinical evaluation supporting an ongoing adeno-associated virus clinical trial. *Hum. Gene Ther.* *26*, 69–81.

Monteilhet, V., Saheb, S., Boutin, S., Leborgne, C., Veron, P., Montus, M.-F., Moullier, P., Benveniste, O., and Masurier, C. (2011). A 10 patient case report on the impact of plasmapheresis upon neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 6, and 8. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *19*, 2084–2091.

Moskalenko, M., Chen, L., van Roey, M., Donahue, B.A., Snyder, R.O., McArthur, J.G., and Patel, S.D. (2000). Epitope Mapping of Human Anti-Adeno-Associated Virus Type 2 Neutralizing Antibodies: Implications for Gene Therapy and Virus Structure. *J. Virol.* *74*, 1761–1766.

Moss, R.B., Rodman, D., Spencer, L.T., Aitken, M.L., Zeitlin, P.L., Waltz, D., Milla, C., Brody, A.S., Clancy, J.P., Ramsey, B., et al. (2004). Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* *125*, 509–521.

Mount, J.D. (2002). *Blood* *99*, 2670–2676.

Mueller, C., Chulay, J.D., Trapnell, B.C., Humphries, M., Carey, B., Sandhaus, R.A., McElvaney, N.G., Messina, L., Tang, Q., Rouhani, F.N., et al. (2013). Human Treg responses allow sustained recombinant adeno-associated virus-mediated transgene expression. *J. Clin. Invest.* *123*, 5310–5318.

Mueller, C., Gernoux, G., Gruntman, A.M., Borel, F., Reeves, E.P., Calcedo, R., Rouhani, F.N., Yachnis, A., Humphries, M., Campbell-Thompson, M., et al. (2017). 5 Year Expression and Neutrophil Defect Repair after Gene Therapy in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *25*, 1387–1394.

- Murphy, S.L., Li, H., Zhou, S., Schlachterman, A., High, K.A., and High, K. (2008). Prolonged susceptibility to antibody-mediated neutralization for adeno-associated vectors targeted to the liver. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *16*, 138–145.
- Murphy, S.L., Li, H., Mingozzi, F., Sabatino, D.E., Hui, D.J., Edmonson, S.A., and High, K.A. (2009). Diverse IgG subclass responses to adeno-associated virus infection and vector administration. *J. Med. Virol.* *81*, 65–74.
- Nabekura, T., and Lanier, L.L. (2016). Tracking the fate of antigen-specific versus cytokine-activated natural killer cells after cytomegalovirus infection. *J. Exp. Med.* *213*, 2745–2758.
- Nam, H.-J., Gurda, B.L., McKenna, R., Potter, M., Byrne, B., Salganik, M., Muzyczka, N., and Agbandje-McKenna, M. (2011). Structural studies of adeno-associated virus serotype 8 capsid transitions associated with endosomal trafficking. *J. Virol.* *85*, 11791–11799.
- Nash, K., Chen, W., Salganik, M., and Muzyczka, N. (2009). Identification of cellular proteins that interact with the adeno-associated virus rep protein. *J. Virol.* *83*, 454–469.
- Nathwani, A.C., Gray, J.T., McIntosh, J., Ng, C.Y.C., Zhou, J., Spence, Y., Cochrane, M., Gray, E., Tuddenham, E.G.D., and Davidoff, A.M. (2007). Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates. *Blood* *109*, 1414–1421.
- 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.
- Nault, J.-C., Datta, S., Imbeaud, S., Franconi, A., Mallet, M., Couchy, G., Letouzé, E., Pilati, C., Verret, B., Blanc, J.-F., et al. (2015). Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat. Genet.* *47*, 1187–1193.
- Nayak, S., and Herzog, R.W. (2010). Progress and Prospects: Immune Responses to Viral Vectors. *Gene Ther.* *17*, 295–304.
- Negrete, A., and Kotin, R.M. (2008). Large-scale production of recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *433*, 79–96.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P.H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* *1*, 841–845.
- Nguyen, D.H., Hurtado-Ziola, N., Gagneux, P., and Varki, A. (2006). Loss of Siglec expression on T lymphocytes during human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 7765–7770.
- Ni, T.H., McDonald, W.F., Zolotukhin, I., Melendy, T., Waga, S., Stillman, B., and Muzyczka, N. (1998). Cellular proteins required for adeno-associated virus DNA replication in the absence of adenovirus coinfection. *J. Virol.* *72*, 2777–2787.

- Nicolas, A., Alazard-Dany, N., Biollay, C., Arata, L., Jolinon, N., Kuhn, L., Ferro, M., Weller, S.K., Epstein, A.L., Salvetti, A., et al. (2010). Identification of rep-associated factors in herpes simplex virus type 1-induced adeno-associated virus type 2 replication compartments. *J. Virol.* *84*, 8871–8887.
- Nicolson, S.C., and Samulski, R.J. (2014). Recombinant adeno-associated virus utilizes host cell nuclear import machinery to enter the nucleus. *J. Virol.* *88*, 4132–4144.
- Nonnenmacher, M., and Weber, T. (2011). Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. *Cell Host Microbe* *10*, 563–576.
- Nonnenmacher, M., and Weber, T. (2012). Intracellular Transport of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors. *Gene Ther.* *19*, 649–658.
- Nonnenmacher, M.E., Cintrat, J.-C., Gillet, D., and Weber, T. (2015). Syntaxin 5-dependent retrograde transport to the trans-Golgi network is required for adeno-associated virus transduction. *J. Virol.* *89*, 1673–1687.
- Nony, P., Chadeuf, G., Tessier, J., Moullier, P., and Salvetti, A. (2003). Evidence for packaging of rep-cap sequences into adeno-associated virus (AAV) type 2 capsids in the absence of inverted terminal repeats: a model for generation of rep-positive AAV particles. *J. Virol.* *77*, 776–781.
- Nowrouzi, A., Penaud-Budloo, M., Kaepfel, C., Appelt, U., Le Guiner, C., Moullier, P., Kalle, C. von, Snyder, R.O., and Schmidt, M. (2012). Integration Frequency and Intermolecular Recombination of rAAV Vectors in Non-human Primate Skeletal Muscle and Liver. *Mol. Ther.* *20*, 1177–1186.
- Ogston, P., Raj, K., and Beard, P. (2000). Productive replication of adeno-associated virus can occur in human papillomavirus type 16 (HPV-16) episome-containing keratinocytes and is augmented by the HPV-16 E2 protein. *J. Virol.* *74*, 3494–3504.
- Ogura, T., Mizukami, H., Mimuro, J., Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., Hamada, H., Yoshikawa, H., et al. (2006). Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. *J. Gene Med.* *8*, 990–997.
- Okada, R., Kondo, T., Matsuki, F., Takata, H., and Takiguchi, M. (2008). Phenotypic classification of human CD4⁺ T cell subsets and their differentiation. *Int. Immunol.* *20*, 1189–1199.
- O’Neill, L.A.J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 453–460.
- Park, J.Y., Lim, B.-P., Lee, K., Kim, Y.-G., and Jo, E.-C. (2006). Scalable production of adeno-associated virus type 2 vectors via suspension transfection. *Biotechnol. Bioeng.* *94*, 416–430.
- Parks, W.P., Boucher, D.W., Melnick, J.L., Taber, L.H., and Yow, M.D. (1970). Seroepidemiological and ecological studies of the adenovirus-associated satellite viruses. *Infect. Immun.* *2*, 716–722.

- Penaud-Budloo, M., Le Guiner, C., Nowrouzi, A., Toromanoff, A., Chérel, Y., Chenuaud, P., Schmidt, M., von Kalle, C., Rolling, F., Moullier, P., et al. (2008). Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *J. Virol.* 82, 7875–7885.
- Penaud-Budloo, M., Lecomte, E., Guy-Duché, A., Saleun, S., Roulet, A., Lopez-Roques, C., Tournaire, B., Cogné, B., Léger, A., Blouin, V., et al. (2017). Accurate Identification and Quantification of DNA Species by Next-Generation Sequencing in Adeno-Associated Viral Vectors Produced in Insect Cells. *Hum. Gene Ther. Methods* 28, 148–162.
- Penaud-Budloo, M., François, A., Clément, N., and Ayuso, E. (2018). Pharmacology of Recombinant Adeno-associated Virus Production. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 8, 166–180.
- Pereira, C.C., de Freitas, L.B., de Vargas, P.R.M., de Azevedo, M.L.B., do Nascimento, J.P., and Spano, L.C. (2010). Molecular detection of adeno-associated virus in cases of spontaneous and intentional human abortion. *J. Med. Virol.* 82, 1689–1693.
- Pereira, D.J., McCarty, D.M., and Muzyczka, N. (1997). The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J. Virol.* 71, 1079–1088.
- Pico de Coaña, Y., Choudhury, A., and Kiessling, R. (2015). Checkpoint blockade for cancer therapy: revitalizing a suppressed immune system. *Trends Mol. Med.* 21, 482–491.
- Pien, G.C., Basner-Tschakarjan, E., Hui, D.J., Mentlik, A.N., Finn, J.D., Hasbrouck, N.C., Zhou, S., Murphy, S.L., Maus, M.V., Mingozzi, F., et al. (2009). Capsid antigen presentation flags human hepatocytes for destruction after transduction by adeno-associated viral vectors. *J. Clin. Invest.* 119, 1688–1695.
- Pillay, S., Meyer, N.L., Puschnik, A.S., Davulcu, O., Diep, J., Ishikawa, Y., Jae, L.T., Wosen, J.E., Nagamine, C.M., Chapman, M.S., et al. (2016). An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature* 530, 108–112.
- Pittet, M.J., Valmori, D., Dunbar, P.R., Speiser, D.E., Liénard, D., Lejeune, F., Fleischhauer, K., Cerundolo, V., Cerottini, J.C., and Romero, P. (1999). High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J. Exp. Med.* 190, 705–715.
- Ponnazhagan, S., Mahendra, G., Curiel, D.T., and Shaw, D.R. (2001). Adeno-associated virus type 2-mediated transduction of human monocyte-derived dendritic cells: implications for ex vivo immunotherapy. *J. Virol.* 75, 9493–9501.
- Popa-Wagner, R., Porwal, M., Kann, M., Reuss, M., Weimer, M., Florin, L., and Kleinschmidt, J.A. (2012). Impact of VP1-specific protein sequence motifs on adeno-associated virus type 2 intracellular trafficking and nuclear entry. *J. Virol.* 86, 9163–9174.
- Putnam, D. (2006). Polymers for gene delivery across length scales. *Nat. Mater.* 5, 439–451.
- Qiao, C., Wang, B., Zhu, X., Li, J., and Xiao, X. (2002). A novel gene expression control system and its use in stable, high-titer 293 cell-based adeno-associated virus packaging cell lines. *J. Virol.* 76, 13015–13027.

- Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V., and Srivastava, A. (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat. Med.* *5*, 71–77.
- Rabinowitz, J., Chan, Y.K., and Samulski, R.J. (2019). Adeno-Associated Virus (AAV) Versus Immune Response. *Viruses* *11*.
- Racanelli, V., and Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology*. *Baltim. Md* *43*, S54-62.
- Ramamoorth, M., and Narvekar, A. (2015). Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* *9*, GE01–GE06.
- Reeves, R.K., Li, H., Jost, S., Blass, E., Li, H., Schafer, J.L., Varner, V., Manickam, C., Eslamizar, L., Altfeld, M., et al. (2015). Antigen-specific NK cell memory in rhesus macaques. *Nat. Immunol.* *16*, 927–932.
- Rodenko, B., Toebes, M., Hadrup, S.R., van Esch, W.J.E., Molenaar, A.M., Schumacher, T.N.M., and Ovaas, H. (2006). Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. *Nat. Protoc.* *1*, 1120–1132.
- Rodino-Klapac, L.R., Montgomery, C.L., Mendell, J.R., and Chicoine, L.G. (2011). AAV-mediated gene therapy to the isolated limb in rhesus macaques. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *709*, 287–298.
- Rogers, G.L., Shirley, J.L., Zolotukhin, I., Kumar, S.R.P., Sherman, A., Perrin, G.Q., Hoffman, B.E., Srivastava, A., Basner-Tschakarjan, E., Wallet, M.A., et al. (2017). Plasmacytoid and conventional dendritic cells cooperate in crosspriming AAV capsid-specific CD8⁺ T cells. *Blood* *129*, 3184–3195.
- Rohde, V., Erles, K., Sattler, H.P., Derouet, H., Wullich, B., and Schlehofer, J.R. (1999). Detection of adeno-associated virus in human semen: does viral infection play a role in the pathogenesis of male infertility? *Fertil. Steril.* *72*, 814–816.
- Rose, J.A., Berns, K.I., Hoggan, M.D., and Kocot, F.J. (1969). Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: formation of a DNA density hybrid on release of viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *64*, 863–869.
- Rossi, A., Dupaty, L., Aillot, L., Zhang, L., Gallien, C., Hallek, M., Odenthal, M., Adriouch, S., Salvetti, A., and Büning, H. (2019). Vector uncoating limits adeno-associated viral vector-mediated transduction of human dendritic cells and vector immunogenicity. *Sci. Rep.* *9*, 3631.
- Ruffing, M., Zentgraf, H., and Kleinschmidt, J.A. (1992). Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J. Virol.* *66*, 6922–6930.
- Russell, S., Bennett, J., Wellman, J.A., Chung, D.C., Yu, Z.-F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., et al. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* *390*, 849–860.

- de Saint Basile, G., Ménasché, G., and Fischer, A. (2010). Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 568–579.
- Salas, D., Kwikkers, K.L., Zabaleta, N., Bazo, A., Petry, H., van Deventer, S.J., Aseguinolaza, G.G., and Ferreira, V. (2019). Immunoabsorption enables successful rAAV5-mediated repeated hepatic gene delivery in nonhuman primates. *Blood Adv.* *3*, 2632–2641.
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 745–763.
- Samaranch, L., Salegio, E.A., San Sebastian, W., Kells, A.P., Foust, K.D., Bringas, J.R., Lamarre, C., Forsayeth, J., Kaspar, B.K., and Bankiewicz, K.S. (2012). Adeno-associated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* *23*, 382–389.
- Samulski, R.J., and Muzyczka, N. (2014). AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu. Rev. Virol.* *1*, 427–451.
- Sanlioglu, S., Benson, P.K., Yang, J., Atkinson, E.M., Reynolds, T., and Engelhardt, J.F. (2000). Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J. Virol.* *74*, 9184–9196.
- Saudan, P., Vlach, J., and Beard, P. (2000). Inhibition of S-phase progression by adeno-associated virus Rep78 protein is mediated by hypophosphorylated pRb. *EMBO J.* *19*, 4351–4361.
- Scallan, C.D., Jiang, H., Liu, T., Patarroyo-White, S., Sommer, J.M., Zhou, S., Couto, L.B., and Pierce, G.F. (2006). Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood* *107*, 1810–1817.
- Schappert, A., Schneck, J.P., Suarez, L., Oelke, M., and Schütz, C. (2018). Soluble MHC class I complexes for targeted immunotherapy. *Life Sci.* *209*, 255–258.
- Schlehofer, J.R., Ehrbar, M., and zur Hausen, H. (1986). Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helper virus dependent parvovirus. *Virology* *152*, 110–117.
- Schlehofer, J.R., Boeke, C., Reuland, M., and Eggert-Kruse, W. (2012). Presence of DNA of adeno-associated virus in subfertile couples, but no association with fertility factors. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *27*, 770–778.
- Schnepf, B.C., Jensen, R.L., Chen, C.-L., Johnson, P.R., and Clark, K.R. (2005). Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J. Virol.* *79*, 14793–14803.
- Schnepf, B.C., Jensen, R.L., Clark, K.R., and Johnson, P.R. (2009). Infectious molecular clones of adeno-associated virus isolated directly from human tissues. *J. Virol.* *83*, 1456–1464.

- Schnödt, M., and Büning, H. (2017). Improving the Quality of Adeno-Associated Viral Vector Preparations: The Challenge of Product-Related Impurities. *Hum. Gene Ther. Methods* 28, 101–108.
- Sciorati, C., Rigamonti, E., Manfredi, A.A., and Rovere-Querini, P. (2016). Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. *Cell Death Differ.* 23, 927–937.
- Seder, R.A., and Le Gros, G.G. (1995). The functional role of CD8+ T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* 181, 5–7.
- Shao, W., Chen, X., Samulski, R.J., Hirsch, M.L., and Li, C. (2018). Inhibition of antigen presentation during AAV gene therapy using virus peptides. *Hum. Mol. Genet.* 27, 601–613.
- Shen, S., Bryant, K.D., Brown, S.M., Randell, S.H., and Asokan, A. (2011). Terminal N-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus 9. *J. Biol. Chem.* 286, 13532–13540.
- Shen, T., Zheng, J., Xu, C., Liu, J., Zhang, W., Lu, F., and Zhuang, H. (2010a). Pd-1 Expression on Peripheral Cd8+ Tem/Temra Subsets Closely Correlated with Hcv Viral Load in Chronic Hepatitis C Patients. *Virology* 7, 310.
- Shen, T., Zheng, J., Xu, C., Liu, J., Zhang, W., Lu, F., and Zhuang, H. (2010b). PD-1 expression on peripheral CD8+ TEM/TEMRA subsets closely correlated with HCV viral load in chronic hepatitis C patients. *Virology* 7, 310.
- Simonelli, F., Maguire, A.M., Testa, F., Pierce, E.A., Mingozi, F., Bennicelli, J.L., Rossi, S., Marshall, K., Banfi, S., Surace, E.M., et al. (2010). Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 643–650.
- Smith, R.H., and Kotin, R.M. (1998). The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity. *J. Virol.* 72, 4874–4881.
- Snyder, R.O. (1999). *Nat Med* 5, 64–70.
- Sonntag, F., Bleker, S., Leuchs, B., Fischer, R., and Kleinschmidt, J.A. (2006). Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids with Externalized VP1/VP2 Trafficking Domains Are Generated prior to Passage through the Cytoplasm and Are Maintained until Uncoating Occurs in the Nucleus. *J. Virol.* 80, 11040–11054.
- Sonntag, F., Schmidt, K., and Kleinschmidt, J.A. (2010). A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10220–10225.
- Spear, I.S., Fife, K.H., Hauswirth, W.W., Jones, C.J., and Berns, K.I. (1977). Evidence for two nucleotide sequence orientations within the terminal repetition of adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* 24, 627–634.
- Srivastava, A. (2016). In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr. Opin. Virol.* 21, 75–80.
- Stieger, K., Schroeder, J., Provost, N., Mendes-Madeira, A., Belbellaa, B., Le Meur, G., Weber, M., Deschamps, J.-Y., Lorenz, B., Moullier, P., et al. (2009). Detection of intact

rAAV particles up to 6 years after successful gene transfer in the retina of dogs and primates. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17, 516–523.

Streeck, H., Frahm, N., and Walker, B.D. (2009). The role of IFN-gamma Elispot assay in HIV vaccine research. *Nat. Protoc.* 4, 461–469.

Strick-Marchand, H., Dusséaux, M., Darche, S., Huntington, N.D., Legrand, N., Masse-Ranson, G., Corcuff, E., Ahodantin, J., Weijer, K., Spits, H., et al. (2015). A novel mouse model for stable engraftment of a human immune system and human hepatocytes. *PloS One* 10, e0119820.

Sudres, M., Ciré, S., Vasseur, V., Brault, L., Da Rocha, S., Boisgérault, F., Le Bec, C., Gross, D.A., Blouin, V., Ryffel, B., et al. (2012). MyD88 signaling in B cells regulates the production of Th1-dependent antibodies to AAV. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 1571–1581.

Summerford, C., and Samulski, R.J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J. Virol.* 72, 1438–1445.

Summerford, C., Bartlett, J.S., and Samulski, R.J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat. Med.* 5, 78–82.

Sun, L., Tu, L., Gao, G., Sun, X., Duan, J., and Lu, Y. (2013). Assessment of a passive immunity mouse model to quantitatively analyze the impact of neutralizing antibodies on adeno-associated virus-mediated gene transfer. *J. Immunol. Methods* 387, 114–120.

Tanel, A., Fonseca, S.G., Yassine-Diab, B., Bordi, R., Zeidan, J., Shi, Y., Benne, C., and Sékaly, R.-P. (2009). Cellular and molecular mechanisms of memory T-cell survival. *Expert Rev. Vaccines* 8, 299–312.

Tao, J., Shelat, S.G., Jaffe, E.S., and Bagg, A. (2002). Aggressive Epstein-Barr virus-associated, CD8+, CD30+, CD56+, surface CD3-, natural killer (NK)-like cytotoxic T-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 26, 111–118.

Thwaite, R., Pagès, G., Chillón, M., and Bosch, A. (2015). AAVrh.10 immunogenicity in mice and humans. Relevance of antibody cross-reactivity in human gene therapy. *Gene Ther.* 22, 196–201.

Tian, Y., Babor, M., Lane, J., Schulten, V., Patil, V.S., Seumois, G., Rosales, S.L., Fu, Z., Picarda, G., Burel, J., et al. (2017). Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA. *Nat. Commun.* 8, 1–13.

Tobiasch, E., Rabreau, M., Geletneky, K., Laruë-Charlus, S., Severin, F., Becker, N., and Schlehofer, J.R. (1994). Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J. Med. Virol.* 44, 215–222.

Toromanoff, A., Chérel, Y., Guilbaud, M., Penaud-Budloo, M., Snyder, R.O., Haskins, M.E., Deschamps, J.-Y., Guigand, L., Podevin, G., Arruda, V.R., et al. (2008). Safety and Efficacy of Regional Intravenous (RI) Versus Intramuscular (IM) Delivery of rAAV1 and rAAV8 to Nonhuman Primate Skeletal Muscle. *Mol. Ther.* 16, 1291–1299.

- Toublanc, E., Benraiss, A., Bonnin, D., Blouin, V., Brument, N., Cartier, N., Epstein, A.L., Moullier, P., and Salvetti, A. (2004). Identification of a replication-defective herpes simplex virus for recombinant adeno-associated virus type 2 (rAAV2) particle assembly using stable producer cell lines. *J. Gene Med.* *6*, 555–564.
- Tratschin, J.D., West, M.H., Sandbank, T., and Carter, B.J. (1984). A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase. *Mol. Cell. Biol.* *4*, 2072–2081.
- Tremoulet, A.H., and Albani, S. (2005). Immunomics in clinical development: bridging the gap. *Expert Rev. Clin. Immunol.* *1*, 3–6.
- Trinchieri, G., and Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 179–190.
- Tse, L.V., Klinc, K.A., Madigan, V.J., Castellanos Rivera, R.M., Wells, L.F., Havlik, L.P., Smith, J.K., Agbandje-McKenna, M., and Asokan, A. (2017). Structure-guided evolution of antigenically distinct adeno-associated virus variants for immune evasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E4812–E4821.
- Tu, W., Zheng, J., Liu, Y., Sia, S.F., Liu, M., Qin, G., Ng, I.H.Y., Xiang, Z., Lam, K.-T., Peiris, J.S.M., et al. (2011). The aminobisphosphonate pamidronate controls influenza pathogenesis by expanding a gammadelta T cell population in humanized mice. *J. Exp. Med.* *208*, 1511–1522.
- Urabe, M., Ding, C., and Kotin, R.M. (2002). Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum. Gene Ther.* *13*, 1935–1943.
- Vandamme, C., Adjali, O., and Mingozzi, F. (2017). Unraveling the Complex Story of Immune Responses to AAV Vectors Trial After Trial. *Hum. Gene Ther.* *28*, 1061–1074.
- Venturoli, S., Cricca, M., Bonvicini, F., Gallinella, G., Gentilomi, G., Zerbini, M., and Musiani, M. (2001). Detection of adeno-associated virus DNA in female genital samples by PCR-ELISA. *J. Med. Virol.* *64*, 577–582.
- Vercauteren, K., Hoffman, B.E., Zolotukhin, I., Keeler, G.D., Xiao, J.W., Basner-Tschakarjan, E., High, K.A., Ertl, H.C., Rice, C.M., Srivastava, A., et al. (2016). Superior In vivo Transduction of Human Hepatocytes Using Engineered AAV3 Capsid. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *24*, 1042–1049.
- Veron, P., Allo, V., Rivière, C., Bernard, J., Douar, A.-M., and Masurier, C. (2007). Major subsets of human dendritic cells are efficiently transduced by self-complementary adeno-associated virus vectors 1 and 2. *J. Virol.* *81*, 5385–5394.
- Veron, P., Boutin, S., Martin, S., Chaperot, L., Plumas, J., Davoust, J., and Masurier, C. (2009). Highly efficient transduction of human plasmacytoid dendritic cells without phenotypic and functional maturation. *J. Transl. Med.* *7*, 10.
- Veron, P., Leborgne, C., Monteilhet, V., Boutin, S., Martin, S., Moullier, P., and Masurier, C. (2012). Humoral and cellular capsid-specific immune responses to adeno-associated virus type 1 in randomized healthy donors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 6418–6424.

Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532.

Voelter, V., Rufer, N., Reynard, S., Greub, G., Brookes, R., Guillaume, P., Grosjean, F., Fagerberg, T., Michelin, O., Rowland-Jones, S., et al. (2008). Characterization of Melan-A reactive memory CD8⁺ T cells in a healthy donor. *Int. Immunol.* 20, 1087–1096.

Wagner, J.A., Reynolds, T., Moran, M.L., Moss, R.B., Wine, J.J., Flotte, T.R., and Gardner, P. (1998). Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus. *Lancet Lond. Engl.* 351, 1702–1703.

Wagner, J.A., Nepomuceno, I.B., Messner, A.H., Moran, M.L., Batson, E.P., Dimiceli, S., Brown, B.W., Desch, J.K., Norbash, A.M., Conrad, C.K., et al. (2002). A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Hum. Gene Ther.* 13, 1349–1359.

Walz, C., Deprez, A., Dupressoir, T., Dürst, M., Rabreau, M., and Schlehofer, J.R. (1997). Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 6), 1441–1452.

Wang, D., and Gao, G. (2014). State-Of-The-Art Human Gene Therapy: Part II. Gene Therapy Strategies and Clinical Applications. *Discov. Med.* 18, 151–161.

Wang, L., Figueredo, J., Calcedo, R., Lin, J., and Wilson, J.M. (2007). Cross-presentation of adeno-associated virus serotype 2 capsids activates cytotoxic T cells but does not render hepatocytes effective cytolytic targets. *Hum. Gene Ther.* 18, 185–194.

Wang, L., Bell, P., Somanathan, S., Wang, Q., He, Z., Yu, H., McMenamin, D., Goode, T., Calcedo, R., and Wilson, J.M. (2015). Comparative Study of Liver Gene Transfer With AAV Vectors Based on Natural and Engineered AAV Capsids. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 23, 1877–1887.

Wang, X.S., Qing, K., Ponnazhagan, S., and Srivastava, A. (1997). Adeno-associated virus type 2 DNA replication in vivo: mutation analyses of the D sequence in viral inverted terminal repeats. *J. Virol.* 71, 3077–3082.

Wang, Z., Ma, H.-I., Li, J., Sun, L., Zhang, J., and Xiao, X. (2003). Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 10, 2105–2111.

Wang, Z., Deng, X., Zou, W., Engelhardt, J.F., Yan, Z., and Qiu, J. (2017). Human Bocavirus 1 Is a Novel Helper for Adeno-Associated Virus Replication. *J. Virol.*

Weber, M., Rabinowitz, J., Provost, N., Conrath, H., Folliot, S., Briot, D., Chérel, Y., Chenuaud, P., Samulski, J., Moullier, P., et al. (2003). Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 7, 774–781.

Welsh, R.M., and Waggoner, S.N. (2013). NK cells controlling virus-specific T cells: rheostats for acute vs. persistent infections. *Virology* 435, 37–45.

- Weltevrede, M., Eilers, R., de Melker, H.E., and van Baarle, D. (2016). Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: A systematic review. *Exp. Gerontol.* *77*, 87–95.
- Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 486–499.
- Wherry, E.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., and Ahmed, R. (2003). Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* *77*, 4911–4927.
- Wu, Z., Miller, E., Agbandje-McKenna, M., and Samulski, R.J. (2006). Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. *J. Virol.* *80*, 9093–9103.
- Xiao, P.-J., and Samulski, R.J. (2012). Cytoplasmic trafficking, endosomal escape, and perinuclear accumulation of adeno-associated virus type 2 particles are facilitated by microtubule network. *J. Virol.* *86*, 10462–10473.
- Xiao, W., Warrington, K.H., Hearing, P., Hughes, J., and Muzyczka, N. (2002). Adenovirus-Facilitated Nuclear Translocation of Adeno-Associated Virus Type 2. *J. Virol.* *76*, 11505–11517.
- Xiao, X., Li, J., and Samulski, R.J. (1996). Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J. Virol.* *70*, 8098–8108.
- Xiao, X., Xiao, W., Li, J., and Samulski, R.J. (1997). A novel 165-base-pair terminal repeat sequence is the sole cis requirement for the adeno-associated virus life cycle. *J. Virol.* *71*, 941–948.
- Xiao, X., Li, J., and Samulski, R.J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.* *72*, 2224–2232.
- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A., and Chapman, M.S. (2002). The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 10405–10410.
- Yang, N.S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., and McCabe, D. (1990). In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 9568–9572.
- Ye, G.-J., Scotti, M.M., Liu, J., Wang, L., Knop, D.R., and Veres, G. (2011). Clearance and characterization of residual HSV DNA in recombinant adeno-associated virus produced by an HSV complementation system. *Gene Ther.* *18*, 135–144.
- Yin, H., Kanasty, R.L., Eltoukhy, A.A., Vegas, A.J., Dorkin, J.R., and Anderson, D.G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 541–555.
- Yoon-Robarts, M., and Linden, R.M. (2003). Identification of active site residues of the adeno-associated virus type 2 Rep endonuclease. *J. Biol. Chem.* *278*, 4912–4918.

- Young, S.M., McCarty, D.M., Degtyareva, N., and Samulski, R.J. (2000). Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination. *J. Virol.* 74, 3953–3966.
- Zaiss, A.-K., Liu, Q., Bowen, G.P., Wong, N.C.W., Bartlett, J.S., and Muruve, D.A. (2002). Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* 76, 4580–4590.
- Zaiss, A.K., Cotter, M.J., White, L.R., Clark, S.A., Wong, N.C.W., Holers, V.M., Bartlett, J.S., and Muruve, D.A. (2008). Complement Is an Essential Component of the Immune Response to Adeno-Associated Virus Vectors. *J. Virol.* 82, 2727–2740.
- Zarate-Perez, F., Mansilla-Soto, J., Bardelli, M., Burgner, J.W., Villamil-Jarauta, M., Kekilli, D., Samsó, M., Linden, R.M., and Escalante, C.R. (2013). Oligomeric properties of adeno-associated virus Rep68 reflect its multifunctionality. *J. Virol.* 87, 1232–1241.
- Zheng, J., Liu, Y., Liu, Y., Liu, M., Xiang, Z., Lam, K.-T., Lewis, D.B., Lau, Y.-L., and Tu, W. (2013). Human CD8⁺ regulatory T cells inhibit GVHD and preserve general immunity in humanized mice. *Sci. Transl. Med.* 5, 168ra9.
- Zheng, Y., Zha, Y., and Gajewski, T.F. (2008). Molecular regulation of T-cell anergy. *EMBO Rep.* 9, 50–55.
- Zhong, L., Li, B., Jayandharan, G., Mah, C.S., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., Herzog, R.W., Weigel-Van Aken, K.A., Hobbs, J.A., Zolotukhin, S., et al. (2008). Tyrosine-phosphorylation of AAV2 vectors and its consequences on viral intracellular trafficking and transgene expression. *Virology* 381, 194–202.
- Zhou, X., and Muzyczka, N. (1998). In vitro packaging of adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* 72, 3241–3247.
- Zhou, S., Ou, R., Huang, L., Price, G.E., and Moskophidis, D. (2004). Differential tissue-specific regulation of antiviral CD8⁺ T-cell immune responses during chronic viral infection. *J. Virol.* 78, 3578–3600.
- Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y. (2009). The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 2388–2398.

ANNEXES

Communication affichée : American society of gene and cell therapy, Chicago 2018

Characterization of human pre-existing cellular immunity against AAV 2, 4, 5, 8 and 9 serotypes



Rebecca XICLUNA^{1*}, Marie DEVAUX¹, Célia COUZINIE¹, Nicolas JAULIN¹, Céline VANDAMME^{1,2}, Oumeya ADJALI¹

¹: Inserm UMR 1089, Université de Nantes, CHU de Nantes, Nantes, France

²: Institute of Clinical Medicine, University of Eastern Finland, Department of Clinical Microbiology, Kuopio, Finland

*E-mail: rebecca.xicluna@univ-nantes.fr



TRANSLATIONAL GENE THERAPY FOR GENETIC DISEASES

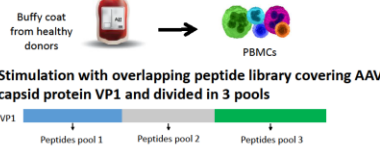
Introduction

Recombinant adeno-associated virus (rAAV) is the most used viral vector for *in vivo* gene therapy. However, one of the major hurdles to rAAV-based gene transfer clinical safety and efficacy remains host immunity against the viral capsid. Humans are natural hosts to wild type (WT) AAV and pre-existing humoral and cellular immunity against the capsid has been widely evidenced. Upon administration, rAAV vector can interact with the immune system at multiple levels, the consequences of which are not always easily determined. While the impact and the prevalence of anti-AAV pre-existing humoral is well known, the impact of anti-capsid pre-existing cellular immunity remains far less described. To our knowledge, few studies have reported the prevalence of AAV-specific T cell responses in the general population, particularly against AAV 8 and 9 serotypes that have recently emerged as promising tools for clinical applications. Currently, ELISpot IFN γ assay is the conventional method used to detect anti-capsid cellular responses in rAAV-based gene therapy clinical trials. Nevertheless, anti-AAV IFN γ ELISpot positive patient doesn't always show an effector cytotoxic response against transduced cells in patients suggesting that IFN γ cytokine alone may not be sufficient to determine the functionality (Th1, Th2, exhausted, regulatory...) of capsid specific T cells. Therefore, functional read-outs that could be correlated to clinical outcome in patients remain to be found.

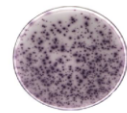
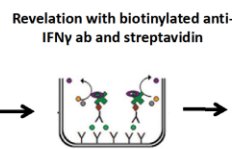
Aims: In our study, we used IFN- γ ELISpot assays to investigate the prevalence of circulating T lymphocytes directed against AAV 2, 4, 5, 8, and 9 serotypes among healthy human donors. In a second step, CD4⁺ or CD8⁺ T cell depletions have been performed prior ELISpot assay to determine responding T cell population. To characterize the functionality of IFN γ positive cells, we also performed fluorospot assays allowing poly-functional read-outs of AAV-specific T cell responses.

Anti-AAV ELISpot assay principle

Isolation of Peripheral Blood mononuclear cells (PBMCs)



Stimulation using anti-IFN γ antibody coated plate



Spot Forming Cells (SFC) per million cells
Threshold: 3x negative control
Statistical analyses: DFR(2x) test

Results

1 High prevalence of capsid-specific cellular response against AAV9 compared to AAV2, AAV4, AAV5 and AAV8

Positive donors	AAV2			AAV4			AAV5			AAV8			AAV9		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
6% (5/80)				10% (8/80)			0% (0/93)			21% (19/91)			49.4% (41/83)		
Positive donors by	0	4/5	2/5	1/8	3/8	4/8				4/19	11/19	16/19	5/41	5/41	38/41

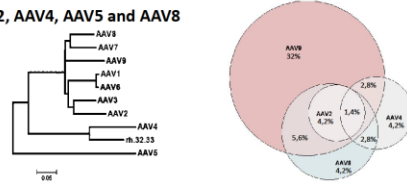


Table 1: Overview of anti-AAV2, anti-AAV4, anti-AAV5, anti-AAV8 and anti-AAV9 IFN γ ELISpot responses on total PBMCs. IFN γ ELISpot responses were assessed after 36-48h stimulation of whole PBMCs with 3 pools of overlapping peptides covering the whole AAV capsid sequences. Positive threshold was calculated as three times the value obtained with medium alone or at least 50 SFC/10⁶ cells.

Figure 1: Cross-reactivity of anti-AAV2, anti-AAV4, anti-AAV5, anti-AAV8 and anti-AAV9 IFN γ ELISpot responses on total PBMCs. Anti-AAV2, anti-AAV4, anti-AAV5, anti-AAV8 and anti-AAV9 IFN γ ELISpot responses were assessed and compared in a cohort of 71 donors using a Venn diagram; Phylogeny of cap protein (VP1) of different AAVs (Calcedo et al, 2009)

- Anti-AAV9 pre-existing immunity is the most prevalent. In contrast no positive donor was found for serotype 5.
- Cross-reactivity is observed between AAV2, AAV8 and AAV9 that are all three phylogenetically closed.
- Prospect: Identification of immunodominant peptides

2 Anti-AAV ELISpot assay after CD4⁺ or CD8⁺ T cell depletion.

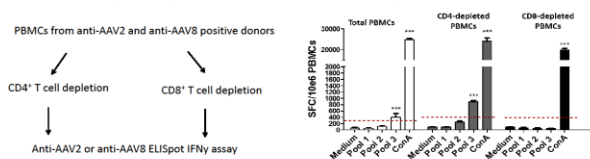


Figure 2: Representative example of anti-AAV8 IFN γ ELISpot responses on total PBMCs and on CD4⁺ or CD8⁺ depleted PBMCs. CD4⁺ or CD8⁺ T cells were depleted from PBMCs using magnetic sorting, prior to IFN γ ELISpot assays that were performed as indicated above.

- Anti-AAV2 and anti-AAV8 responses are mediated by CD8⁺ T cells in all positive donors tested (n=4 and n= 16, respectively).
- CD4⁺ depletion increases ELISpot sensitivity.
- No correlation between pre-existing humoral and cellular immunity against serotype AAV2, AAV8 and AAV9
- Prospect: To test on AAV4 and AAV9 positive donors

3 No correlation between humoral and cellular response

	Prevalence of pre-existing immunity against		
	AAV2	AAV8	AAV9
Humoral only	37,50%	30%	11,30%
Cellular only	2,50%	17,50%	41,60%
No humoral and no cellular	52,50%	35%	33,30%
Humoral and cellular	7,50%	17,50%	13,80%

Table 2: Overview of anti-AAV2, anti-AAV8 and anti-AAV9 cellular and humoral response in a cohort of healthy donors. Anti-AAV cellular response was assessed by IFN γ ELISpot and anti-AAV humoral response was assessed by ELISA in a cohort of 40 donors.

4 Poly-functional assessment of AAV-specific T cell responses using the Fluorospot-based technology

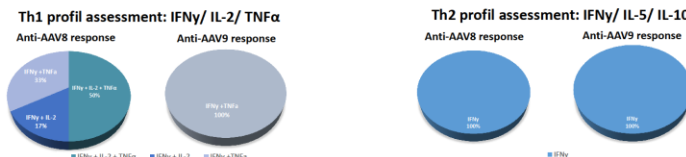


Figure 4: Anti-AAV8 and anti-AAV9 T cell poly-functionality using IFN γ /IL-2/TNF α and IFN γ /IL-5/IL-10 Fluorospot responses. Fluorospot responses were assessed on 8 positive donors for each serotype. Each slice indicates the proportion of donors secreting one, two or three cytokines simultaneously.

- Fluorospot-based technology allows a sensitive and simultaneous detection of 3 cytokines (Th1 profile or Th2 profile)
- Different profiles for anti-AAV8 responses.
- A unique profile for anti-AAV9 responses (n=8): IFN γ /TNF α /IL-2 → T cell exhaustion?
- Prospect: To better characterize anti-AAV9 T cell poly-functionality by isolation of responding T-cell.

Conclusions

We evidenced in this study AAV serotype-dependent prevalence of pre-existing cellular immunity with the highest prevalence against AAV9. Developing assays combining both accrued detection sensitivity and multiparametric poly-functional assessment should prove to be the way to efficient pre-screening and monitoring of patients in clinical trials. In that context, we have proved fluorospot assay utility as they allowed poly-functional assessment of AAV-specific T cell responses with the same cell quantity. Their use in clinical trials could help predict the impact of AAV capsid-specific cellular immunity on the safety and efficiency of rAAV-based gene transfer. We have demonstrated a particular lymphocyte profile against AAV9. This result is particularly interesting given the number of clinical trials and the controversy around this serotype.

Communication affichée : European Congress of Immunology, Amsterdam 2018

P.D4.08.22

Pre-existing anti-AAV8 virus CD8+ T cells are detected in humans with a cytotoxic function



Rebecca XICLUNA¹, Céline VANDAMME¹, Marie DEVAUX¹, Nicolas JAULIN¹, Célia COUZINIE¹, Oumeya ADJALI¹

¹ Inserm UMR 1089, Université de Nantes, CHU de Nantes, Nantes, France
*E-mail: rebecca.xicluna@univ-nantes.fr



TRANSLATIONAL GENE THERAPY FOR GENETIC DISEASES

Introduction

Recombinant adeno-associated virus (rAAV) is the most used viral vector for *in vivo* gene therapy. However, one of the major hurdles to rAAV-based gene transfer clinical safety and efficiency remains the onset of anti-capsid immune responses. Humans are natural hosts to wild type (WT) AAV virus and pre-existing humoral and cellular immunity against the capsid has been widely evidenced. Upon administration, rAAV vector can interact with the immune system at multiple levels, the consequence of which are not always easily determined. While the impact of anti-AAV pre-existing humoral is well known, the impact of anti-capsid pre-existing cellular immunity remains far less described. One of the main reasons for this issue is that due to the very low frequency (<1.10⁻⁶ PBMCs) of circulating capsid-specific CD8⁺ T cells. This makes their detection difficult with usual assays such as ELISpot. Which is the conventional method used to detect anti-capsid cellular responses in rAAV-based gene therapy clinical trials. Moreover, anti-AAV IFN γ ELISpot positive patient doesn't always show an effector cytotoxic response against transduced cells in patients suggesting that IFN γ cytokine alone may not be sufficient to determine the functionality of capsid specific T cells. Therefore, additional functional read-outs that could be correlated to clinical outcome in patients remain to be found.

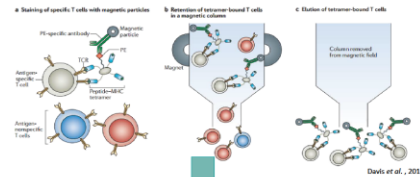
Aims: In order to improve detection sensibility of capsid specific CD8⁺ T cells in PBMCs, we used TAME (tetramer-associated magnetic enrichment) strategy and further characterized the phenotype and function of AAV-specific CD8 enriched cells. TAME results were confronted with IFN γ ELISpot responses.

Material & Methods

Tetramer mediated enrichment:

Aim: Detection of AAV serotype 8-specific CD8⁺ T cells

- PBMCs from HLA-A2/02*01 and HLA-B7/07*02 healthy human donors
- MHC A2/B7 tetramers loaded with AAV8 capsid peptide pools or immunodominant peptide (A2: LDQYLYYL / B7: IPQYGYLTL)
- Flow cytometry-based detection

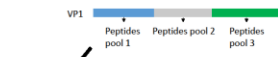


Peripheral Blood Mononuclear Cells

Anti-AAV8 ELISpot assay:

Aim: Detection of AAV8 specific IFN γ positive cells in healthy human donors.

Overlapping peptide library covering AAV serotype 8 capsid and divided in 3 pools



Revelation with biotinylated anti-IFN γ ab and streptavidin

Stimulation with peptides using anti-IFN γ antibody coated plate



Spot Forming Cells (SFC) per million cells
Threshold: 3x negative control

Statistical analyses: DFR(2x) test

Results

Frequencies and phenotype of AAV8-specific CD8⁺ T lymphocytes in healthy donors using TAME method

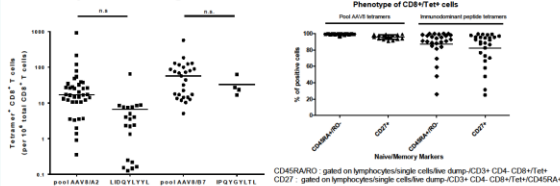


Figure 1: Ex vivo frequencies and phenotype of A2.1-restricted and B7.2-restricted AAV8-specific CD8⁺ T cells.

- AAV-specific CD8⁺ T cells detected in all donors tested
- No significant difference between the frequencies obtained with peptide pool vs immunodominant peptide
- Majority of specific cells are CD45RA⁺/CD27⁺ → Testing other markers in progress

Functionality of generated T cell lines (following TAME-based enrichment)

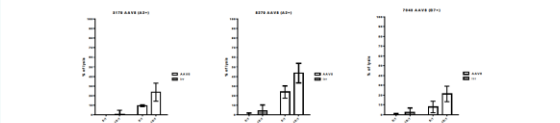
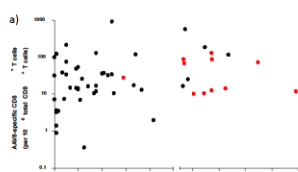


Figure 3: Assessment of cytotoxic activity of AAV8-specific CD8⁺ T cell lines. 4 cell lines (2 A2.1 and 2 B7.2) were assessed in response to target cells loaded with AAV8 peptides (AAV8) or irrelevant peptides (Irr). Percentage of lysis was calculated by LDH release measurement.

→ Anti-AAV8 CD8⁺ T cells are functional and specific.

Correlation study

Figure 5: Correlation study between AAV8-specific CD8⁺ T cell TAME-based frequencies and anti-AAV8 IFN γ ELISpot responses. Frequencies of AAV8-specific CD8⁺ T cells determined after TAME enrichment (a) with AAV8 peptides pools and (b) with immunodominant peptide were plotted against the number of IFN γ -secreting cells determined by ELISpot assay for the same donors.



→ Ex vivo frequencies of AAV8-specific CD8⁺ T cells are not correlated with IFN γ ELISpot responses.

Anti-AAV8 IFN γ ELISpot assay

HLA Allele	Number of donors tested	Number of positive AAV8 responses	Major pool
A2.1+/B7.2-	58	6 (10,34%)	Pool 1
A2.1-/B7.2+	18	6 (33,3%)	Pool 3
A2.1+/B7.2+	22	2 (9,1%)	Pool 3
TOTAL	98	12 (14,3%)	Pool 3

Figure 2: Overview of anti-AAV8 IFN γ ELISpot responses on total PBMCs.

→ Not all donors respond in anti-AAV8 ELISpot assay

Anti-AAV ELISpot assay after CD4⁺ or CD8⁺ T cell depletion.

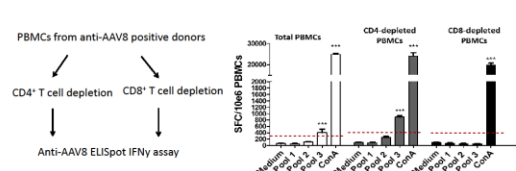


Figure 4: Representative example of anti-AAV8 IFN γ ELISpot responses on total PBMCs and on CD4⁺ or CD8⁺ depleted PBMCs. CD4⁺ or CD8⁺ T cells were depleted from PBMCs using magnetic sorting, prior to IFN γ ELISpot assays that were performed as indicated above.

→ Anti-AAV8 responses are mediated by CD8⁺ T cells in all positive donors tested (n=20).

→ CD4⁺ depletion increases ELISpot sensitivity.

Conclusions

We evidenced in this study that circulating AAV-specific CD8⁺ T cells are detected in all healthy donors using tetramer-associated magnetic enrichment. However, frequency of AAV-specific CD8⁺ T cells alone don't appear to be predictive of their functionality, at least in terms of IFN γ secretion using the ELISpot assay. Phenotypic markers show a rather naive profile but complementary markers such as CCR7 should be tested. The primary T cell lines generated are functional and specific as shown by the cytotoxicity tests. It is likely that studying multiple T cell parameters (multifunctional characterization) is needed to determine the outcome of anti-AAV immune responses. Providing better immunomonitoring for patients in AAV-based gene therapy trials should provide a better understanding of anti-AAV viral immunity and its impact.

Titre : Etude de la réponse immunitaire virale préexistante anti-AAV chez l'homme

Mots clés : AAV, thérapie génique, réponse immune, LT CD8⁺, T_{EMRA}

Résumé : L'immunité préexistante dirigée contre la capsid des virus associés aux adénovirus (AAV) chez l'Homme constitue une limitation majeure à l'efficacité du transfert de gène à l'aide de vecteurs AAVr. En particulier, les réponses cellulaires cytotoxiques dirigées contre l'AAV se sont trouvées être un défi à caractériser en raison de la faible fréquence des LT CD8⁺ circulants spécifiques de la capsid. L'ELISpot IFN-γ anti-AAV nous a permis de mettre en évidence une prévalence importante des cellules immunitaires spécifiques de la capsid des différents sérotypes dans une cohorte de 90 donneurs sains. Des techniques dérivées de l'ELISpot (Fluorospot et Cytokine Capture Assay) nous ont permis de montrer que cette immunité est majoritairement médiée par les LT CD8⁺ et que ceux-ci pouvaient présenter des profils cytokiniques différents et dépendant du sérotype. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence la présence de lymphocytes T (LT) CD8⁺ spécifiques de la capsid

dans les PBMC de donneurs sains grâce à un enrichissement magnétique à l'aide des tétramères de CMH classe I. Nous avons pu identifier une sous-population de lymphocytes effecteurs mémoire (T_{EMRA}) parmi les LT CD8⁺ spécifiques de la capsid. De plus, nous avons observé une corrélation positive entre les réponses ELISpot IFN-γ et le pourcentage des T_{EMRA} parmi les LT CD8⁺ spécifiques de la capsid. Ainsi, les cellules T_{EMRA} pourraient jouer un rôle dans la réactivation des réponses cellulaires mémoire préexistantes contre la capsid des AAV recombinants chez les patients traités par thérapie génique. Les résultats de nos travaux encouragent le développement de nouvelles technologies associant haute sensibilité de détection et évaluation polyfonctionnelle des lymphocytes T spécifiques de manière à mieux prédire l'impact des réponses immunitaires cellulaires préexistantes spécifiques après transfert de gène à l'aide d'AAV chez l'Homme

Titre : Study of the pre-existing anti-AAV viral immune response in humans

Keywords : AAV, gene therapy, immune responses, CD8⁺ T lymphocytes, T_{EMRA}

Abstract: Pre-existing immunity against Adeno-Associated Virus (AAV) capsid in humans is a major limitation to successful clinical translation of AAV-based gene transfer products. In particular, detection and characterization of cytotoxic cellular responses to AAV has been found to be a challenge due to the low frequency of circulating capsid-specific CD8⁺ T cells. IFN-γ anti-AAV ELISpot allowed us to highlight a significant prevalence of capsid-specific immune against different serotypes in a cohort of 90 healthy donors. Additional assays derived from the ELISpot technology (Fluorospot and Cytokine Capture Assay) have allowed us to show that this immunity is mainly mediated by CD8⁺ T cells and that cytokinetic profiles could be dependent on the serotype. On another hand, we have been able to detect capsid-specific CD8⁺ LTs

in healthy human PBMCs using a MHC class I tetramer-based magnetic enrichment method. We have identified a subpopulation of memory effector lymphocytes (T_{EMRA}) among capsid-specific CD8⁺ T and have observed a positive correlation between positive IFN-γ ELISpot responses and the percentage of T_{EMRA}s among those specific T cells. Thus, T_{EMRA} cells could play a role in triggering cellular responses against recombinant AAVs in gene therapy-treated patients. Altogether, our data highlight the need of new technologies combining high sensitivity detection and polyfunctional evaluation of AAV specific T cell responses to better predict the impact of preexisting anti-AAV cellular immunity on gene transfer in AAV-based clinical trials.