

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE
INSERM U649

**ETUDES PRELIMINAIRES POUR L'INDUCTION D'UNE
TOLERANCE CENTRALE ET PERIPHERIQUE DANS UN MODELE
DE TRANSFERT DE GENES CHEZ LE PRIMATE NON HUMAIN**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : CHIMIE BIOLOGIE
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Immunologie - Virologie

*Présentée
Et soutenue publiquement par*

Aurélie MOREAU

Le 07 juillet 2008, devant le jury ci-dessous

Président	Mr Ignacio ANEGON, Directeur de Recherche, Nantes
Rapporteurs	Mr Olivier BOYER, Professeur/ Praticien Hospitalier, Rouen Mr José COHEN, Directeur de Recherche, Paris
Examineurs	Mr Abdelhadi SAOUDI, Directeur de Recherche, Toulouse
Directeurs de thèse	Mme Maria-Cristina CUTURI, Directeur de Recherche, Nantes Mr Philippe MOULLIER, Directeur de Recherche, Nantes

Table des matières

AVANT PROPOS.....	10
INTRODUCTION GENERALE	13
I. TRANSFERT DE GENES A L'AIDE DE VECTEURS AAV RECOMBINANTS.....	14
I.A- La thérapie génique.....	14
I.B- Le virus AAV.....	16
I.B.1. Génome de l'AAV	16
I.B.2. Cycle viral de l'AAV	16
I.B.3. Différents sérotypes d'AAV	18
I.C- Les vecteurs AAV recombinants	19
I.C.1. Production des vecteurs AAVr	19
I.C.2. Amélioration des vecteurs AAVr.....	19
II. LE DEVELOPPEMENT DE REPONSES IMMUNITAIRES DANS LES MODELES DE TRANSFERT DE GENES A L'AIDE D'AAVR.....	24
II.A- La réponse immunitaire suite à une infection virale (généralités).....	24
II.A.1. Immunité innée suite à une infection virale	24
II.A.2. Composants de la réponse adaptative	25
II.A.3. Initiation de la réponse adaptative suite à une infection virale	27
II.A.4. La réponse humorale suite à une infection virale	28
II.A.5. La réponse cytotoxique suite à une infection virale (Larosa and Orange, 2008).....	29
II.A.6. Spécificité des AAVr à transduire les cellules dendritiques	30
II.B- Exemples de réponses immunitaires développées suite à l'injection d'un AAVr	31
II.B.1. La réponse immunitaire innée en présence de vecteurs AAVr	31
II.B.2. La réponse immunitaire adaptative contre la capside d'AAVr	32
II.B.3. La réponse immunitaire adaptative contre le produit du transgène	35
II.C- Comment réguler ces réponses immunes contre le transgène ?	38
III. LA TOLERANCE CENTRALE	42

III.A- Définition de la tolérance centrale naturelle.....	42
III.B- Composition du thymus	42
III.C- Différents stades de développement des LT	44
III.D- Sélection positive des thymocytes.....	45
III.E- Sélection négative des thymocytes.....	46
III.F- Génération des Treg.....	48
IV. LA TOLERANCE PERIPHERIQUE.....	51
IV.A- Définition de la tolérance périphérique.....	51
IV.B- Mécanismes impliqués dans la tolérance périphérique	51
IV.B.1. La délétion clonale	51
IV.B.2. L'anergie.....	51
IV.B.3. L'ignorance	52
IV.B.4. La suppression.....	53
IV.C- Les cellules T régulatrices	53
IV.C.1. Différentes populations de T régulatrices (Shevach, 2006).....	53
IV.C.2. Mode d'action des Treg naturels.....	54
IV.C.3. Exemples d'action des Treg.....	55
IV.D- Les CD tolérogènes	57
IV.D.1. Différence entre les CD immunogènes et tolérogènes	57
IV.D.2. Mode d'action des CD.....	59
IV.D.3. Exemples d'action des DC tolérogènes.....	60
CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE	62
I. ETUDES PRELIMINAIRES.....	63
I.A- Intérêt du muscle comme organe cible	63
I.B- Intérêt des gènes rapporteurs, l'exemple de l'EPO	63
I.C- Utilisation d'un système de régulation	64
I.D- Utilisation de vecteurs AAVr contenant le système Tet-ON.....	65
II. MODELE DE TRANSFERT DE GENES DEVELOPPE AU LABORATOIRE.....	66

II.A- Utilisation du système Tet-ON chez le macaque.....	66
II.B- Développement d'une réponse immune chez le primate.....	67
II.C- Amélioration du système.....	69
III. OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	71
 <i>PARTIE 1 : ETUDE DE L'INDUCTION DE LA TOLERANCE CENTRALE .72</i>	
I. INTRODUCTION	73
I.A- Induction de la tolérance centrale à la suite d'injection de peptides ou de cellules dans le thymus.....	73
I.A.1. Injection de peptides ou de protéines	73
I.A.2. Injection de cellules	74
I.B- Induction de tolérance centrale à l'aide de vecteurs viraux	75
II. OBJECTIFS	79
III. RESULTATS	80
III.A- Etude de l'efficacité de vecteurs lentiviraux pour transduire le thymus chez le singe.....	80
III.B- Etude de l'efficacité des vecteurs AAVr pour transduire le thymus chez la souris et le singe (Article I).....	81
III.C- Développement d'une réponse immunitaire chez le primate (résultats supplémentaires).....	105
IV. DISCUSSION.....	107
IV.A- Efficacité de transduction du thymus à l'aide de vecteurs AAVr	107
IV.A.1. Efficacité des AAVr par rapport aux vecteurs lentiviraux dans la transduction du thymus	107
IV.A.2. Efficacité de l'AAV8r	107
IV.A.3. Efficacité des injections IT et IV	108
IV.A.4. Efficacité des vecteurs sc et ss	108
IV.A.5. Observation des cellules transduites	109
IV.A.6. Diffusion du vecteur dans le thymus et la fuite en périphérie	111

IV.B- Intérêt et difficultés d'utiliser un modèle de primate.....	112
IV.B.1. Obtention de résultats divergents chez la souris et le primate	112
IV.B.2. Mise au point d'une technique d'injection intra-thymique chez le primate	112
IV.B.3. Limites de l'expérimentation chez le primate.....	113
IV.C- Induction d'une réponse immunitaire	113
IV.C.1. Action tolérogène des AAVr dans certaines études	113
IV.C.2. Obtention d'une réponse immune dans notre modèle	115
IV.C.3. Observation de la transduction des cellules du foie à l'aide d'un vecteur scAAV8	116
 PARTIE 2 : ETUDE DE L'INDUCTION D'UNE TOLERANCE PERIPHERIQUE	118
 I. INTRODUCTION	119
I.A- Propriétés des CD tolérogènes	119
I.A.1. Caractéristiques générales des CD tolérogènes	119
I.A.2. Rôle de l'IL-10 dans la réponse tolérogène.....	120
I.A.3. Rôle d'HO-1 dans la réponse tolérogène	121
I.B- Génération de CD tolérogènes ex vivo	124
I.B.1. Origine des CD de singe	124
I.B.2. Modifications des conditions de culture	126
I.B.3. Modifications des CD avec des agents pharmacologiques.....	126
I.C- Propriétés des Treg naturels	127
I.C.1. Caractéristiques générales des Treg (Sakaguchi, 2005).....	127
I.C.2. Différence entre les Treg murins et humains.....	128
I.C.3. Caractérisation des Treg chez le singe	129
I.D- Expansion et génération de Treg spécifiques d'antigène.....	129
I.D.1. Expansion à l'aide de billes anti-CD3/anti-CD28 ou d'antigènes libres	130
I.D.2. Expansion à l'aide de CD et spécificité d'antigène	130
I.D.3. Nécessité de l'utilisation d'IL-2	132
 II. OBJECTIFS	133
 III. RESULTATS	134

III.A- Génération de CD tolérogènes simiennes et rôle d'HO-1 dans ces cellules (Article II).....	134
III.B- Expansion de Treg chez le primate (Article III)	149
III.C- Injection des iBMDC10 dans notre modèle de transfert de gènes chez le primate (résultats supplémentaires).....	157
III.C.1. Génération et caractérisation de CD en présence d' IL-10 (iBMDC10)	157
III.C.2. Présentation de l'antigène rtTA à la surface des iBMDC10	159
III.C.3. Injection des CD chez le macaque.....	161
III.C.4. Test d'induction de tolérance périphérique par les iBMDC10 chez le macaque	163
IV. DISCUSSION.....	165
IV.A- Génération de CD simiennes ex vivo	165
IV.A.1. 1. A la recherche de CD tolérogènes chez le singe	165
IV.A.2. Rôle d'HO-1	167
IV.A.3. Difficultés rencontrées lors de la génération des CD simiennes	169
IV.B- Amplification de Treg à l'aide de CD	169
IV.B.1. Isolement des Treg	169
IV.B.2. Expansion de Treg à l'aide de CD et d'IL-2.....	170
IV.B.3. Efficacité de l'expansion des Treg selon l'origine des CD	171
IV.B.4. Génération de Treg <i>de novo</i>	172
IV.B.5. Spécificité de l'antigène	172
IV.C- Application des CD dans notre modèle de transfert de gènes	173
IV.C.1. Choix des iBMDC10	173
IV.C.2. Présentation de l'antigène.....	174
IV.C.3. Mode d'injection des CD.....	176
IV.C.4. Suivi des animaux	178
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	180
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	184

Table des illustrations

Tableau 1: Résumé des essais cliniques de thérapie génique	14
Tableau 2: AAVr optimaux pour la transduction des différents tissus.....	20
Tableau 3 : Les différentes populations de LT.	26
Figure 1 : Génome et cycle viral de l'AAV	16
Figure 2 : Les vecteurs ssAAV et scAAV.....	21
Figure 3: Interactions nécessaires à l'activation d'un LT CD4+.....	27
Figure 4 : Production d'anticorps neutralisants à la suite d'une injection de vecteurs AAVr	32
Figure 5: Infiltrats cellulaires suite à l'injection d'AAV2r	35
Figure 6 : L'administration d'AAV2r FIX à forte dose entraîne le développement d'une réponse humorale suivie d'une réponse cellulaire chez la souris.....	37
Figure 7 : La composition du thymus et la différenciation des LT.....	42
Figure 8 : La sélection des LT.....	47
Figure 9 : Modèle de transfert de gènes développé au laboratoire.....	65
Figure 10 : Développement d'une réponse cytotoxique contre le rtTA chez les macaques injectés	68
Figure 11: Induction d'une tolérance centrale après transduction du thymus à l'aide de vecteurs viraux.....	77
Figure 12 : Représentation schématique de la cassette d'expression du vecteur lentiviral	79
Figure 13 : Observation de la présence d'anticorps anti-GFP dans le sérum des animaux à différents temps post-injection de l'AAVr.....	104
Figure 14 : Immunohistologie réalisée sur les foies de macaque	105

Figure 15 : Recherche des cellules du foie transduites par les vecteurs scAAV8r-GFP chez la souris et le singe.....	116
Figure 16 : Rôle centrale d'HO-1 dans l'activité de certaines molécules.....	121
Figure 17 : Implication d'HO-1 dans l'activité tolérogène des CD.....	122
Figure 18 : Schéma représentant les différentes possibilités de générer des CD tolérogènes ex vivo.....	123
Figure 19 : Intérêt du marqueur CD127 pour isoler les Treg humaines.....	128
Figure 20 : Action suppressive antigène spécifiques des Treg in vivo	130
Figure 21 : Comparaison du phénotype et de la fonction des iBMDC cultivés avec ou sans IL-10.....	156
Figure 22 : Résistance des iBMDC à la maturation.....	157
Figure 23 : Capacité des iBMDC à présenter le rtTA à leur surface.....	159
Figure 24 : Caractérisation des iBMDC et iBMDC10 stimulées avec le rtTA.....	160
Figure 25 : Suivi des iBMDC injectées en sous-cutanée ou intra-dermique dans la région du ganglion.....	161
Figure 26 : Observation de la réponse immunitaire chez les animaux injectés avec les iBMDC10-rtTA.....	163

Abréviations utilisées

AAV(r): Adeno-associated virus (recombinants)
ADN(c): Acide désoxyribonucléique (complémentaire)
AIRE : Autoimmune regulator
ALS : Sérum anti-lymphocytaire
ARN (m): Acide ribonucléique (messenger)
CD : Cellule dendritique
CD (+ chiffres) : Cluster de différenciation
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : Cytomégalovirus
CoPP : Protoporphyrine issue du cobalt
CPA : Cellule présentatrice d'antigènes
cTEC : Cellule épithéliale thymique corticale
CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
DMD : Dystrophie musculaire de Duchenne
DN : Double négatif (thymocyte)
DP : Double positif (thymocyte)
EAE: Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EPO: Erythropoïétine
Foxp3: Forkhead box P3
FLT3l: FMS like tyrosine kinase 3 ligand
GITR: Glucocorticoid-induced TNF-related receptor
GM-CSF: Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GFP: Green fluorescent protein
GVHD: Graft versus host disease
i (BMDC): (immature) Bone marrow-derived dendritic cells
ID: Intradermique
IFN: Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL: Interleukine
IT: Intra-thymique

ITR: Inverted terminal repeat
 IV: Intraveineux
 HA: Hémagglutinine
 HO-1: Heme-Oxygénase-1
 KO: Knock-out
 LB: Lymphocyte B
 LPS: Lipopolysaccharide
 LV: Lentivirus
 LT, LT_H, LT_C : Lymphocyte T, LT helper, LT cytotoxique
 MMF: Mycophénolate mofetil
 mTEC: Cellule épithéliale thymique médullaire
 NOD: Non-obese diabete
 OVA: Ovalbumine
 PBMC: Peripheral blood mononuclear cells
 PCR, RT-PCR: Polymerase chain reaction, reverse transcriptase PCR
 pi: Particules infectieuses
 (r) tTA: (reverse) Tetracycline controlled transactivator
 scAAVr : Single stranded AAVr
 SnPP : Protoporphyrine issue de l'étain
 ssAAVr : Self complementary AAVr
 SP : Simple positif (thymocyte)
 SC : Sous-cutanée
 TCR : T-cell receptor
 TGF : Transforming growth factor
 Tet : Tétracycline
 Tet-On: Système d'activation contrôlé par la tétracycline
 TNF : Tumor necrosis factor
 Treg : LT régulateur
 TSA : Tissue specific antigen
 WPRE : Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional element

Avant propos

Les vecteurs viraux et notamment les vecteurs AAVr (Adéno-Associated Virus recombinants) apparaissent aujourd'hui comme des outils pertinents pour le transfert de gènes. En effet, les vecteurs AAVr permettent de transduire efficacement différents tissus selon les sérotypes d'AAVr utilisés et le transgène s'exprime à long terme à la suite d'une seule injection de vecteurs (Rivera et al., 2005). Cependant, contrairement à une idée initialement répandue, les vecteurs AAVr s'avèrent en pratique des vecteurs immunogènes.

L'immunogénicité est une propriété des antigènes de déclencher une réponse immune spécifique. L'immunogénicité d'un vecteur se définit par la capacité des antigènes de celui-ci à induire une réponse immune spécifique anti-vecteur. Ainsi, l'injection d'AAVr s'accompagne souvent du développement d'anticorps neutralisants qui empêche l'efficacité d'une réadministration d'un AAVr du même sérotype (Chirmule et al., 2000). L'immunogénicité du produit du transgène est différente de l'immunogénicité du vecteur mais doit également être prise en compte. En effet, en fonction de sa nature, le produit du transgène est lui-même plus ou moins immunogène.

Ces observations indiquent que dans un modèle de transfert de gènes donné, l'immunogénicité du produit du transgène dépend à la fois du transgène et du vecteur qui le véhicule. Par exemple, le produit d'un transgène peut ne pas être immunogène et si le vecteur est immunogène, les protéines de capsid du vecteur persistantes dans les cellules transduites peuvent faire l'objet d'une réponse cytotoxique anti-vecteur qui aboutit *in fine* à la perte d'expression du transgène.

Par conséquent, l'application du transfert de gènes pour le traitement de pathologies monogéniques rencontre aujourd'hui des problèmes similaires à ceux observés en transplantation.

Le développement de la science et de la médecine a permis des progrès importants aussi bien dans la mise au point des vecteurs viraux pour la thérapie génique que dans les techniques de chirurgie pour la transplantation d'organes, cependant, les individus traités réagissent contre le produit du transgène ou contre le greffon (considérés par l'organisme comme du non-soi) et développent une réponse immune qui entraîne soit la destruction des cellules transduites, soit le rejet du greffon.

La modulation du système immunitaire de l'hôte à l'aide d'immunosuppresseurs est une alternative possible au développement de la réponse immunitaire. L'efficacité de ce traitement médicamenteux a été montrée depuis très longtemps en transplantation et a été mise en évidence récemment en transfert de gènes (Jiang et al., 2006a).

Cependant, l'immunosuppression est un traitement à vie qui présente de nombreux effets secondaires. Une alternative plus récente pour éviter le développement d'une réponse immunitaire est d'induire une tolérance vis-à-vis du produit du transgène ou du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) du donneur de la greffe.

L'objectif de ce travail a été de tester la possibilité d'induire une tolérance spécifique au produit du transgène. Deux protocoles ont été étudiés chez le macaque, l'induction d'une tolérance centrale et l'induction d'une tolérance périphérique.

Introduction

générale

I. Transfert de gènes à l'aide de vecteurs AAV recombinants.

I.A- La thérapie génique

L'objectif de la thérapie génique est de traiter des maladies qu'elles soient héréditaires ou acquises ou de ralentir leur progression. Le principe de cette technique est de transférer un gène codant pour une protéine thérapeutique (ou un ARN) soit *in vivo* dans le tissu adéquat, soit *ex vivo* dans des cellules qui seront par la suite réinjecter dans l'organisme.

Le transfert de gènes « idéal » doit être à la fois i) efficace, c'est-à-dire apporter le matériel génétique dans la cellule, ii) spécifique, c'est-à-dire qu'il doit cibler les cellules d'intérêt, iii) non immunogène et iv) persistant dans le temps. Les résultats de transfert de gènes les plus prometteurs sont réalisés à l'aide de virus recombinants génétiquement modifiés, appelés vecteurs viraux recombinants. L'utilisation de vecteurs non viraux est également possible (pour revue, (Jackson et al., 2006)). Les vecteurs viraux sont dérivés de divers virus tels que les adénovirus, les herpèsvirus, les rétrovirus et les AAVr.

L'utilisation de vecteurs viraux repose sur la capacité naturelle des virus sauvages à apporter leur matériel génétique dans les cellules infectées. En fonction du tropisme propre au virus parent, le vecteur viral dérivé de ce virus permettra de transduire préférentiellement certains organes cibles. Afin que l'infection virale ne conduise pas à la destruction de la cellule infectée, le génome viral des vecteurs est délété des composants viraux souvent pathogènes (et immunogènes). Pour plus de sécurité, les vecteurs sont déficients pour la réplication. Pour cela, les gènes responsables de la réplication et de la structure du virus (capside et enveloppe pour les virus enveloppés) sont supprimés. La persistance des vecteurs viraux à long terme (indispensable pour le traitement des maladies génétiques) est possible notamment en utilisant des vecteurs rétroviraux qui ont la capacité d'intégrer leur génome viral dans le génome cellulaire. Les vecteurs considérés comme non intégratifs, tels que les AAVr, sont également capables de persister dans les cellules transduites sous forme d'épisomes, dans les tissus quiescents.

Les essais cliniques de thérapie génique visant à traiter des maladies héréditaires monogéniques ont principalement été réalisés à l'aide de vecteurs dérivés des adénovirus, des rétrovirus ou des AAVr (Porteus et al., 2006) (tableau 1). Les vecteurs adénoviraux permettent de transduire efficacement des cellules et d'apporter un matériel génétique de

grand taille (supérieure à 30 kpb). Cependant, ils sont fortement immunogènes (de par leur forte transduction des cellules dendritiques, phénomène expliqué dans la partie II.B de l'introduction générale). Ainsi, un essai clinique réalisé avec des vecteurs adénoviraux codant pour l'ornithine transcarbamylase (OTC) sur des patients déficients pour cette protéine a entraîné une forte réponse immune chez les patients traités et la mort d'un des patients (tableau 1) (Raper et al., 2003; Raper et al., 2002). Les vecteurs rétroviraux sont des vecteurs dérivés de virus à ARN et comportant notamment les lentivirus (vecteurs dérivés du HIV-1). Suite à la transduction de la cellule, l'ARN est libéré et subit une étape de rétrotranscription, l'ADN rétrotranscrit est alors capable de s'intégrer dans le génome cellulaire permettant une expression à long terme du transgène. Cette intégration peut malheureusement activer également des proto-oncogènes. Ce fut notamment le cas dans l'essai clinique réalisé sur des enfants atteints d'une immunodéficience SCID-XI (tableau 1) (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Cavazzana-Calvo et al., 2005; Hacein-Bey-Abina et al., 2003).

Maladie	Gène thérapeutique	Nombre de patients	Vecteur	Promoteur	Methode	Pré-traitement	Dose	virus totaux insérés	Suivi des patients
Déficience en ornithine transcarbamylase (OTC) <i>Raper et al. 2002,2003</i>	ADNc OTC	18	Adénovirus déplété pour E1 et E4	CMV-CBA	injection dans l'artère hépatique	Aucun	2x10 ⁹ à 6x10 ¹¹ vg/kg		Aucun bénéfice clinique Décès d'un patient
Hémophilie de type B <i>Manno et al. 2003</i>	Gene du facteur IX modifié	8	AAV2r	CMV	injection intra-musculaire	Aucun	2x10 ¹¹ à 1,8x10 ¹² vg/kg		Aucun bénéfice clinique
Hémophilie de type B <i>Manno et al. 2006</i>	Gene du facteur IX modifié	7	AAV2r	APOE-SERPINA1	injection dans l'artère hépatique	Aucun	8x10 ¹⁰ à 2x10 ¹² vg/kg		Expression transitoire du facteur IX Aucun bénéfice clinique
SCID-X1 (SCID= Severe Combined ImmunoDeficiency) <i>Cavazzana-calvo et al. 2005</i>	ADNc IL2RG	10	Rétrovirus	MLV-LTR	transduction ex vivo de cellules CD34+ puis réinjection de ces cellules en intra-veineux	Aucun	1-6 x10 ⁶ cellules transduites/kg	> 5-30x10 ⁶	9 patients ont développé un système immunitaire fonctionnel; 3 enfants ont développé une leucémie, 1 est décédé
SCID ADA <i>Aiuti et al. 2002</i>	ADNc ADA	2	Rétrovirus	MLV-LTR		Busulfan 4 mg/kg	0,2 à 2 x10 ⁶ cellules transduites/kg	> 2x10 ⁶	Les 2 patients ont développé un système immunitaire fonctionnel sans effets secondaires connus
SCID-X1 <i>Gaspar et al. 2004</i>	ADNc IL2RG	4	Rétrovirus de type GALV	MFG-LTR		Aucun	6 x10 ⁷ à 1,4x10 ⁸ cellules transduites/kg	7 à 20 x10 ⁷	Les 4 patients ont développé un système immunitaire fonctionnel sans effets secondaires connus
CGD (Chronic Granulomatous Disease) <i>Ott et al. 2006</i>	gène GPg ^{PHOX}	2	Rétrovirus	SFFV-LTR		Busulfan 8 mg/kg	3,6 à 5,1 x10 ⁶ cellules transduites/kg	3,6 à 5,1 x10 ⁸	Les 2 patients ont développé des neutrophiles fonctionnels et une myéloprolifération clonale de l'activation insertionnelle de MDS-EVI1

Tableau 1 : Exemples d'essais cliniques de thérapie génique dans le cadre de maladies génétiques

CMV: cytomégalo virus. CMV-CBA: Cytomégalo virus enhancer, chicken β -actin promoter. GALV: Gibbon ape leukemia virus. MFG: dérivé du MLV. MLV: moloney murine leukemia virus. MSC: moloney murine sarcoma virus. SCID ADA: SCID secondaire à une déficience en adenosine deaminase. SCID-X1: SCID secondaire aux mutations du gène IL2RG. SFFV: Friend mink cell spleen focus forming virus. vg: vector genome. **D'après Porteus et al., 2006.**

Les vecteurs dérivés des AAV sont capables de persister à long terme sous forme épisomique. Les AAV recombinants sont moins immunogènes que les vecteurs adénoviraux, (même s'ils sont tout de même immunogènes, comme décrit dans la partie II de l'introduction générale) mais leur principale limite est leur faible capacité d'encapsidation (4,7 kpb). Le fait qu'il existe plusieurs sérotypes d'AAVr leur confère cependant l'avantage de pouvoir cibler différents organes selon leurs tropismes naturels. **Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés au transfert de gènes à l'aide d'AAVr.**

Comme pour l'ensemble des vecteurs viraux, leur application thérapeutique nécessite une connaissance approfondie du virus sauvage dont ils sont issus.

I.B- Le virus AAV

I.B.1. Génome de l'AAV

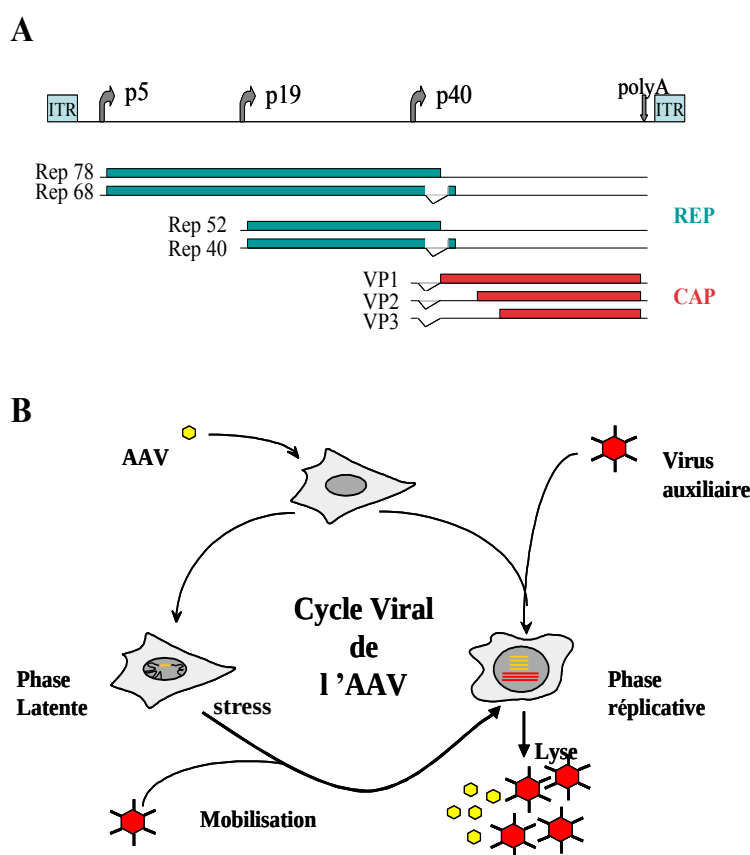
L'AAV est un parvovirus humain non pathogène découvert en 1965 comme contaminant de productions d'adénovirus (Atchison et al., 1965). Le génome de l'AAV encapsidé est un ADN simple brin linéaire de 4,7 kb. Comme le montre la figure 1A, il comprend deux cadres de lecture *rep* et *cap* qui codent respectivement pour des protéines permettant la réplication et l'encapsidation du virus (Srivastava et al., 1983). L'ADN viral est flanqué de deux séquences palindromiques de 145 nucléotides appelées ITR (Inverted Terminal Repeat) (Koczot et al., 1973). Ces séquences répétées participent en *cis* à la réplication et l'encapsidation de l'ADN viral ainsi qu'à son intégration dans le génome cellulaire. L'expression des gènes viraux est régulée par les trois promoteurs p5, p19 et p40 présents sur le génome. Les transcrits issus du promoteur p5 permettent la synthèse des protéines Rep dites majeures : Rep78 et Rep68 alors que le second promoteur, p19, permet la synthèse de protéines Rep dites mineures : Rep52 et Rep40. Les protéines Rep majeures sont impliquées dans l'excision et la réplication du génome viral (par leurs activités hélicase, ATPase et endonucléase) et dans l'intégration et la régulation de l'expression des gènes viraux (Pereira et al., 1997). Les protéines Rep mineures interviennent dans l'accumulation des ADN répliqués simple brin (King et al., 2001) et dans leur encapsidation. Enfin, le promoteur p40 est responsable de la synthèse des protéines de structure (VP1, VP2 et VP3) qui forment la capside virale.

I.B.2. Cycle viral de l'AAV

Les virus AAV sont des virus déficients pour la réplication, d'où leur classification dans le genre Dépendovirus. En effet, pour réaliser leur cycle lytique, ces virus nécessitent la

présence d'un virus auxiliaire qui peut être l'adénovirus, l'herpèsvirus, le virus de la vaccine ou encore le cytomégalovirus (Atchison et al., 1965; Hoggan et al., 1966 ; McPherson et al., 1985; Schlehofer et al., 1986; Weindler and Heilbronn, 1991). Les protéines des virus auxiliaires permettent l'initiation de la transcription, l'expression des gènes viraux et la réplication du génome viral. L'AAV peut également se répliquer dans des cellules soumises à un stress comme une irradiation ou un traitement à l'aide d'agents génotoxiques (Yalkinoglu et al., 1988).

Figure 1 : Génome et cycle viral de l'AAV



Le cycle viral de l'AAV est simple (figure 1B). Le virus entre dans la cellule puis migre jusqu'au noyau. En absence d'un environnement permissif à sa réplication, l'ADN viral peut alors s'intégrer dans le génome cellulaire et persister sous forme latente. Cet état de latence se caractérise par l'absence d'expression des gènes viraux (Berns et al., 1975). Des études menées *in vitro* (Kotin et al., 1992; Linden et al., 1996a; Linden et al., 1996b; Philpott et al., 2002) montrent que l'AAV peut s'intégrer notamment au niveau d'un site spécifique appelé AAVS1 (situé sur le chromosome 19). Toutefois, il apparaît que l'intégration site-spécifique ne soit pas la voie majoritaire de persistance du virus *in vivo* mais que cette intégration se

fasse de façon aléatoire. Le génome viral semble également persister sous forme d'épisomes *in vivo* (Chen et al., 2005; Schnepf et al., 2005).

Lors d'une infection (ou surinfection) par un virus auxiliaire ou lors d'un stress, le virus peut être mobilisé et répliqué à partir de sa forme latente. L'AAV entre alors dans une phase répllicative : le génome viral est excisé puis répliqué pour donner des brins d'ADN + et -. La synthèse des protéines Rep et Cap puis l'assemblage des virions ont ensuite lieu dans le noyau (Wistuba et al., 1997). Les ADN simple brin de polarité + ou - sont encapsidés à la même fréquence et les deux brins sont infectieux (Berns and Adler, 1972; Samulski et al., 1987). La libération des virions est possible en présence de virus auxiliaire qui provoque la lyse cellulaire.

I.B.3. Différents sérotypes d'AAV

Il existe plusieurs sérotypes d'AAV, qui utilisent des approches différentes pour entrer dans la cellule hôte. L'existence de divers sérotypes s'explique par la présence de différents gènes *cap* qui codent pour des protéines de structure formant ainsi différents types de capsides. Selon le sérotype, l'AAV est ainsi capable d'infecter différents types cellulaires. Le sérotype 2 de l'AAV sauvage a été le plus étudié. Des études épidémiologiques montrent qu'en fonction de l'âge et de la situation géographique, 35% à 80% des hommes possèdent des anticorps anti-AAV2 (Chirmule et al., 1999; Erles et al., 1999). C'est également ce sérotype qui a été utilisé lors des premiers essais cliniques à l'aide de vecteurs AAV recombinants.

Depuis la découverte de l'AAV2 en 1965, de nouveaux sérotypes ont été isolés. Par définition, un nouveau sérotype est un virus nouvellement isolé et qui ne réagit pas de façon croisée avec du sérum contenant des anticorps neutralisants spécifiques des sérotypes déjà isolés et caractérisés, mais en pratique, certains sérotypes réagissent les uns avec les autres comme le sérotype 1 et le sérotype 6 par exemple.

Les premiers sérotypes découverts (1 à 6) ont été isolés comme contaminants des productions adénovirales à l'exception de l'AAV5 (origine génitale). L'AAV2, 3 et 5 sont d'origine humaine (Georg-Fries et al., 1984; Parks et al., 1970) alors que l'AAV4 est d'origine simienne (Parks et al., 1970). En ce qui concerne l'AAV1, son origine (humaine ou simienne) est controversée, des anticorps anti-AAV1 ont été trouvés dans le sérum de singe (Parks et al., 1970) alors que le génome d'AAV1 a été isolé dans des tissus humains (Gao et al., 2004). L'AAV6 semble résulter d'une recombinaison entre l'AAV1 et l'AAV2, ce qui peut expliquer la présentation croisée de l'AAV1 et de l'AAV6 (Xiao et al., 1999). D'autres

sérotypes d'AAV (7 à 11) ont été isolés par PCR en utilisant des amorces capables de se fixer sur des régions très conservées de la séquence de la capsid flanquant des zones de divergence des AAV (Gao et al., 2004; Gao et al., 2002a; Mori et al., 2004). Ce criblage réalisé dans des tissus de primates (humains ou non) a permis de réaliser des arbres phylogénétiques des AAV (Gao et al., 2004). Les AAV isolés par PCR semblent particulièrement efficaces; l'efficacité de transduction des différents sérotypes de vecteurs dérivés des AAV sauvages sera discutée ultérieurement. Le dernier sérotype d'AAV découvert (AAV12) a été isolé comme contaminant de stocks d'adénovirus simien (Schmidt et al., 2006; Schmidt et al., 2008). Des AAV ont également été identifiés à partir d'animaux non primates (par exemple le cheval, la vache, le poulet) (Warrington and Herzog, 2006).

I.C- Les vecteurs AAV recombinants

Les vecteurs AAVr sont réalisés en remplaçant les gènes *rep* et *cap* du génome viral de l'AAV sauvage par une cassette d'expression. Cette cassette contient au minimum un promoteur, l'ADNc du gène thérapeutique également appelé transgène et un signal de polyadénylation. Par abus de langage, le transgène définit également la cassette d'expression entière. Les ITR sont les seules séquences du génome viral de l'AAV sauvage conservées dans les vecteurs AAVr.

I.C.1. Production des vecteurs AAVr

La production d'AAVr est réalisée le plus souvent par triple transfection de cellules HEK-293 avec: i) le plasmide vecteur contenant le transgène flanqué de deux ITR, ii) un plasmide codant pour les gènes *rep* et *cap* (les gènes *cap* varient selon le sérotype) et iii) un plasmide apportant les fonctions auxiliaires de l'adénovirus nécessaires à la production d'un AAVr (E4, VA et E2A ; E1 étant déjà exprimé par les cellules HEK-293) (Xiao et al., 1998). D'autres techniques de production existent et sont basées sur l'utilisation de cellules exprimant stablement Rep et Cap (Clark et al., 1995), des cellules d'insectes infectées avec un baculovirus recombinant (Urabe et al., 2002) ou encore l'utilisation du virus auxiliaire Herpes (Conway et al., 1999; Conway et al., 1997).

I.C.2. Amélioration des vecteurs AAVr

Il existe 4 principaux facteurs limitant l'efficacité des vecteurs AAVr : **i)** la faible capacité d'encapsidation du génome viral, **ii)** l'entrée du vecteur dans la cellule, **iii)** le trafic intra-

cytoplasmique et la décapsidation, et *iv*) la synthèse du brin d'ADN complémentaire, indispensable à l'expression des gènes. En ce qui concerne la faible capacité d'encapsidation du vecteur viral, le transgène ne doit pas dépasser la taille du génome viral qui est de 4,7 kb. Au delà de cette taille, il est possible que le transgène soit tronqué ou que le rendement de production soit faible (Dong et al., 1996). Différentes stratégies ont été mises en place pour surmonter ces problèmes.

Dans le cadre de cette thèse, l'entrée du virus et la synthèse du brin d'ADN complémentaire vont être détaillés car ces propriétés des AAVr ont été utilisées.

i) Entrée du virus dans la cellule et l'utilisation des différents sérotypes d'AAVr

L'utilisation des différents sérotypes est très utile pour favoriser l'entrée des vecteurs dans la cellule car ils comportent chacun un tropisme naturel pour un ou des tissus. Les différents sérotypes de l'AAV utilisent des récepteurs membranaires variés pour leur fixation puis leur internalisation dans la cellule hôte. Ainsi, nous savons que l'AAVr de sérotype 2 se fixe à la cellule à l'aide de protéoglycane héparan sulfate (Summerford and Samulski, 1998). Les AAV4 et AAV5 utilisent des acides sialiques pour se fixer sur leurs cellules cibles (Kaludov et al., 2001; Walters et al., 2001). A l'inverse, l'AAV12 ne semble utiliser ni le protéoglycane héparan sulfate, ni les acides sialiques pour son attachement cellulaire, indiquant un tropisme pour un type cellulaire différent des AAV précédemment cités (Schmidt et al., 2008).

Selon les sérotypes, les AAVr vont donc transduire préférentiellement mais plus ou moins efficacement différents tissus (tableau 2). Les vecteurs AAVr de sérotype 2 (le plus étudié) permettent de transduire divers organes, le foie, le muscle, le poumon et le système nerveux central (SNC) mais avec une efficacité faible. Les AAV9r ont un tropisme très similaire à celui de l'AAV2r mais associé à une transduction plus efficace (Gao et al., 2004). L'AAV8r permet également de transduire efficacement de nombreux organes, comme le foie, le cœur, le pancréas et le muscle (Nakai et al., 2005; Wang et al., 2005c) mais avec une efficacité supérieure aux autres sérotypes notamment pour le muscle (Cao et al., 2007b; Palomeque et al., 2007). Le tropisme cellulaire ainsi que l'efficacité de transduction des derniers sérotypes mis en évidence (AAV10r et AAV12r) sont en cours d'étude. Les AAV10r et 11 semblent transduire efficacement le cœur, le muscle, le poumon, la rate et le rein, ciblant également le foie et l'utérus pour l'AAV10r et l'estomac pour l'AAV11r (Mori et al., 2006; Mori et al., 2004). La transduction du muscle par l'AAV12r a été mise en évidence récemment (Schmidt et al., 2008).

Tissus	Sérotype(s) optimal(aux)
Foie	AAV8, AAV9, AAV10
Muscle squelettique	AAV1, AAV7, AAV6, AAV8, AAV9, AAV12
Système nerveux central	AAV5, AAV1, AAV4
Œil	AAV5, AAV4
Poumon	AAV9, AAV10, AAV11
Cœur	AAV8, AAV10, AAV11
Estomac	AAV11
Pancréas	AAV8
Rate	AAV10, AAV11
Rein	AAV2, AAV10, AAV11

Tableau 2: AAVr optimaux pour la transduction des différents tissus.

Les différents vecteurs AAVr décrits sont pour la plupart issus de transcapsidation. Cela signifie que le génome viral comportant les ITR d'un AAV est encapsidé dans une capsid issue d'un autre sérotype.

Comme l'AAV2r est le sérotype qui a été le plus étudié, les ITR proviennent souvent de l'AAV2 alors que la capsid provient d'un autre sérotype ; c'est alors le sérotype de la capsid qui nomme le vecteur. Ainsi, un AAV8r contient des ITR AAV2r et une capsid AAV8r, il peut également être appelé AAV2/8r.

ii) Synthèse du brin d'ADN complémentaire et l'utilisation des vecteurs scAAVr

Les vecteurs AAVr, comme le virus sauvage, contiennent un ADN simple brin (ssADN : single-stranded) flanqué à chaque extrémité par les ITR. Ces séquences servent d'amorces pour l'ADN polymérase cellulaire et permettent ainsi la synthèse du brin d'ADN viral complémentaire, indispensable à l'expression du transgène (ou des gènes viraux). Cependant, comme pour les AAV sauvages, la conversion simple brin/double brin du génome recombinant par les machineries cellulaires de réparation et de réplication de l'ADN ne se fait pas spontanément. La présence d'un virus auxiliaire ou d'un stress cellulaire permet d'augmenter de façon importante l'expression du transgène (Alexander et al., 1994; Alexander et al., 1996). Ce déblocage de la réplication est corrélé avec la formation de molécules d'ADN double brin à partir du génome simple brin (Ferrari et al., 1996; Fisher et al., 1996). Ainsi, la conversion du génome simple brin en ADN double brin transcriptionnellement actif apparaît comme une étape limitante dans l'efficacité des vecteurs AAVr. Pour contrer ce problème, plutôt que d'essayer de potentialiser la machinerie cellulaire pour favoriser la conversion simple brin/double brin de l'ADN viral, des vecteurs AAVr contenant des génomes double brin appelés scAAVr (self-complementary AAVr) ont été générés (Figure 2) (McCarty et al., 2001)

Les vecteurs scAAVr contiennent une mutation dans un site « trs » (terminal resolution site) de l'un des deux ITR, qui conduit à un défaut de clivage de l'ADN viral lors de sa réplication, formant ainsi un ADN double brin au lieu de synthétiser un ADN + et un ADN – (McCarty et

al., 2003; Wang et al., 2003). Les vecteurs scAAVr possèdent ainsi un ADN double brin au lieu d'un ADN simple brin.

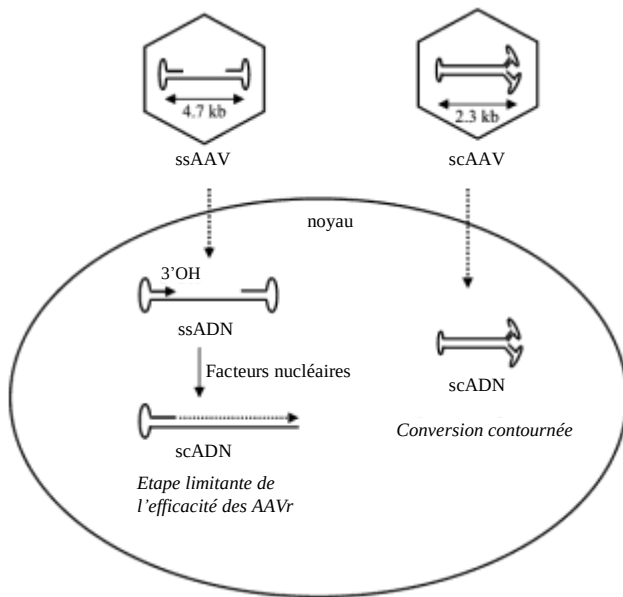


Figure 2 : Les vecteurs ssAAV et scAAV

Suite à son entrée dans le noyau cellulaire, le génome des AAVr conventionnels (ss) doit se convertir en ADN double brin avant de pouvoir s'exprimer. Cette étape de conversion simple brin/double brin, réalisée par des facteurs nucléaires de la cellule hôte, limite l'efficacité de transduction. A l'inverse, les AAVr de type sc (self-complementary) existent sous une forme double brin et ne nécessitent pas d'étape de conversion simple brin/double brin, ils sont donc plus efficaces.

D'après Le Bec et Douar, 2006.

Différentes études menées *in vivo* chez le rongeur montrent que la **transduction à l'aide de vecteurs scAAVr est plus efficace** avec une expression du transgène plus rapide que la transduction avec les ssAAVr « classiques », et cela dans différents organes comme le muscle squelettique ou cardiaque (Andino et al., 2007; McCarty et al., 2003 ; McCarty et al., 2001 ; Ren et al., 2005), le foie (McCarty et al., 2003; Wang et al., 2003; Wu et al., 2008), le cerveau (Fu et al., 2003 ; McCarty et al., 2003), la moelle épinière (Hollis et al., 2008), la rétine (Natkunarahaj et al., 2008; Yang et al., 2002; Yokoi et al., 2007) ou encore *ex vivo* dans les îlots pancréatiques murins et humains (Rehman et al., 2005 ; Zhang et al., 2005) ou les cellules souches hématopoïétiques (Han et al., 2008).

Ces études montrent que l'utilisation de scAAVr permet une transduction rapide et efficace de différents tissus car elle est indépendante du mécanisme de synthèse d'ADN de la cellule hôte. Par conséquent, l'utilisation de ces vecteurs semble intéressante pour la transduction d'organes tels que le cœur, le poumon ou le foie où le taux de prolifération cellulaire est faible. Une étude récente (Nathwani et al., 2006) réalisée avec un scAAV8r contenant un gène thérapeutique (le facteur IX) a montré l'efficacité de ce vecteur pour transduire le foie de primate non humain et permettre ainsi la synthèse du facteur IX en quantité importante. Le scAAVr étant plus efficace que le ssAAV, une quantité plus faible de scAAVr est injectée à l'animal pour obtenir un niveau de transduction similaire à celui obtenu avec les ssAAVr (Wu et al., 2008). L'administration d'un plus faible nombre de particules virales pourrait ainsi permettre de diminuer : i) les risques de toxicité, ii) la distribution des virions dans les

organes périphériques, iii) la production d'anticorps neutralisants contre la capside et iv) la quantité de vecteurs à produire.

Dans les vecteurs scAAVr, le génome viral comporte 2 brins d'ADN au lieu d'un seul, l'encapsidation du transgène est alors possible en théorie uniquement si l'ADN simple brin (c'est-à-dire le transgène) est inférieur à 2,3 kpb. Une étude récente (Wu et al., 2007) menée *in vitro* montre que les vecteurs scAAVr pourraient cependant encapsider jusqu'à 3.3kb d'ADN double brin. Les auteurs suggèrent que cette capacité d'encapsidation plus importante que les ssAAVr (équivalente à 6,6 kb d'ADN simple brin) pourrait s'expliquer en partie par la structure secondaire plus compacte des scAAVr, les 2 brins complémentaires d'hybridant parfaitement (Wu et al., 2007).

iii) Modulation de l'efficacité des AAVr selon la nature de la cassette d'expression

L'efficacité et la spécificité du transfert de gènes peuvent également varier selon la nature des éléments composant le génome recombinant. Il faut considérer tout d'abord, le promoteur qui est un élément important pour la détermination du niveau de transcription de l'ADNc et de son site d'expression. Les promoteurs CMV ou CAG (Cytomegalovirus early enhancer/chicken β -actin) sont des promoteurs dits « forts », ils permettent une forte expression de l'ADNc et de façon constitutive. D'autres promoteurs à l'inverse permettent de favoriser l'expression de la protéine thérapeutique dans certaines cellules, ainsi le promoteur desmine va limiter l'expression du transgène au muscle squelettique (Zhang et al., 2004a). Ces promoteurs appelés « tissu-spécifiques » entraînent généralement un niveau d'expression plus faible que les promoteurs constitutifs. Certains promoteurs, associés à un système de régulation, permettent de moduler l'expression du gène dans le temps. Un exemple de ce type de régulation a été utilisé dans cette thèse, il sera décrit dans la partie « Contexte de l'étude et objectifs ». L'ajout d'éléments régulateurs post-transcriptionnels comme par exemple la séquence WPRE (woodchuck hepatitis virus post transcriptional regulatory element) dans la région 3' non traduite du transgène favorise l'expression du transgène en stabilisant les ARNm et donc en augmentant son niveau d'expression (Lipshutz et al., 2003). L'addition d'introns dans la cassette d'expression est aussi un facteur permettant d'augmenter l'expression du gène thérapeutique. Cependant, l'utilisation d'éléments régulateurs post-transcriptionnels ou d'introns n'est possible que si les autres éléments de la cassette d'expression sont de petite taille (le total doit être inférieur à 4,7 kb).

Lors de cette thèse, les vecteurs AAVr de forme sc et ss et de sérotypes 1, 2,4 ,5 et 8 ont été utilisés.

II. Le développement de réponses immunitaires dans les modèles de transfert de gènes à l'aide d'AAVr

Les vecteurs AAVr sont connus pour permettre une expression du produit du transgène à long terme (jusqu'à 6 ans après une administration d'AAVr chez le singe, (Rivera et al., 2005)). Cependant, le développement d'une réponse immunitaire contre la capside de l'AAVr ou contre le produit du transgène a été décrit dans de nombreuses études. Ces observations ne semblent pas propres à certains organes. Ainsi, ces réponses immunitaires sont observées aussi bien à la suite de transfert de gènes à l'aide d'AAVr ciblant le muscle (injection intramusculaire), le foie (injection dans l'artère hépatique ou en intra-veineux) et même dans des organes considérés comme immunoprivilégiés, tels que le cerveau (injection dans le striatum) (pour revue, (Vandenberghe and Wilson, 2007)). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à ces réponses immunitaires et surtout aux moyens de les contrer.

II.A- La réponse immunitaire suite à une infection virale (généralités)

Le fait d'introduire un vecteur viral dans une cellule peut entraîner l'activation du système immunitaire aboutissant à une réponse innée et/ou adaptative. La réponse immunitaire innée (ou naturelle) est non-spécifique alors que la réponse adaptative (ou acquise) est spécifique. Etant donné que les réponses immunitaires acquises en primo-infection nécessitent un délai de 4-5 jours pour être efficaces, l'immunité innée apporte la première ligne de défense. Si cette immunité naturelle n'a pas neutralisé l'élément étranger, une réponse immunitaire spécifique d'antigène (acquise) est déclenchée. En réalité, l'immunité innée et adaptative sont liées.

II.A.1. Immunité innée suite à une infection virale

L'immunité innée est mise en place rapidement et efficacement suite à l'introduction d'un virus ou d'un vecteur viral dans une cellule. Cette réponse est initiée principalement par des récepteurs de l'immunité innée capables de reconnaître les virus, notamment les ARN viraux pour les TLR (Toll Like Receptors) de type 3, 7 et 8 (Meylan and Tschopp, 2006). L'immunité innée a lieu localement et se manifeste par une réponse inflammatoire associée à la production rapide de cytokines/chimiokines. Ces signaux vont permettre d'attirer les cellules immunitaires sur le site de l'infection pour contrer son expansion et éviter la dissémination des virus ou des vecteurs viraux dans le sang. Par exemple, les interférons α et

β permettent d'inhiber la réplication virale mais aussi dans certains cas, d'autres étapes du cycle viral. Ces interférons stimulent également la synthèse et l'expression des molécules du CMH de classe I, ce qui favorise la présentation des peptides viraux. De plus, les interférons, tout comme l'IL-12, stimulent l'activité de cellules inflammatoires non-spécifiques comme les cellules tueuses naturelles NK (Natural Killer). Ces cellules limitent l'infection virale et favorisent le développement de la réponse spécifique cytotoxique (lyse des cellules infectées et sécrétion d'IFN γ) (Biron et al., 1999). La quantité de cellules NK est donc régulée par les interférons mais également par l'IL-2 et l'IL-12. De plus, les macrophages présents sur le site de l'infection synthétisent également de l'IFN γ (Wyde et al., 1982) et des cytokines dont l'IL-12 qui permet l'activation des NK (Monteiro et al., 1998). Le système du complément, par une cascade de réactions enzymatiques intervient également dans l'immunité innée.

II.A.2. Composants de la réponse adaptative

La réponse immune adaptative fait intervenir deux principaux types cellulaires, i) les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et ii) les lymphocytes.

i) Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)

Il existe différents types de CPA: les LB, les macrophages et les cellules dendritiques (CD). Les CD sont les CPA les plus puissantes. **Les CD peuvent être impliquées aussi bien dans l'immunité (décrite ci-dessous) que dans la tolérance (décrite ultérieurement).**

Les différentes populations de CD (pour revue, (Shortman and Naik, 2007))

Toutes les CD sont issues d'un précurseur commun (Naik et al., 2007; Onai et al., 2007). Elles peuvent être classées selon leur origine (lymphoïde ou myéloïde), leur environnement (stimuli de maturation ou d'activation) ou leur capacité de migration.

Il existe deux principaux types de CD, les CD précurseurs appelées pré-CD et les CD conventionnelles.

Les pré-CD, comme par exemple les monocytes, sont capables de s'adapter rapidement à l'environnement pour répondre aux signaux de danger et ainsi induire une réponse immune alors que les CD conventionnelles sont dans un état de différenciation plus avancée avec une morphologie et une fonction définie. Il existe **deux types de cellules dendritiques conventionnelles**: **i)** les CD localisées dans les tissus pour capter les antigènes et qui migrent ensuite dans les organes lymphoïdes et **ii)** les CD résidentes dans les organes lymphoïdes qui

ne sortent pas de ces organes. Les cellules capables de migrer dans les organes lymphoïdes comportent entre autres, les cellules de Langerhans présentes dans l'épiderme de la peau et les cellules interstitielles localisées dans le derme et dans les espaces interstitiels de divers organes. Les cellules résidentes sont principalement composées des CD thymiques et de CD spléniques.

ii) Les lymphocytes

Les lymphocytes B (LB)

Les LB se développent dans la moelle osseuse (LB pour Bone marrow Lymphocyte) et mûrissent dans les organes lymphoïdes secondaires. Les LB présentent à leur surface le récepteur BCR (pour B-cell Receptor) capable de fixer directement un antigène étranger isolé (Blom and Spits, 2006).

Les lymphocytes T (LT)

Les LT sont générés dans le thymus comme décrit dans la partie III de cette introduction. À la sortie du thymus, les LT qui n'ont pas encore rencontré d'antigène sont appelés LT naïfs. Suite à leur rencontre avec l'antigène et à leur activation, les LT sont dissociés en LT auxiliaires (appelés LT_H pour LT helper) et en LT cytotoxiques selon leur différenciation dans le lignage CD4 ou CD8 dans le thymus. Les LT se différencient également par les cytokines qu'ils sécrètent, leur conférant alors des fonctions différentes, comme décrit dans le tableau 3 (Larosa and Orange, 2008).

Les LT comportent à leur surface le récepteur TCR (T Cell Receptor). Contrairement au récepteur BCR des LB, le récepteur TCR du LT ne peut pas reconnaître un antigène seul. Cet antigène doit être associé aux molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Le TCR reconnaît alors le complexe CMH/peptide. Il existe 2 principaux types de CMH, le CMH de classe I, exprimé par la quasi-totalité des cellules nucléées et le CMH de classe II, présent à la surface des CPA. Les CPA possèdent donc à leur surface les molécules du CMH de classe I et de classe II.

Les LT_H expriment à leur surface le marqueur CD4 et se lient au CMH de classe II. À l'inverse, les LT cytotoxiques (LT_C) expriment le marqueur CD8 et se lient aux CMH de classe I (Konig et al., 1992; Martinez-Naves et al., 1997).

Nom	Phénotype	Fonctions	Principales cytokines secrétées
LT _{H1}	CD3 ⁺ CD4 ⁺ Tbet ⁺	Immunité à médiation cellulaire Activation des macrophages (Immunité humorale)	IFN- γ , TNF β , IL-2
LT _{H2}	CD3 ⁺ CD4 ⁺ GATA3 ⁺	Immunité humorale Inflammation, allergie	IL-4, IL-5, IL-10, IL-13
LT _{H17}	CD3 ⁺ CD4 ⁺ ROR γ t ⁺	Hyper inflammation, défense contre l'hôte	IL-17, IL-17F, TNF
LT _C	CD3 ⁺ CD8 ⁺	Immunité à médiation cellulaire Cytotoxicité spécifique d'antigène	IFN- γ , TNF

Tableau 3 : Les différentes populations de LT intervenant dans la réponse immune.

LT_H LT helper et LT_C pour LT cytotoxique. *D'après Larosa et Orange, 2008*

II.A.3. Initiation de la réponse adaptative suite à une infection virale

Dans les tissus infectés, les CPA capturent des antigènes. A la suite d'un apprêtement, les CPA exposent des épitopes sous la forme de peptides présentés par les molécules du CMH. Généralement, si l'antigène est exogène, il sera présenté sur un CMH de classe II alors que si l'épitope antigénique est endogène (comme c'est le cas pour les cellules infectées par un virus ou un vecteur viral), il sera présenté sur le CMH de classe I. Toutes les cellules nucléées (notamment les CPA) infectées par un virus présentent donc des antigènes viraux à leur surface sur le CMH de classe I. Les virions n'ayant pas encore infecté de cellule sont des antigènes exogènes, les CPA peuvent alors les capter et présenter ces peptides viraux à leur surface sur le CMH de classe II. Les CPA vont migrer dans les organes lymphoïdes secondaires à l'aide de chimiokines et mûrir pour exprimer à leur surface le peptide antigénique (viral) sur la molécule du CMH ainsi que les molécules de costimulation CD80 ou CD86.

L'immunité adaptative débute par l'interaction d'un LT naïf avec une CPA présentant le peptide antigénique (Figure 3). La reconnaissance antigénique est permise grâce à l'interaction du récepteur TCR du LT et du peptide antigénique présenté par la molécule du CMH de classe II de la CPA, c'est le signal 1 d'activation du LT. Le TCR reconnaît en réalité à la fois le CMH et le peptide étranger. Une deuxième interaction, appelée signal de costimulation (signal 2) est nécessaire pour l'activation du LT (Janeway and Bottomly, 1994).

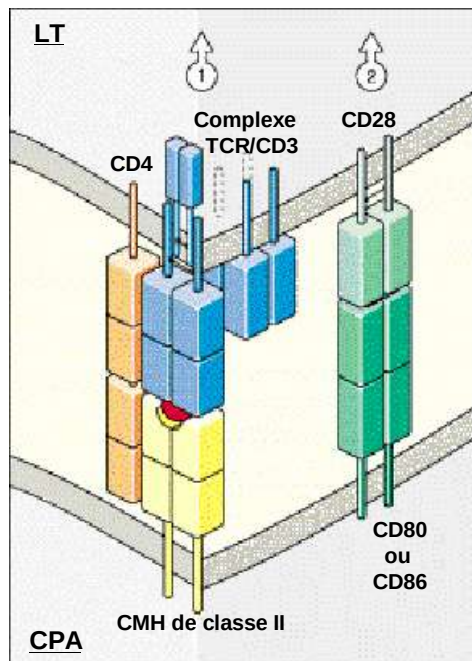


Figure 3 : Interactions nécessaires à l'activation d'un LT CD4⁺

Deux types d'interactions entre la CPA et le LT sont nécessaires pour activer la cellule T. La première interaction se fait entre le CMH de la CPA qui présente l'antigène et le TCR du LT. Le deuxième signal est permis suite à l'interaction des molécules de costimulation CD80 ou CD86 de la CPA avec le CD28 du LT.

Cette deuxième interaction est réalisée le plus souvent entre la molécule CD28, présent sur les LT naïf au repos et les molécules de costimulation CD80 ou CD86 présentes sur la CPA (Linsley and Ledbetter, 1993). Si ces 2 interactions sont présentes, le LT va devenir un LT activé, il va alors synthétiser et sécréter de l'IL-2 permettant son expansion clonale. Les LT activés initient la réponse adaptative et, selon les cytokines sécrétées, orientent celle-ci vers une réponse humorale dirigée par les LB (principalement par les LT_{H2} mais également par les LT_H folliculaires ou les LT_{H1}) ou vers une réponse à médiation cellulaire, aussi appelée réponse cytotoxique (par les LT_{H1}). Les LT_C sont impliqués uniquement dans la réponse immune à médiation cellulaire mais nécessitent parfois la présence de LT_H pour leur activation (le LT_H favorise la synthèse/sécrétion d'IL-2). Pour l'ensemble des cellules T (LT_H ou LT_C), des cellules mémoires sont créées.

La voie de costimulation CD40-CD40 ligand est une autre voie jouant un rôle important dans la réponse immunitaire (Cayabyab et al., 1994). L'interaction du CD40 ligand présent sur les LT activés avec le CD40 présent sur les CD permet l'activation de la CD qui stimule à son tour le LT (Grewal and Flavell, 1996).

II.A.4. La réponse humorale suite à une infection virale

Dans la réponse humorale, les antigènes sous forme native présents dans un organe lymphoïde secondaire vont venir se fixer sur les récepteurs BCR du LB. Cela va entraîner l'activation de la cellule B qui va internaliser l'antigène et le présenter à sa surface combinée avec le CMH de classe II. Les LT_H spécifiques de ce même antigène vont reconnaître la cellule B par l'interaction TCR/CMH de classe II associé au peptide antigénique. Ces LT_H vont alors activer la cellule B : i) par fixation du CD40 ligand au CD40 de la cellule B, ii) par interaction

d'autres complexes récepteurs/ligands de la famille des TNF (et TNF-Récepteurs) et iii) par la libération de cytokines (IL-4, IL-10, IL-6) (Parker, 1993).

Ces cytokines vont stimuler la prolifération clonale des LB et leur différenciation en cellules B mémoires ou en cellules effectrices appelées plasmocytes. Les plasmocytes sont des cellules qui ne comportent pas d'anticorps à leur surface mais qui sécrètent des anticorps en grande quantité. Ces anticorps vont alors migrer vers le site infectieux, se lier à l'antigène étranger et le neutraliser de différentes façons : i) soit l'anticorps se lie à plusieurs antigènes entraînant la formation d'un agrégat qui sera phagocyté par les cellules phagocytaires, ii) soit en activant le système du complément qui entraîne la lyse de l'antigène, iii) soit en neutralisant l'antigène pour éviter qu'il se fixe sur des cellules hôtes pour les contaminer.

La réponse humorale peut également se faire sans l'intervention des cellules LT_H , cette réponse est alors appelée réponse humorale T-indépendante.

Il existe différents types d'anticorps. Les anticorps naturels sont présents chez les nouveaux nés et les souris « naïves » dont le système immunitaire n'a pas encore été stimulé. A l'inverse, les anticorps immuns sont générés à la suite d'une activation du système immunitaire par des antigènes (immunisation). Les anticorps neutralisants, dont le mode d'action est décrit ci-dessus, peuvent être des anticorps naturels ou immuns. Dans le cas d'une infection virale, les anticorps neutralisants générés sont capables de bloquer une future infection virale par le même virus.

II.A.5. La réponse cytotoxique suite à une infection virale (Larosa and Orange, 2008)

Dans la réponse à médiation cellulaire, les LT_C sont activés suite à leur interaction avec des CPA présentant le peptide sur le CMH de classe I. Ces LT_C spécifiques d'un peptide sortent des organes lymphoïdes secondaires et sont dirigés dans le tissu infecté par des chimiokines. Sur le site de l'infection, les cellules présentant le peptide viral associé au CMH de classe I, vont alors être reconnues spécifiquement par les LT_C . Ces LT provoquent des lésions membranaires sur la cellule cible en libérant des molécules cytotoxiques contenues dans les granules lytiques, les granzymes et la perforine. La perforine agit en formant des pores dans la membrane de la cellule infectée laissant entrer les granzymes dans le cytoplasme cellulaire. Ces granzymes induisent l'apoptose des cellules infectées (Smyth et al., 2001; Topham et al., 1997).

En parallèle, les LT_C sécrètent de l' $IFN\gamma$, qui inhibe la réplication virale et favorise l'expression du CMH de classe I. Les LT_C sont très efficaces et détruisent spécifiquement les

cellules infectées, elles jouent ainsi un rôle primordial dans le contrôle de la réponse immune induite par un virus (ou un vecteur viral). Les macrophages (activés par les LT_{H1}) et des LT cytotoxiques $CD4^+$ sont également des acteurs de la réponse à médiation cellulaire mais leur action suite à une infection virale est moindre comparée aux $LT_C CD8^+$.

Les deux types de réponse immune sont complémentaires : la réponse humorale neutralise les virions n'ayant pas encore infecté une cellule alors que la réponse cytotoxique détruit les cellules infectées par le virus.

De plus, le rôle des cellules mémoires n'est pas négligeable, elles permettent d'induire une réponse immunitaire mémoire qui est alors plus rapide (1-2 jours au lieu de 5-7 jours pour une réponse humorale) et plus forte si l'individu rencontre de nouveau le même pathogène.

II.A.6. Spécificité des AAVr à transduire les cellules dendritiques

L'utilisation de vecteurs AAVr est souvent corrélée au développement d'une réponse humorale contre la capside ou contre le transgène. Le développement d'une réponse cytotoxique apparaît de façon plus rare. Ceci s'explique notamment par la faible capacité des AAVr à transduire les CPA. En effet, des études ont montré que contrairement à d'autres vecteurs viraux comme les adénovirus, il est admis que les vecteurs AAVr ne transduisaient pas efficacement les CD ou les macrophages **aussi bien *ex vivo* qu'*in vivo*** (Jooss et al., 1998; Sarukhan et al., 2001; Zaiss et al., 2002).

Ainsi, suite à une injection d'AAVr, les protéines de capside et les produits du transgène sont présents sur le site de l'injection et vont être phagocytés par les CPA et présentés par leurs molécules du CMH de classe II. Cela entraîne le développement d'une réponse immune humorale contre les protéines virales. A l'inverse, comme les AAVr ne transduisent pas efficacement les CPA, les peptides issus du transgène ne vont pas être présentés sur les molécules du CMH de classe I des CPA et ainsi, n'induisent pas de façon directe une réponse cytotoxique. Dans certains cas, le développement d'une réponse cytotoxique est pourtant observé. Malgré la possible transduction de CD par les AAVr, **la réponse cytotoxique semble surtout due au phénomène de présentation croisée qui consiste en la capture de l'antigène par les CD à partir des cellules transduites**. Dans ce contexte, lors d'une injection d'AAVr dans le muscle par exemple, les AAVr transduisent les cellules musculaires. Les CD captent alors les antigènes viraux, soit par phagocytose du vecteur viral, soit par

pinocytose des protéines solubles virales, soit par capture des protéines virales exprimées à la membrane des cellules musculaires transduites. Ces antigènes captés, bien qu'étant exogènes à la CD, sont présentés par les molécules du CMH de classe I des CD. Lors de ce mécanisme de présentation croisée, le développement de la réponse cytotoxique est tardif par rapport à une présentation directe du peptide antigénique (notion évoquée par la suite dans l'étude de Wang et al., (Wang et al., 2005a).

Concernant la permissivité des CD à la transduction par les AAVr, des études récentes **menées *ex vivo*** ont relancé la polémique en montrant la capacité de certains sérotypes d'AAVr, tels que le AAV5r principalement mais également les AAVr de sérotype 1, 2 et 6, à transduire efficacement les CD et à un niveau suffisant pour engendrer une réponse cytotoxique (sécrétion d'IFN γ et prolifération après stimulation) (Aldrich et al., 2006; Liu et al., 2001; Mahadevan et al., 2007; Ponnazhagan et al., 2001; Veron et al., 2007; Xin et al., 2006). Il semblerait que les vecteurs **scAAVr** soient plus efficaces que les vecteurs **ssAAVr** dans la transduction des CD *ex vivo* (Veron et al., 2007). Ceci peut s'expliquer par la synthèse du brin d'ADN complémentaire qui pourrait être une étape limitante dans la transduction des CD par les **ssAAVr**. Selon ces données récentes montrant la possibilité des AAVr à transduire les CD, le développement de la réponse cytotoxique initié par les CD pourrait donc se faire également par présentation directe des peptides antigéniques.

L'efficacité de transduction des CD à l'aide de vecteurs AAVr est donc un sujet de controverses. **Cependant, il ne faut pas oublier que la transduction des CD par les AAVr *ex vivo* n'est pas forcément représentative de celle obtenue *in vivo* et ce qui se passe *in vivo* n'est pas bien décrit.**

II.B- Exemples de réponses immunitaires développées suite à l'injection d'un AAVr

II.B.1. La réponse immunitaire *innée* en présence de vecteurs AAVr

Les études de transfert de gènes à l'aide de vecteurs AAVr menées *in vivo* ne montrent pas de développement de réponse inflammatoire importante, suggérant que les AAVr ne stimulent pas ou très peu l'immunité innée (Conrad et al., 1996). Ainsi, une étude comparative des effets immédiats d'un vecteur AAVr et d'un vecteur adénoviral *in vitro* montrent que contrairement aux adénovirus, une transduction à l'aide de vecteurs AAVr n'induit pas

l'expression de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires, même en présence d'une dose d'AAVr 40 fois supérieure à celle des vecteurs adénoviraux (Zaiss et al., 2002). Néanmoins, l'injection intraveineuse d'AAVr entraîne rapidement la synthèse d'ARNm de chimiokines (TNF α , RANTES, IP-10, MIP-1 β , MCP-1 et MIP-2). Cette réponse immune est probablement due aux macrophages résidants. De plus, l'activation de l'immunité innée ne dure que 6 heures alors que celle obtenue après administration d'un vecteur adénoviral dure plus de 24 heures (Zaiss et al., 2002).

Ainsi, un avantage clé des vecteurs AAVr est qu'ils n'activent pas efficacement l'immunité innée, ils n'induisent donc pas (ou peu) de réponse inflammatoire, ni de toxicité.

Les vecteurs AAVr ne comportent pas de séquences codantes virales, les réponses immunitaires développés après transfert de gènes à l'aide d'AAVr sont par conséquent médiées uniquement contre le produit du transgène ou contre les protéines de capside.

II.B.2. La réponse immunitaire **adaptative** contre la capsid d'AAVr

i) Développement d'une réponse humorale anti-AAVr chez les animaux injectés par des AAVr

L'étude menée par Chirmule et al. a montré qu'une injection unique d'AAVr de sérotype 2 dans le muscle mène au développement d'une réponse humorale contre la capsid du vecteur, c'est-à-dire au développement d'anticorps neutralisants chez le primate et chez la souris. Pour les deux espèces, cette réponse humorale est maximale 1 mois post-injection du vecteur puis décroît pendant un an (diminution de la quantité d'anticorps d'environ 10 fois) tout en conservant un taux important d'anticorps (Figure 4) (Chirmule et al., 2000). L'utilisation de souris déficientes pour le gène CD4 invalidé indique que la réponse humorale est T dépendante.

De plus, cette étude indique que la ré-administration d'un vecteur AAVr du même sérotype chez des animaux possédant une forte quantité d'anticorps neutralisants (souris ou macaques rhésus) entraîne une expression du transgène d'environ 4 à 20 fois plus faible que si le vecteur est administré à un animal n'ayant pas reçu ce premier AAVr (Chirmule et al., 2000). Ces résultats ont été confirmés dans de nombreuses études et sur différentes espèces animales.

Le développement d'anticorps neutralisants apparaît comme une étape limitante à la ré-administration d'un vecteur AAVr chez le même animal. Ce problème peut être contourné en

utilisant des vecteurs AAVr de sérotype différent de ceux injectés ou rencontrés naturellement par l'individu suite à diverses infections (Petry et al., 2008; Riviere et al., 2006). Le sérotype utilisé pour la ré-administration d'un vecteur doit être choisi parmi les sérotypes ne réagissant pas de façon croisée avec les anticorps neutralisants produits par le premier AAVr injecté (Xiao et al., 1999).

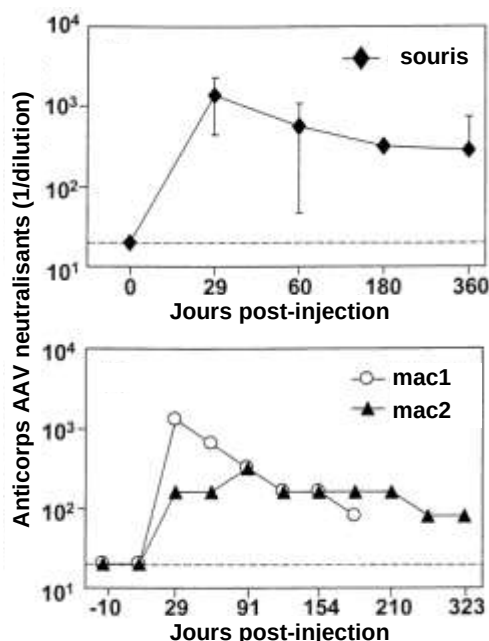


Figure 4 : Production d'anticorps neutralisants à la suite d'une injection de vecteurs AAVr

L'injection intramusculaire de vecteurs AAV2r à des souris (schéma du haut) ou à des macaques (schéma du bas) entraînent la production par ces animaux d'anticorps neutralisants contre la capsid de l'AAVr injecté. *D'après Chirmule et al., 2000.*

ii) Développement d'une réponse cytotoxique anti-AAVr chez le chien

Les travaux menés par Wang et al. ont montré récemment que le transfert de gènes dans le muscle squelettique de chiens pouvaient entraîner une réponse cytotoxique vis-à-vis des protéines de capsid des vecteurs AAVr de sérotype 2 et 6. Cette réponse cytotoxique apparaît comme indépendante du transgène exprimé (que ce soit la β -galactosidase ou le facteur IX), du type de promoteur utilisé (spécifique du muscle comme le CK6 ou ubiquitaire comme le CMV), ainsi que du muscle injecté. L'injection de capsides vides d'AAVr de sérotype 6 entraîne aussi une réponse immune forte (Wang et al., 2007a). Dans l'ensemble des cas, l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire vis-à-vis de la capsid est mise en évidence sur des biopsies musculaires par l'observation d'infiltrats cellulaires (détection de LT CD4⁺ et LT CD8⁺). Cette réponse immune semble empêcher l'expression du transgène à long terme en détruisant les cellules transduites. La méthode de purification des vecteurs, que ce soit sur gradient de chlorure de Celsium ou sur colonnes d'héparine ne modifie pas la réponse immune obtenue. Les auteurs indiquent qu'ils ignorent si l'immunogénicité provient des capsides ou des protéines cellulaires qui adhèrent à la capsid (Wang et al., 2007a).

iii) Observation d'une réponse immunitaire contre la capside chez l'homme

Les essais cliniques réalisés à l'aide d'AAVr sur des patients hémophiles (que ce soit par transfert de gènes dans le muscle ou dans l'artère hépatique), ont montré que l'administration d'AAV2r codant pour le facteur IX chez les patients entraînait le développement d'anticorps neutralisants contre la capside (Manno et al., 2003 ; Manno et al., 2006). De plus, dans le transfert de gènes par injection d'AAV2r dans l'artère hépatique, le développement d'une réponse cytotoxique contre la capside de l'AAV2r a été observée (Manno et al., 2006; Mingozzi et al., 2007b). Il est supposé que cette réponse immune a engendré la destruction des cellules transduites par le vecteur AAVr. Les auteurs ont pu montrer que les patients possédaient des LT mémoires spécifiques de la capside de l'AAV2r avant le protocole (générés suite à une infection préalable des patients par de l'AAV2 sauvage) et que le transfert de gènes a entraîné une expansion de ces cellules (Mingozzi et al., 2007b). **Cette réponse cytotoxique n'a pas été décrite dans les modèles animaux, excepté chez les primates non humains. Ceci s'explique en partie parce que les modèles animaux (hors primates) ne sont pas naturellement contaminés par les AAV sauvages.**

iv) Stratégies possibles pour empêcher la réponse immunitaire contre la capside

Différentes stratégies sont possibles pour contrôler la réponse immunitaire contre les protéines de capside. Certaines techniques visent à éviter le développement de cette réponse immune en diminuant par exemple la dose de vecteur administré (Song et al., 1998). De plus, l'administration d'une courte immunosuppression, par un duo CTLA4Ig et anticorps anti-CD40L (ou anti-CD40) réduit le développement d'anticorps neutralisants chez la souris permettant ainsi l'efficacité d'une nouvelle administration d'AAVr de même sérotype dans le poumon (Halbert et al., 1998) ou de plusieurs administrations dans le muscle (Lorain et al., 2008).

De même, dans le modèle canin de Wang et al. décrit précédemment, dans lequel une réponse immunitaire cytotoxique anti-capside est observée suite à l'injection d'AAV2r ou d'AAV6r, l'administration d'un trio cyclosporine, MMF (mycophénolate mofetil) et ATG (anti-thymocyte globuline) aux animaux lors de l'injection des AAVr permet de réduire la réponse immunitaire cytotoxique et d'obtenir une expression du transgène à long terme (Wang et al., 2007b). Le blocage de la voie du complément semble également une alternative pour réduire la réponse humorale contre la capside (Zaiss et al., 2008).

II.B.3. La réponse immunitaire **adaptative** contre le produit du transgène

i) Mise en évidence de la réponse immune contre le transgène chez la souris

Les premières études de transfert de gènes dans le muscle menées il y a environ 10 ans montraient déjà l'apparition d'une réponse immune humorale vis-à-vis du produit du transgène (Clark et al., 1997 ; (Song et al., 1998) Dans ces études, les protéines issues du transgène, tels que la β -galactosidase et l'alpha-trypsine humaine (injectée chez des souris) étaient des protéines étrangères à l'animal donc fortement immunogènes.

Des travaux plus récents menés par Yuasa et al. ont permis de mettre en évidence une réponse immunitaire contre le transgène lors d'injections d'AAV2r dans des souris *mdx* (Yuasa et al., 2002). Ces souris correspondent au modèle murin de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Leurs premiers résultats montrent que l'administration d'AAV2r contenant le gène de la β -gal sous contrôle d'un promoteur CMV est plus efficace dans des souris normales que dans des souris *mdx* (Yuasa et al., 2002). Cela peut s'expliquer par la dégénérescence musculaire observée dans les souris *mdx* : les cellules transduites meurent et l'expression du transgène diminue. Cependant, cette hypothèse est contrée par le fait que si les souris sont injectées plus tardivement (lorsque la dégénérescence musculaire n'est plus pathologique chez les *mdx*), l'expression du transgène est équivalente dans les 2 types de souris puis elle décroît uniquement dans les souris *mdx*. La pathologie DMD ne peut donc pas expliquer ce phénomène tardif.

L'étude histologique des muscles des souris *mdx* injectées avec l'AAVr a mis en évidence **la présence d'un infiltrat cellulaire** important contenant des macrophages, des LTCD4 et des LTCD8 (réponse à médiation cellulaire). Cet infiltrat n'est pas présent dans des souris saines injectées avec l'AAV2r-LacZ (Yuasa et al., 2002). La présence de dépôts d'IgG a également été mise en évidence dans les muscles de souris *mdx* injectées. L'utilisation d'anticorps spécifiques du transgène et de l'AAVr a montré que la réponse humorale était dirigée contre le transgène. Les auteurs suggèrent que cet infiltrat provient de l'augmentation de la perméabilité cellulaire dans les souris *mdx*. Cette forte perméabilité musculaire aurait pour conséquence un relargage des molécules immunogènes présentes dans les cellules musculaires transduites dans les espaces intercellulaires qui contiennent notamment des CPA (cellules dendritiques ou macrophages) capables d'initier une réponse immunitaire.

Le rôle des CPA, et notamment des CD, dans le développement de la réponse immunitaire est renforcé par l'observation d'un délai d'apparition plus long de la réponse immunitaire (2 mois au lieu d'1 mois) lorsque l'injection intramusculaire d'un AAVr contenant le gène de la β -gal est sous contrôle d'un promoteur spécifique du muscle (MCK, créatine kinase musculaire) et non d'un promoteur ubiquitaire (CMV) (Yuasa et al., 2002). L'utilisation d'un promoteur spécifique limite la transduction de l'AAVr aux cellules musculaires alors que le promoteur ubiquitaire permet l'expression du transgène dans les différents types cellulaires, c'est-à-dire aussi bien dans les cellules musculaires que dans les CPA. Ainsi, la transduction directe de CD par l'AAVr augmenterait la probabilité de développement d'une réponse immunitaire. Dans cette étude, l'immunosuppression des souris *mdx* suite à l'administration d'anticorps anti-CD4 permet l'expression de la β -gal, montrant ainsi que la réponse immunitaire nécessite les LT_H (Yuasa et al., 2002).

ii) Obtention d'une réponse immunitaire anti-transgène chez le chien

Par la suite, Yuasa et al. ont utilisé le même système (AAV2r et gène LacZ) sur des chiens atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (Yuasa et al., 2007). La transduction de cellules musculaires canines *in vitro* est efficace mais l'injection des vecteurs *in vivo* entraîne une faible expression de la β -gal, associée à **une réponse immunitaire humorale et cellulaire**, mise en évidence par la présence d'un fort infiltrat cellulaire (présence de LB, LT, CD et de dépôts d'IgG) (Figure 5).

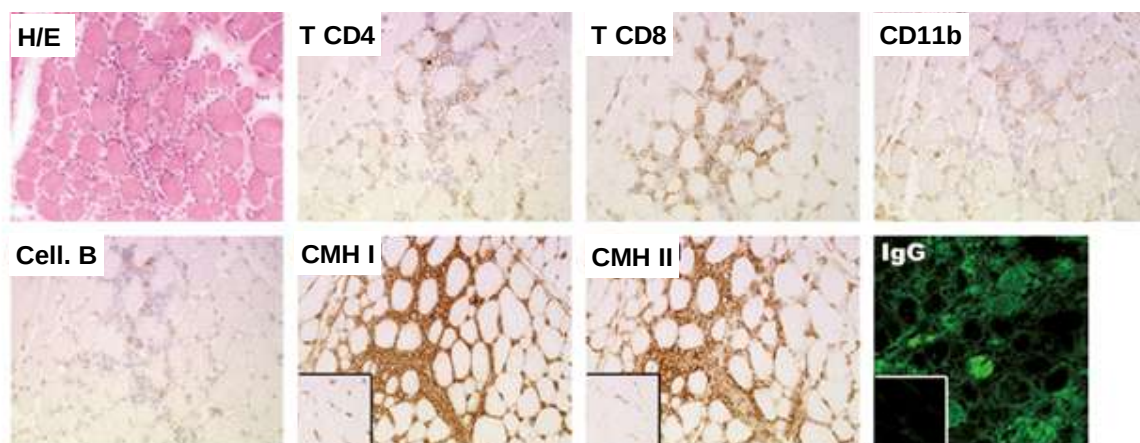


Figure 5: Infiltrats cellulaires suite à l'injection d'AAV2r

Le transfert de gènes à l'aide d'AAV2r LacZ dans le muscle de chiens atteints de dystrophie musculaire entraîne une réponse immunitaire forte visible notamment par la présence d'infiltrat cellulaire dans les biopsies de muscle. Les anticorps utilisés sur les coupes de muscles sont des anticorps canins anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b (cellules myéloïdes), anti-LB, anti CMH de classe I et de classe II et enfin anti-IgG. *D'après Yuasa et al. 2007*

Un court traitement immunosuppresseur (cyclosporine et MMF) permet d'augmenter l'expression de la β -gal dans les muscles canins. La réponse humorale semble à la fois dirigée contre la capside d'AAV2r et la protéine issue du transgène (Yuasa et al., 2007). L'injection intra-musculaire d'un vecteur AAV2r dans lequel le promoteur a été enlevé entraîne une augmentation de l'efficacité de transduction de l'AAVr (visible par PCR quantitative ciblant le génome de l'AAV) alors que le transgène n'est pas exprimé. L'infiltrat inflammatoire local est également fortement réduit. Ces résultats indiquent que la réponse immune développée chez les chiens est principalement dirigée contre la protéine issue du transgène et entraîne la lyse des cellules transduites. Les auteurs se sont intéressés à la différence d'intensité de la réponse immunitaire observée entre la souris et le chien. Ils ont ainsi montré que la stimulation de splénocytes à l'aide de la β -gal entraîne une plus forte production d'IFN γ chez les chiens non traités que chez les souris non traitées. **La capacité des cellules immunitaires du chien à répondre à un antigène étranger est donc plus forte que celles de la souris (Yuasa et al., 2007).**

iii) Dynamique de la réponse immune anti-transgène

En parallèle, Wang et ses collaborateurs ont montré par des tests ELISPOT que l'administration d'une forte dose de vecteurs AAV2r codant pour le facteur IX (modèle de pathologie de l'hémophilie de type B) (1×10^{12} vg/souris) entraîne le développement d'une réponse humorale suivi du développement tardif d'une réponse cytotoxique. Cette réponse immunitaire a été mise en évidence par la présence de cellules B anti-FIX et la sécrétion d'anti-IFN γ par les splénocytes et les cellules des ganglions lymphatiques (Figure 6). Des infiltrats T CD8 $^{+}$ et une forte destruction des fibres musculaires ont également été observés *in vivo* (Wang et al., 2005a). Le développement tardif de la réponse immunitaire corrèle avec une présentation croisée des peptides antigéniques par les CPA.

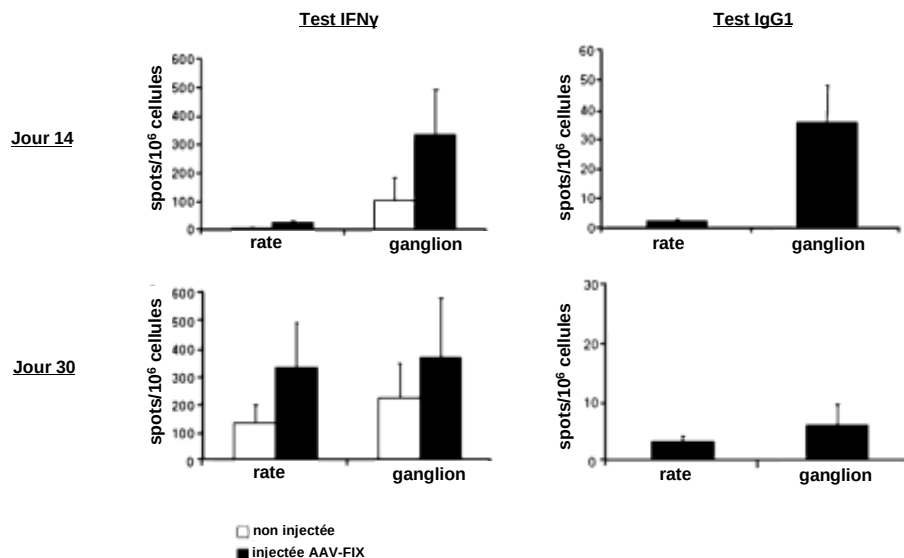


Figure 6 : L'administration d'AAV2r FIX à forte dose entraîne le développement d'une réponse humorale suivie d'une réponse cellulaire chez la souris

Suite à une administration intra-musculaire d'AAV2r FIX à des souris, des tests ELISPOT ont été réalisés sur les splénocytes et les cellules des ganglions drainant le muscle. Ces ELISPOTs sont de 2 types, l'un détecte les cellules sécrétant des anticorps anti FIX (réponse humorale) et l'autre révèle les cellules sécrétant de l'IFN γ (réponse cellulaire). Ces tests ont été réalisés 14 jours et 30 jours post-injection de l'AAVr. *D'après Wang et al. 2005*

II.C- Comment réguler ces réponses immunes contre le transgène ?

L'observation des différentes expériences montre que certains facteurs influencent le développement de réponse immune contre le transgène. Parmi ces facteurs, dont certains ont été décrits précédemment, il faut noter :

1) la quantité de vecteur injecté : le risque de développement d'une réponse immunitaire augmente avec la quantité de vecteurs injecté car le produit du transgène est présent en plus grande quantité (Arruda et al., 2001; Herzog et al., 2002; Herzog et al., 1999)

2) le promoteur utilisé : la transduction spécifique des cellules musculaires à l'aide de promoteurs comme le promoteur Desmine, CK5 ou MCK permet de diminuer le risque de développer une réponse immune car les cellules immunitaires ne sont pas ou sont peu transduites par le vecteur. De plus, l'expression du transgène est normalement limitée à un organe (Cordier et al., 2001; Yuasa et al., 2002).

3) les prédispositions génétiques : des expériences comparatives menées sur des animaux (souris et chiens) sains et des modèles déficientes pour la dystrophine ou le facteur IX

montrent l'apparition d'une réponse immunitaire humorale et parfois d'une réponse cytotoxique contre le transgène plus forte et plus précoce chez les animaux malades (Fields et al., 2001; Herzog et al., 2001; Herzog et al., 1999; Yuasa et al., 2002; Zhang et al., 2007).

4) la voie d'administration du vecteur : en ce qui concerne le transfert de gènes dans le muscle, la technique de perfusion de membre isolé avec des vecteurs AAVr a été développée récemment dans des modèles de dystrophie musculaire et d'hémophilie (Arruda et al., 2005; Gonin et al., 2005; Rodino-Klapac et al., 2007; Su et al., 2005). Celle-ci permet de faire diffuser rapidement le vecteur dans le membre, évitant ainsi une trop forte concentration du vecteurs au niveau des sites d'injection. Au contraire, une injection intra-musculaire provoque le développement d'une réponse immunitaire car les antigènes (protéines de capsid ou produits du transgène) sont concentrés au niveau du site d'injection de l'AAVr (Wang et al., 2005a; Wang et al., 2005b). La comparaison des techniques d'injection intra-musculaire et de perfusion de membre isolé dans un modèle de primate non humain dans notre laboratoire (Unité INSERM U649) a permis de confirmer ces résultats (Toromanoff et al., manuscrit en préparation).

5) le sérotype utilisé : l'utilisation des vecteurs AAVr chez l'homme montre que l'infection naturelle de l'individu par de l'AAV sauvage (de sérotype 2 le plus souvent) avant l'administration d'AAV2r empêche l'efficacité du transfert de gènes car les patients ayant déjà été contaminés par l'AAV2 sauvage développe une réponse cytotoxique mémoire contre la capsid lors de l'injection d'AAV2r (Mingozzi et al., 2007b). De plus, comme mentionné précédemment (paragraphe II.A.6), certains sérotypes d'AAVr (l'AAV5r par exemple) et également les scAAVr sont capables de transduire efficacement les CD *ex vivo* (Aldrich et al., 2006; Ponnazhagan et al., 2001; Veron et al., 2007; Xin et al., 2006). Il est alors envisageable que l'utilisation de ces sérotypes soit plus immunogène que l'utilisation des vecteurs AAVr ayant un tropisme faible pour les CD.

La modification d'un des facteurs décrits ci-dessus peut permettre de diminuer le risque de développement de réponse immunitaire. Cependant, dans de nombreuses études, le modèle animal ne peut être changé, tout comme la dose de vecteur administré. En effet, dans le premier essai clinique réalisé sur des patients hémophiles, la dose de vecteurs administrée apparaît comme la dose maximale avant le développement d'une réponse immunitaire, malheureusement elle est insuffisante pour avoir un effet thérapeutique (Manno et al., 2003). Parallèlement, l'utilisation d'un promoteur spécifique du muscle ne semble pas toujours inhiber le développement d'une réponse immune anti-transgène chez le singe (Chenuaud et

al., 2004). Quant à la voie d'administration, la technique de perfusion n'a été que très récemment développée dans certains modèles animaux et les injections réalisées chez l'homme ou dans des modèles de gros animaux sont encore effectuées principalement en intra-musculaire. De plus, cette technique ne peut s'appliquer qu'au transfert de gènes dans les membres, elle est donc inefficace dans le cas de réponse immune développée suite à un transfert de gènes visant le foie (injection d'AAVr dans l'artère hépatique) ou encore pour le transfert de gènes dans le système nerveux central (injection dans le striatum par exemple). Pour contrôler l'apparition d'une réponse immunitaire, il apparaît donc nécessaire de trouver d'autres systèmes capables de moduler le système immunitaire et permettant d'inhiber le développement d'une réponse immune après transfert de gènes à l'aide d'un vecteur viral.

Certaines techniques d'immunosuppression des animaux ont donné des résultats satisfaisants. Comme décrit précédemment, l'administration de molécules immunosuppressives telles que la cyclosporine, le tacrolimus, l'ATG, le MMF ou encore l'injection d'anticorps anti-CD4 chez l'animal permet de conserver l'expression du transgène en limitant le développement de réponse immunitaire contre le transgène ou la capsid (Jiang et al., 2006a; Manning et al., 1998; Yuasa et al., 2002; Yuasa et al., 2007). De plus, le blocage des voies de costimulation, comme par exemple l'interaction CD40/CD40 ligand à l'aide d'un anticorps anti-CD40 ligand permet de retarder l'apparition de la réponse immunitaire contre le transgène (Sarukhan et al., 2001). Ainsi, une administration continue d'anticorps anti-CD40 ligand pourrait probablement permettre de maintenir l'expression du transgène à un taux maximal. Toutefois, l'administration continue de ces immunosuppresseurs est un inconvénient non négligeable. En effet, ils ne sont pas spécifiques et entraînent une fragilisation générale de l'individu, le rendant vulnérable aux infections. De plus, les immunosuppresseurs n'induisent pas de tolérance, cela signifie qu'à l'arrêt du traitement, la réponse immune peut se développer.

Une autre approche pour limiter le développement de la réponse immunitaire est d'induire chez les animaux une tolérance vis-à-vis du transgène. **La tolérance se définit comme l'ensemble des mécanismes permettant d'inhiber spécifiquement et à long terme une réponse immune contre un antigène.** Contrairement aux immunosuppresseurs, la tolérance, une fois induite, agit de façon prolongée et n'immunodéprime pas l'individu. La tolérance est spécifique d'un antigène, c'est-à-dire que l'individu ne réagira plus contre cet antigène mais il gardera un système immunitaire efficace vis-à-vis des autres molécules immunogènes.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à induire une tolérance au produit du transgène dans un modèle de transfert de gènes dans le muscle de macaque dans lequel les animaux développent une réponse à la fois humorale et cellulaire contre le produit du transgène (Favre et al., 2002). Ce modèle de transfert de gènes sera décrit dans la partie « Contexte et objectifs de la thèse ».

Le concept de tolérance induite se base sur les connaissances acquises sur la tolérance naturelle développée chez les animaux. Cette tolérance est présente de façon principale au niveau du thymus, on parle alors de tolérance centrale (décrite dans la partie III de cette introduction) et également en périphérie, on parle alors de tolérance périphérique (décrite dans la partie IV de cette introduction).

La stratégie d'induction d'une tolérance dans des modèles de transfert de gènes est facilitée par rapport aux traitements de certaines pathologies car l'élément immunogène responsable de la réponse immunitaire est connu, il correspond au transgène. De plus, la tolérance peut être induite avant l'immunogénicité puisque l'élément immunogène n'est présent qu'après l'injection de vecteurs codant pour cet élément.

III. La tolérance centrale

III.A- Définition de la tolérance centrale naturelle

Le thymus est un organe lymphoïde primaire situé entre le sternum et le cœur où se développent les lymphocytes T. Le développement des LT, appelés alors thymocytes dans le thymus, consiste en a) une maturation des cellules à partir de précurseurs et également en b) une sélection rigoureuse des cellules T. Cette sélection est indispensable au bon fonctionnement du système immunitaire. Ainsi, les cellules T doivent être capables de reconnaître les molécules du CMH de classe I ou de classe II du soi pour être efficaces en périphérie mais ne doivent pas reconnaître les antigènes du soi. Seuls 1 à 3% des thymocytes présents dans le thymus deviendront des LT naïfs matures (Egerton et al., 1990). Le processus de tolérance (centrale et périphérique) n'est pas parfait et des lymphocytes auto-réactifs peuvent être présents dans l'organisme. Ces cellules ont alors la potentialité d'initier des maladies auto-immunes. L'activité du thymus est importante dans les premières années de vie puis elle ralentit en parallèle d'une involution du thymus. Le taux de lymphocytes T présents en périphérie est alors maintenu par la division cellulaire des LT matures. De plus, les LT naïfs ont une durée de vie longue.

III.B- Composition du thymus

D'un point de vue macroscopique, le thymus est composé de 2 lobes le plus souvent asymétriques. Chacun de ces lobes comprend de nombreux lobules organisés en plusieurs zones comme décrit sur la figure 7 : la zone sub-capsulaire, le cortex, la jonction cortico-médullaire et la médulla (Takahama, 2006). Hormis les thymocytes, le stroma thymique est composé de macrophages, de cellules épithéliales corticales et médullaires (nommées respectivement cTEC et mTEC), de cellules dendritiques et des corpuscules de Hassal. La répartition des différentes cellules stromales thymiques corrèle avec les différents stades de la maturation des thymocytes. Les cellules du stroma sont essentielles pour la maturation et la sélection des thymocytes. Elles agissent par interaction directe avec les thymocytes ou en sécrétant des chimiokines. En contrepartie, les thymocytes interviennent dans la différenciation des cellules stromales thymiques (Takahama, 2006).

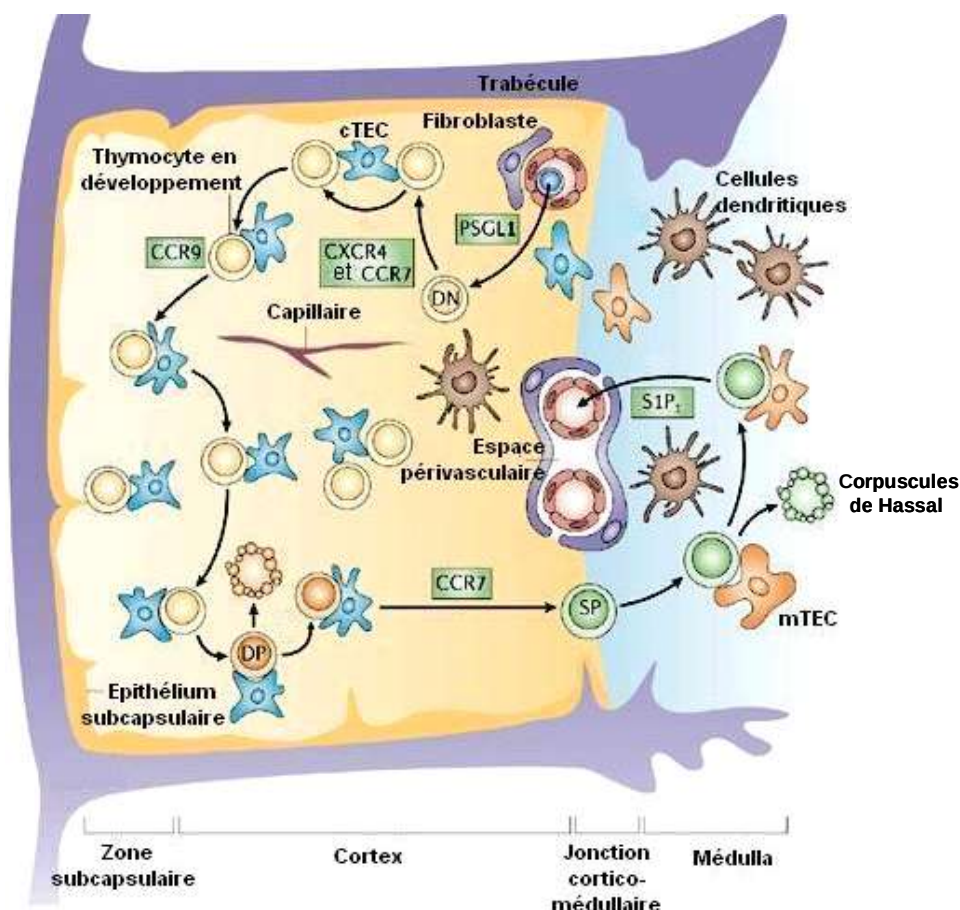


Figure 7 : La composition du thymus et la différenciation des LT

Le thymus est composé de 4 zones : la zone subcapsulaire, le cortex, la jonction cortico-médullaire et la médulla. Les thymocytes arrivent dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire puis ils migrent dans le cortex pour débuter leur différenciation (stade DN) qui se finira dans la médulla au stade SP. La différenciation et la migration des thymocytes se fait grâce aux cellules du stroma thymique par interactions cellule à cellule et par la sécrétion de cytokines par les cellules stromales. **cTEC** et **mTEC** : Cellules Epithéliales Thymiques corticales et médullaires ; **DN** : thymocytes double négatifs $CD4^-CD8^-$; **DP** : thymocytes double positifs $CD4^+CD8^+$; **SP** : thymocytes simple positifs $CD4^+$ ou $CD8^+$ **D'après Takahama, 2006.**

Dans ce manuscrit, le développement des LT les plus connus appelés LT conventionnels $CD4$ ou $CD8$ et comportant un $TCR\alpha:\beta$ va être développé, ainsi que la génération de cellules T régulatrices naturelles. Il existe également d'autres cellules générées dans le thymus à partir des thymocytes, comme les cellules NKT et les LT portant un $TCR\gamma:\delta$ dont le développement et la caractérisation est moins connue (Berg, 2007).

III.C- Différents stades de développement des LT

Le développement des thymocytes est corrélé avec leur migration dans les différentes zones du thymus. Ainsi, les précurseurs des thymocytes provenant de la moelle osseuse entrent dans le thymus par voie sanguine grâce aux vaisseaux localisés dans la jonction cortico-médullaire (Ladi et al., 2006). Ces cellules sont appelées double négatives (DN) car elles n'expriment ni le marqueur CD4, ni le marqueur CD8. De plus, elles ne possèdent pas de TCR qui permet la reconnaissance du complexe CMH-peptide de la CPA.

Il existe 4 stades de DN selon l'état de maturation des cellules. Ces différents DN se différencient par l'expression de leurs marqueurs CD44 et CD25 chez la souris (Godfrey et al., 1993). Ainsi, les DN1 ($CD25^-CD44^{high}$) sont situés dans la jonction cortico-médullaire. Ces DN1 migrent dans le cortex et se différencient en DN2 ($CD25^+CD44^{high}$). Les DN2 rejoignent ensuite la zone extérieure du cortex et la zone sous capsulaire où ils deviennent alors des DN3 ($CD25^+CD44^{low}$) (Lind et al., 2001; Porritt et al., 2003).

Au stade DN3, les thymocytes vont commencer la synthèse du TCR en réarrangeant les gènes de la chaîne β du TCR. Dans la zone sub-capsulaire, les thymocytes se différencient en une dernière forme double négative, les DN4 ($CD25^-CD44^-$) qui portent le pré-TCR.

La migration des DN dans le cortex ainsi que leur développement sont contrôlés par les récepteurs de chimiokines présents sur les DN. Les ligands de ces récepteurs sont produits par les cellules stromales corticales. Ainsi, les souris déficientes pour le CXCR4, le CCR7 ou encore le CCR9 ont une répartition anormale des thymocytes dans le thymus associée à des problèmes de différenciation des LT (Benz et al., 2004; Misslitz et al., 2004; Plotkin et al., 2003).

Les DN4 se différencient ensuite en cellules doubles positives (DP) qui expriment à la fois le CD8 et le CD4. Le réarrangement des gènes codant pour la chaîne α du TCR dans les DP conduit à des TCR fonctionnels et diversifiés. Les cellules DP n'ayant pas réalisé un réarrangement productif de leur TCR meurent.

Dans le cortex, les cellules DP vont entrer en contact avec les cTEC et subir le phénomène de sélection positive (expliqué au paragraphe III.D) permettant de sélectionner les thymocytes capables de reconnaître le CMH du soi.

Une deuxième sélection, appelée sélection négative (décrite dans le paragraphe III.E) consiste

à éliminer les thymocytes réagissant trop fortement contre les antigènes du soi et qui pourraient par conséquent entraîner des réponses auto-immunes en périphérie (LT autoréactifs). Le lieu de la sélection négative (cortex ou médulla) est controversée, mais semble avoir lieu principalement dans la médulla.

La migration des thymocytes du cortex vers la médulla se fait grâce à une attraction chimiotactique impliquant le CCR7 exprimé fortement par les thymocytes DP (sélectionnés positivement) et ses ligands, le CCL19 et CCL21 exprimés par les mTEC (Ueno et al., 2004). Dans la médulla, les thymocytes vont devenir des cellules Simples Positives, SP CD4⁺ ou CD8⁺. La différenciation en cellules CD4⁺ ou CD8⁺ se décide lors de la sélection négative. Les thymocytes SP vont ensuite maturer dans la médulla, cette maturation est associée à une inversion de l'expression de CD62L (MEL-14) et CD69 par ces cellules (passage de cellules CD62L^{low} et CD69^{high} à des cellules matures et naïves CD62L^{high} et CD69^{low}) (Bendelac et al., 1992; Reichert et al., 1986) .

L'export des thymocytes matures naïfs se fait au niveau de la jonction cortico-médullaire, dans les espaces péri-vasculaires avec l'intervention de S1P1 (récepteur 1 de la sphingosine-1- phosphate) (Matloubian et al., 2004).

III.D- Sélection positive des thymocytes

La sélection positive consiste à conserver uniquement les thymocytes reconnaissant le CMH du soi (associé à un peptide).

Le stroma thymique comporte en plus des cTEC et des mTEC, des cellules dendritiques et des macrophages. Comme les cellules dendritiques, les cellules épithéliales sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui expriment à leur surface le CMH de classe I et le CMH de classe II associé à un peptide antigénique, ces CPA peuvent donc engendrer la sélection positive des thymocytes. Les capacités d'apprêtement et de présentation de l'antigène des cTEC semblent différentes de celles des cellules dendritiques et également des mTECs (Bowls et al., 1999) suggérant que les cTECs seraient les meilleurs candidats pour réaliser la sélection positive. De plus, ceci est renforcé par des études montrant des propriétés propres aux cTEC permettant la sélection et le développement des SP CD4⁺ et CD8⁺ (Murata et al., 2007; Nakagawa et al., 1998). La sélection positive semble donc avoir lieu sur des thymocytes au stade DP suite à des interactions avec les cellules épithéliales corticales au

niveau du cortex (Figure 8).

De façon schématique, si l'interaction du TCR de la cellule DP se fait avec le CMH de classe I de la cTEC, le thymocyte deviendra un thymocyte SP CD8⁺ et une interaction TCR/CMH de classe II de la cTEC entraînera la différenciation du DP en SP CD4⁺.

De plus, lors de la sélection positive, les cellules épithéliales vont interagir avec les thymocytes et en fonction de l'affinité du TCR des DP avec le complexe CMH/peptide de la cTEC, le thymocyte va recevoir un signal de survie ou non. Le thymocyte sélectionné positivement doit en effet être capable de reconnaître le soi. Ce phénomène entraîne la mort par apoptose de 90 à 95 % des thymocytes qui ne reconnaissent pas le soi (Huesmann et al., 1991).

III.E- Sélection négative des thymocytes

La sélection négative consiste à éliminer (par délétion clonale) les thymocytes reconnaissant trop fortement les peptides du soi (associés au CMH) pour ne pas générer de lymphocytes T matures autoréactifs. Comme pour la sélection positive, le TCR va interagir avec des CPA et selon l'affinité du complexe, la cellule sera conservée ou éliminée par apoptose. La raison pour laquelle l'interaction TCR/CMH-peptide permet à une cellule d'être reconnue positivement ou négativement reste un sujet d'étude. Nous savons que c'est le TCR qui reconnaît son ligand avec une affinité plus ou moins forte et qu'une très faible augmentation de cette affinité permet l'induction de signaux de sélection positive à des signaux de sélection négative (Daniels et al., 2006). Ainsi un changement de conformation pourrait être responsable de ces différences. Risueno et al. ont montré qu'un changement de conformation du TCR pourrait refléter des différences dans l'avidité ligand/récepteur et ainsi différencier la sélection négative de la sélection positive en entraînant des voies de signalisation différentes (Risueno et al., 2006). Par exemple, la protéine ERK1/2 est exprimée à la membrane pour les signaux négatifs et est présente dans le cytoplasme pour les thymocytes sélectionnés positivement (Daniels et al., 2006).

Si on considère que la sélection négative permet d'éliminer tous les thymocytes autoréactifs, cela sous-entend que l'ensemble des antigènes du soi doit être exprimé dans le thymus. Certains antigènes du soi sont ubiquitaires, ils sont donc exprimés dans le thymus. D'autres antigènes, spécifiques de certains tissus, doivent migrer dans le thymus pour être présentés. Enfin, certains antigènes sont exprimés très faiblement et n'entraînent pas de réponse auto-

immune même en l'absence d'expression thymique. Les antigènes spécifiques de tissus appelés TSA (tissue-specific antigens) proviennent de la quasi-totalité des organes du corps (Derbinski et al., 2001) et sont des éléments clés pour l'induction de la tolérance centrale.

La sélection négative semble se dérouler principalement dans la médulla et est induite à la fois par les cellules dendritiques et les mTEC (Figure 8). En effet, l'étude de souris déficientes pour les mTEC montre qu'un développement anormal de ces cellules est souvent corrélé à une auto-immunité (Naquet et al., 1999). De plus, en absence de CD, la délétion clonale est moins efficace (Gallegos and Bevan, 2004). Par la technique de puces à ADN, Derbinski et al. ont montré que les mTEC étaient les principales cellules du thymus capables d'exprimer les TSA (Derbinski et al., 2005). Ces cellules peuvent donc réaliser la sélection négative en interagissant directement avec les thymocytes. Les cellules dendritiques ne présentent pas directement les TSA mais sont capables de réaliser la sélection des T autoréactifs aux TSA par présentation croisée. Les molécules du CMH de classe I, du CMH de classe II, le marqueur d'activation CD40 et les molécules de costimulation CD80/CD86 exprimés à la surface de ces 2 types cellulaires (CD et mTEC) interviennent dans l'élimination des T autoréactifs (Buhlmann et al., 2003; Foy et al., 1995; Gao et al., 2002b).

Un autre acteur clé de la sélection négative est la protéine AIRE (pour AutoImmune REgulator). L'absence d'expression de cette protéine est responsable d'une maladie auto-immune récessive (APS-1 pour autoimmune polyglandular syndrome type 1 ou APECED pour Auto-immune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy) touchant divers organes (Nagamine et al., 1997; Perheentupa, 2002). La protéine AIRE est exprimée principalement par les mTEC et aussi par les DC dans le thymus et de façon moindre dans les ganglions lymphatiques et la rate (Anderson et al., 2002; Blechschmidt et al., 1999; Heino et al., 2000; Zuklys et al., 2000). L'expression de AIRE dans les mTEC est corrélée à la capacité de ces cellules à exprimer les TSA ; ainsi, les souris KO pour le gène AIRE possèdent une expression réduite des TSA associée à une déficience dans la délétion clonale des LT autoréactifs et par conséquent à une auto-immunité (Anderson et al., 2002; Liston et al., 2003). Seule une partie des mTEC exprime AIRE et par conséquent présente la majorité des TSA (Derbinski et al., 2005). L'expression de certains TSA n'est pas corrélée à AIRE, suggérant qu'il existe certainement d'autres protéines du même type que AIRE dans le thymus.

Suite à cette sélection thymique, les thymocytes devenus LT naïfs $CD8^+$ ou $CD4^+CD25^-$ sortent du thymus pour devenir les acteurs de la réponse immunitaire.

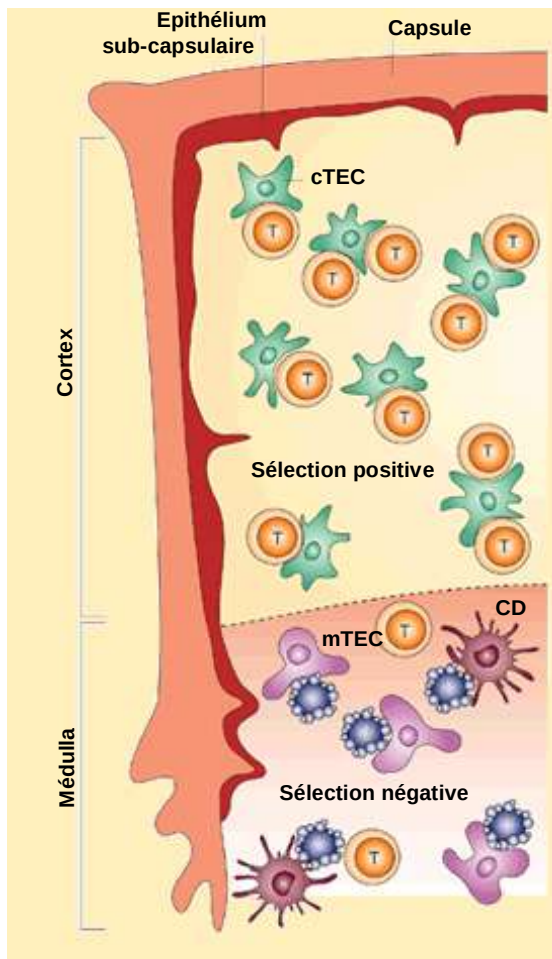


Figure 8 : La sélection des LT

La sélection positive a lieu dans le cortex. Elle se fait par l'interaction des cTEC présentant le CMH du soi avec les thymocytes. Seuls les thymocytes reconnaissant le soi seront conservés. La seconde sélection, appelée sélection négative se fait principalement dans la médulla. Dans cette seconde sélection, les thymocytes conservés reconnaissent les antigènes du soi portés par les CD et les mTEC avec une faible affinité. Les thymocytes reconnaissant le complexe CMH/antigène du soi avec une forte affinité sont éliminés car ces LT pourraient entraîner une réponse immune contre le soi en périphérie. *D'après Palmer, 2003.*

III.F- Génération des Treg

Comme expliqué dans la partie suivante (partie IV de cette introduction), les lymphocytes T régulateurs naturels (appelés Treg) sont des cellules T ayant un rôle clé dans le maintien de la tolérance périphérique. Comme les autres cellules T, ces cellules sont générées dans le thymus mais elles possèdent une fonction inverse. En effet, ces cellules T ne vont pas induire une réponse immune effectrice contre des antigènes étrangers en périphérie mais elles vont induire une réponse régulatrice/suppressive en neutralisant les lymphocytes T autoréactifs. Ces Treg sont spécifiques des antigènes du soi (Apostolou et al., 2002). Comme les Treg sont générés dans le thymus, la question est de savoir comment ces Treg sont sélectionnés pour reconnaître les antigènes du soi et qu'est ce qui les différencie des autres thymocytes.

Les Treg sont des cellules $CD4^+$ comportant un TCR $\alpha : \beta$ (comme les T conventionnels). Dès

leur différenciation dans le thymus, ces cellules expriment le marqueur de surface CD25 et le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box P3), spécifique des Treg (Fontenot et al., 2005b). D'autres marqueurs, tels que GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor), CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) ou encore CD28 sont également présents sur les Treg. Le TCR des Treg possède une très forte affinité pour les peptides du soi, ces cellules sont donc réactives au soi contrairement aux LT conventionnels (Hsieh et al., 2006; Jordan et al., 2001) et ne semblent donc pas sensibles à la délétion clonale (sélection négative) (van Santen et al., 2004).

L'ontogenèse des Treg se réalise dans le thymus mais la cinétique d'export des Treg semble retardée par rapport à celle des LT conventionnels (Fontenot et al., 2005a). Ceci peut s'expliquer notamment par la nécessité d'obtenir des Treg matures, capables d'exprimer Foxp3, CD28, GITR et CTLA4. L'expression de Foxp3 semble avoir lieu principalement dans la médulla suite à l'interaction CMH/TCR et à la stimulation du TCR par le CD28 (Fontenot et al., 2005a). De même, ces interactions permettent l'augmentation de l'expression de GITR et de CTLA4 par les thymocytes/futurs Treg (Tai et al., 2005).

Malgré l'expression tardive de Foxp3 (dans la médulla), les thymocytes semblent destinés précocement à devenir des Treg. En effet, deux études récentes utilisant des souris transgéniques comportant une substitution du gène codant pour la protéine Foxp3 par celui codant pour la protéine GFP (ou pour une protéine de fusion GFP/Foxp3 non fonctionnelle) (Gavin et al., 2007; Lin et al., 2007) montrent que les cellules T GFP positives ont le phénotype typique des Treg, exprimant CD25, GITR et CTLA4. Comme les Treg « classiques », ces cellules dépendent de l'IL-2. Cependant, elles n'ont pas d'activité suppressive, suggérant l'importance de Foxp3 dans la fonction des Treg. Ces résultats montrent que l'ontogenèse des Treg est indépendante de la présence ou de l'expression de Foxp3.

En ce qui concerne la sélection des thymocytes/futurs Treg, une première sélection positive semble avoir lieu au niveau du cortex suite à l'interaction entre les thymocytes et les cTEC exprimant le CMH et les peptides du soi (Bensinger et al., 2001). L'utilisation d'un modèle murin contenant des cTEC exprimant un seul antigène montre que dès l'étape de sélection positive dans le cortex, les futurs Treg ayant un TCR reconnaissant spécifiquement l'antigène vont être préférentiellement conservés. A ce stade, la diversité des TCR exprimés par les thymocytes est pourtant très forte. Cette sélection apparaît donc extrêmement spécifique et il est probable que les thymocytes/futurs Treg sélectionnés reçoivent alors des signaux de survie

(Ribot et al., 2007).

Cette sélection positive au niveau du cortex n'exclut pas la possibilité d'une deuxième étape de sélection dans la médulla. Ceci est en accord avec le faible pourcentage de Treg matures (exprimant CD25, Foxp3 ou GITR) présent dans le cortex, suggérant une maturation médullaire des Treg. Différentes équipes ont montré qu'une deuxième sélection positive pouvait avoir lieu dans la médulla, soit par les mTEC, soit par les cellules dendritiques et selon deux mécanismes différents.

Pour le modèle faisant intervenir les mTEC, Aschenbrenner et al. ont montré le développement de Treg spécifiques d'un antigène (HA) en présence de mTEC exprimant HA sous contrôle de AIRE dans un modèle de souris transgéniques pour HA. Ces souris sont capables de créer des Treg spécifiques de HA à partir des mTEC uniquement (en absence de CD) (Aschenbrenner et al., 2007). Selon cette étude, AIRE serait impliqué à la fois dans la sélection négative et aussi dans la génération des Treg.

Ces résultats sont cependant controversés par des travaux antérieurs montrant qu'AIRE ne serait pas impliqué dans la sélection des Treg en utilisant des modèles murins déficients pour l'expression de AIRE. Ainsi, Anderson et al. et Kuroda et al. ont montré que les souris déficientes pour AIRE possédaient une quantité de Treg similaire aux souris normales, aussi bien en valeur absolue qu'en pourcentage de cellules T. De plus, les Treg des souris AIRE^{-/-} exprimaient le même niveau d'expression de Foxp3 et une activité suppressive similaire (Anderson et al., 2005; Kuroda et al., 2005).

Les CD peuvent également permettre la sélection positive des Treg au niveau de la médulla. La médulla comporte les corpuscules de Hassal composés de mTEC. Les corpuscules de Hassal ont diverses fonctions, notamment l'élimination des thymocytes conventionnels autoréactifs, la maturation des thymocytes sélectionnés ou encore la sécrétion de cytokines comme la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP en anglais) (Liu et al., 2007). Cette cytokine, de la famille de l'IL7 est capable d'activer les CD en périphérie et aussi dans le thymus. Les CD activées par la TSLP dans le thymus seraient capables de sélectionner positivement les Treg et de leur apporter un signal de survie. Ainsi les CD activées par la TSLP induisent l'expansion de thymocytes CD4⁺CD8⁻CD25⁻ et environ 50% de ces cellules expriment ensuite le marqueur Foxp3 (Watanabe et al., 2005).

Ces deux modèles de sélection positive dans la médulla ne sont pas mutuellement exclusifs.

IV. La tolérance périphérique

IV.A- Définition de la tolérance périphérique

La tolérance périphérique est un mécanisme de protection de l'organisme utilisé pour pallier les défauts de la tolérance centrale. En effet, la tolérance centrale ne permet pas d'éliminer tous les LT autoréactifs du thymus, certains de ces LT vont se retrouver en périphérie, la tolérance périphérique permet leur élimination et assure ainsi une protection supplémentaire à l'organisme contre le développement des maladies auto-immunes.

Les mécanismes de tolérance périphérique décrits ci-dessous sont largement utilisés pour induire une tolérance principalement dans des modèles de maladies auto-immunes et de transplantation.

IV.B- Mécanismes impliqués dans la tolérance périphérique

IV.B.1. La délétion clonale

La délétion clonale consiste à éliminer les LT par apoptose aussi bien dans le thymus comme décrit précédemment qu'en périphérie. La mort des LT peut être due à l'absence de signaux de survie comme par exemple, l'absence d'IL-2 (Steller, 1995). Une autre voie d'induction de la délétion clonale est l'activation trop forte des LT, notamment par une forte quantité d'antigènes ou d'anticorps anti-CD3. Cette forte activation est responsable de la « mort cellulaire par activation » ou AICD (Activation Induced Cell Death en anglais). L'AICD fait intervenir principalement la voie Fas/Fas Ligand (Brunner et al., 1995). Les essais cliniques réalisés chez l'homme ont montré l'efficacité de l'anti-CD3 pour le traitement de rejet de transplantation rénale (Woodle et al., 1999).

Les cellules responsables de la délétion clonale en périphérie sont les CD (comme mentionné dans le paragraphe IV.C.2).

IV.B.2. L'anergie

L'anergie est l'état de non-réponse des LT suite à une stimulation antigénique. Le LT anergique est alors réfractaire à une nouvelle stimulation (Lechler et al., 2001; Schwartz, 1996). Ces cellules sont incapables de proliférer *in vitro* notamment car elles ne sécrètent plus d'IL-2, l'ajout de cette cytokine *in vitro* permet alors leur prolifération (Essery et al., 1988).

L'anergie est due à l'absence de signaux de costimulation. Comme décrit dans le chapitre II-B, l'activation du LT par les CPA est réalisée par deux signaux principaux. Le premier signal

consiste en la reconnaissance du peptide antigénique présenté sur le CMH du soi (interaction TCR/CMH-peptide) et le deuxième signal, appelé signal de costimulation consiste dans la plupart des cas à l'interaction des molécules de costimulation des CD (CD80/CD86) avec le récepteur CD28 du LT. Dans des contextes d'anergie, les LT reçoivent le premier signal d'activation mais pas le second signal.

L'anergie des LT peut être induite par des CD n'exprimant pas les molécules de costimulation CD80/CD86 ou en utilisant des molécules capables de bloquer l'activation du LT. Ainsi, l'administration d'anticorps anti-CD80 et anti-CD86 permet également de prolonger la survie d'une allogreffe, notamment chez le macaque (association avec un traitement au sirolimus) (Birsan et al., 2003).

Une autre possibilité pour induire l'anergie des LT est de bloquer l'interaction des molécules de costimulation avec le récepteur CD28 du LT. De façon naturelle, l'interaction du récepteur CTLA4 exprimé par le LT avec les molécules de costimulation CD80 ou CD86 exprimées par les CPA entraîne un signal d'inhibition qui bloque l'activation du LT, permettant la régulation de la réponse immune lorsque le pathogène est éliminé (Lee et al., 1998). Dans le but d'induire une tolérance, l'utilisation d'une protéine de fusion CTLA4-Ig permet de bloquer l'interaction des molécules de costimulation CD80/CD86 avec le récepteur CD28 du LT et induit ainsi l'anergie des LT environnants. L'efficacité de cette protéine a été mise en évidence dans des modèles d'auto-immunité (Dall'Era and Davis, 2004), de transplantation (Guillot et al., 2003) ou de transfert de gènes à l'aide de vecteurs rétroviraux (Puppi et al., 2004).

IV.B.3. L'ignorance

L'ignorance est le mécanisme par lequel les LT n'interagissent pas avec les CD présentant le peptide antigénique (Miller et al., 1990). Cette ignorance peut s'expliquer par la localisation des antigènes. En effet, il existe des sites immunoprivilégiés dans lesquels les cellules immunitaires n'ont pas accès, comme le cerveau ou la rétine. L'absence de CPA dans ces sites ne permet pas la reconnaissance et la présentation des antigènes étrangers sur leurs molécules du CMH. Dans ces conditions, les LT ne sont pas activés par le complexe CMH-peptide et par conséquent il n'y a pas de développement de réponse immunitaire (Barker and Billingham, 1977). L'autre possibilité d'induction d'une ignorance est la présence de l'antigène en très faible quantité. Dans ces conditions, l'antigène n'est alors pas capté, ni présenté par les CPA et ainsi les LT ne développent pas de réponse immune contre ces antigènes (Kurts et al., 1999).

IV.B.4. La suppression

Ce mécanisme d'induction de tolérance est le plus efficace. La suppression est réalisée principalement par les cellules T régulatrices. Ces cellules sont présentes dans l'organisme pour réguler ou supprimer les réponses auto-immunes et allo-immunes comme décrit ci-dessous. Les CD jouent également un rôle primordial dans la suppression car ces cellules sont capables d'expander les cellules T régulatrices.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'induction de la tolérance à la fois à partir des cellules T régulatrices mais aussi des CD spécifiques, qualifiées de CD tolérogènes.

IV.C- Les cellules T régulatrices

IV.C.1. Différentes populations de T régulatrices (Shevach, 2006)

Il existe plusieurs populations de cellules T régulatrices.

Les cellules T régulatrices les plus étudiées sont celles dérivées des LT CD4⁺. Dans cette catégorie de T régulateurs CD4⁺ se trouve les **Treg naturels, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺** qui sont générés naturellement au niveau du thymus comme décrit dans la partie III.F. de l'introduction générale. A l'inverse, il existe des LT régulateurs qui ne sont pas produits dans le thymus, ces LT régulateurs sont qualifiés de « LT régulateurs inductibles ». L'induction de LT régulateurs peut se faire à partir de précurseurs T CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ lors de la stimulation du TCR en présence de TGFβ, ces LT sont appelés **Th3** (Chen et al., 2003; Fantini et al., 2004). L'action suppressive de ces Treg induits est contact dépendant et permet notamment *in vivo* d'inhiber l'expansion des LT CD4⁺ activés. Une autre population de cellules T régulatrices inductibles sont les **Tr1** (pour T régulateurs de type 1). Ces Tr1 sont générés *ex vivo* à partir de LT CD4⁺ en présence d'IL-10 et d'un antigène. La production de Tr1 spécifiques d'antigène à l'aide de CD présentant un antigène étranger est très efficace. Les Tr1 agissent de façon contact dépendant et en sécrétant de l'IL-10 (et peut-être aussi du TGFβ) (Roncarolo et al., 2006).

Il existe également différentes populations de LT régulateurs exprimant le CD8 : i) les Treg CD8⁺ activés suite à leur interaction avec un CMH de type I portant un antigène, ii) les LT CD8⁺ stimulés par l'IL-10 et produisant cette cytokine anti-inflammatoire et iii) les LT CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺.

Il existe enfin des LT régulateurs double négatifs n'exprimant ni le CD4, ni le CD8 (Fischer et al., 2005).

Dans le cadre de ce manuscrit, seuls les Treg naturels $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ vont être étudiés.

IV.C.2. Mode d'action des Treg naturels

Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans l'activité suppressive des Treg naturels. Les deux principaux sont **i)** l'inhibition des Treg par interaction directe de ces cellules avec des LT effecteurs et **ii)** la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires par les Treg.

i) Le contact cellulaire direct

Après la stimulation des Treg naturels (stimulation du TCR), ces cellules suppriment la prolifération des LT effecteurs en inhibant la transcription et la sécrétion d'IL-2 par les LT effecteurs. En absence d'IL-2, les LT effecteurs ne sont pas capables de se multiplier (Dieckmann et al., 2002; Golshayan et al., 2007; Jiang et al., 2003; Piccirillo and Shevach, 2001; Thornton and Shevach, 1998). Des études menées *in vitro* indiquent que le contact direct des Treg avec les LT effecteurs est nécessaire. Ainsi, la culture de LT effecteurs en présence de surnageants provenant de cultures de Treg activés ne permet pas d'induire une suppression de la prolifération des LT activés (Takahashi et al., 1998). De plus, le blocage du contact direct des cellules entre des Treg et des LT $CD4^+CD25^-$ *in vitro* par l'utilisation de membrane semi-perméable (transwell) entraîne une forte diminution de la capacité des Treg à induire une suppression, suggérant que les Treg agissent de façon contact cellulaire dépendante (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998).

ii) L'action des cytokines

Deux cytokines synthétisées par les Treg semblent principalement impliquées dans l'activité suppressive des Treg, l'IL-10 et le TGF- β (Asseman et al., 1999; Hara et al., 2001; Nakamura et al., 2004; Nakamura et al., 2001). L'effet de ces cytokines a été mis en évidence *in vivo* chez la souris dans un modèle de colite induite chez la souris SCID par l'injection de LT $CD4^+$ (maladie auto-immune). Dans ce modèle, l'injection de LT $CD4^+CD25^+$ permet de contrôler la colite (Liu et al., 2003). Cette action est inhibée lors de l'administration d'anticorps anti-récepteur de l'IL-10 (Asseman et al., 1999; Liu et al., 2003) ou d'anticorps anti-TGF- β (Liu et al., 2003; Powrie et al., 1996). De plus, l'utilisation de Treg provenant de

souris déficientes pour l'IL-10 ne permet pas de contrôler le développement de la colite (Asseman et al., 1999).

A l'inverse, certaines études montrent dans des modèles de maladies auto-immunes que l'activité suppressive des Treg est indépendante de l'IL-10 (Shevach, 2002) et du TGF- β (Piccirillo et al., 2002).

Une autre voie permettant la suppression par les Treg est la modulation des CD. Bien que certaines études menées *in vitro* suggèrent que la suppression des Treg serait indépendante des CD (Piccirillo and Shevach, 2001), d'autres études montrent que les Treg pourraient bloquer l'activation des LT effecteurs induite par les CD. Il a été montré par exemple que les Treg étaient capables de diminuer l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 présents sur les CD et ainsi de favoriser l'anergie des LT qui interagissent avec les CD (Cederbom et al., 2000).

Ces résultats montrent que le mécanisme impliqué dans l'activité suppressive des Treg n'est pas clairement identifié. Il faut noter que les travaux menés *in vitro* (notamment dans l'hypothèse d'une suppression par contact direct) ne sont pas forcément le reflet des mécanismes impliqués *in vivo*. Il est envisageable que plusieurs mécanismes interviennent dans la fonction suppressive des Treg *in vivo*.

IV.C.3. Exemples d'action des Treg

i) Rôle des Treg dans l'auto-immunité

L'absence des Treg ou de l'expression de FoxP3 dans des modèles animaux est liée à des désordres immuns importants montrant ainsi l'importance de ces cellules dans la protection contre l'auto-immunité (Itoh et al., 1999; Sakaguchi, 2005).

Différentes études menées sur des souris diabétiques montrent que l'injection de Treg amplifiés *ex vivo* permet d'inhiber le développement du diabète chez la souris. De plus, les auteurs montrent que l'utilisation de Treg amplifiés dans des conditions spécifiques d'un antigène (le BDC) était **plus efficace** que des Treg amplifiés de façon polyclonale. Le BDC est un antigène exprimé naturellement dans les granules des cellules β des îlots pancréatiques (Masteller et al., 2005; Tang et al., 2004; Tarbell et al., 2004). Cependant, dans une optique d'application à l'homme, l'utilisation préventive des Treg ne suffit pas, une efficacité curative semble plus pertinente. Une étude récente a montré que l'injection de Treg sur des souris atteintes de diabète à des stades précoces permettait d'induire une tolérance et ainsi de contrer la pathologie (Tarbell et al., 2007). Les auteurs montrent que la tolérance est maintenue grâce

à la génération *in vivo* de nouveaux Treg exprimant Foxp3. En ce qui concerne les souris diabétiques à des stades avancés de la maladie, l'injection de Treg permet de retarder le développement de la pathologie mais ne la traite pas (Tarbell et al., 2007).

Des résultats similaires de prévention ont été obtenus dans d'autres modèles de maladies auto-immunes, comme dans le modèle murin de sclérose en plaques (EAE) (Hori et al., 2002).

ii) Rôle des Treg dans la transplantation

Les études menées en transplantation montrent souvent que la survie du greffon suite à l'administration de diverses drogues ou de CD tolérogènes fait intervenir le recrutement de Treg. En absence de Treg, la survie du greffon semble moins certaine. Cependant, peu d'études montrent de façon directe l'effet d'une injection de Treg dans un modèle de transplantation réalisé sur des souris immunocompétentes.

Ainsi, dans un modèle de greffe de peau chez la souris, les souris (H-2^k) déplétées en LT reçoivent une greffe de peau allogénique (donneur H-2K^{b/k}). L'administration de LT CD4⁺CD25⁻ syngéniques la veille de la transplantation entraîne le rejet de greffe alors que si les LT CD4⁺CD25⁻ sont injectés en présence de Treg syngéniques spécifiques de H-2K^b, il y a une survie des greffons dans 75% des animaux (Golshayan et al., 2007). Si la greffe de peau provient d'un autre animal (non H-2K^{b/k}), il n'y a pas d'effet des Treg (spécifiques de H-2K^b).

L'efficacité des Treg dans des modèles de greffe d'organes « solides » a été montrée lorsque les Treg sont injectés avec un agent immunosuppresseur, tel que le tacrolimus dans un modèle de transplantation hépatique chez le rat (Pu et al., 2007). Une alternative consiste à injecter des Treg syngéniques spécifiques du donneur en présence de la moelle osseuse du donneur dans un modèle murin de transplantation cardiaque (Joffre et al., 2008). Dans ces deux modèles, l'action seule des Treg dans les greffes d'organes « solides » est très peu efficace.

iii) Rôle des Treg dans la GVHD

La transplantation de moelle osseuse permet de reconstituer un pool de cellules immunitaires viables dans des individus immunosupprimés. Cette transplantation permet d'apporter les précurseurs de la moelle osseuse et également des LT, nécessaires pour l'efficacité de la transplantation, la reconstitution immune et l'effet anti-leucémique dans les cas de leucémies notamment. Cependant, ces LT du donneur entraînent également le développement de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD pour Graft Versus Host Disease). Des études menées chez la souris par deux équipes différentes, Cohen et al. et Taylor et al., ont montré

que la déplétion du transplant de moelle osseuse en Treg favorisait le développement de GVHD indiquant la fonction indispensable de ces cellules (Cohen et al., 2002; Taylor et al., 2002). A l'inverse, l'injection de Treg empêche le développement de GVHD (Cohen et al., 2002; Hoffmann et al., 2002; Taylor et al., 2002). L'implication de l'IL-10 dans l'activité suppressive des Treg dans la GVHD a été montré en injectant des Treg isolées à partir d'animaux IL-10^{-/-}. Dans ces conditions, les Treg ne préviennent pas le développement de GVHD (Hoffmann et al., 2002).

Enfin, de façon intéressante, les Treg inhibent le développement de la GVHD mais pas l'effet anti-leucémique. Ces deux phénomènes sont pourtant dus aux LT du donneur (Edinger et al., 2003; Trenado et al., 2003).

iv) Rôle des Treg en thérapie génique

La réalisation de cette thèse a reposé sur l'observation d'une réponse immune contre le produit du transgène suite à une injection d'AAVr dans le muscle de macaque. Cette réponse immune entraîne la lyse des cellules transduites par le vecteur. L'étude réalisée par Gross et al. s'est placée dans un contexte similaire (Gross et al., 2003). En effet, suite à l'injection d'AAVr codant pour HA (Hémagglutinine) dans le muscle de souris naïves, une réponse immunitaire contre le transgène s'est développée et a entraîné la destruction des cellules transduites par le vecteur (cellules HA positives). Cependant, l'injection de Treg spécifiques de HA (isolées sur les souris comportant des LT TCR HA) permet de diminuer de façon importante la réponse immune contre HA développée par la souris. A l'inverse, l'injection de Treg non spécifiques de HA n'a pas d'effet sur le développement de la réponse immunitaire contre le transgène (Gross et al., 2003).

L'obtention d'une inhibition partielle du développement de la réponse immunitaire suite à l'injection de Treg spécifiques d'antigène dans un modèle de transfert de gènes est un résultat prometteur dans la stratégie d'induction d'une tolérance au produit du transgène à l'aide de Treg dans des modèles de thérapie génique.

IV.D- Les CD tolérogènes

IV.D.1. Différence entre les CD immunogènes et tolérogènes

Les différentes populations de CD ont été décrites précédemment dans le chapitre II.B. Cependant, les CD impliquées dans les mécanismes d'immunité et de tolérance sont différentes.

De façon générale, les CD immatures et les CD matures sont connues pour être respectivement tolérogènes et immunogènes. Le caractère « mature » d'une cellule dendritique est souvent défini phénotypiquement par une forte expression des molécules de CMH et des marqueurs CD80, CD86, CD40 et CD83. Des études réalisées chez l'homme ont ainsi montré que l'injection de CD immatures chargées avec le peptide MP (influenza matrix peptide) ou la KLH (keyhole limpet hemocyanine) en sous-cutané entraînait un effet tolérogène spécifique des antigènes (inhibition des LT_C et génération de cellules T régulatrices) (Dhodapkar et al., 2001) alors que l'injection de CD matures présentant ces peptides entraîne une réponse immunitaire cytotoxique (Dhodapkar et al., 1999).

Cependant, certains éléments indiquent que les cellules tolérogènes ne sont pas « entièrement » immatures (pour revue, (Reis e Sousa, 2006)). Trois exemples peuvent être énoncés : **i)** la tolérance est spécifique d'antigène, la CD tolérogène doit donc présenter le peptide antigénique sur ces molécules du CMH pour activer les Treg et entraîner l'anergie des LT effecteurs. Or, par définition, les CD immatures capturent mais ne présentent pas l'antigène. **ii)** Comme mentionné précédemment dans le paragraphe IV.B.2, l'anergie des LT peut se faire par l'interaction des molécules de costimulation de la CD avec le récepteur CTLA4 du LT. De la même façon, les CD immatures expriment faiblement les molécules de costimulation, dans ces conditions, l'interaction CD/LT est alors difficile. L'absence de la présentation antigénique ou des marqueurs « tolérogènes » peut empêcher l'interaction du LT avec la CD, il n'y a alors ni tolérance, ni immunité. **iii)** Des études menées ces dernières années ont montré que l'induction des Treg pouvait se faire par les CD matures (Menges et al., 2002; Verhasselt et al., 2004). Certaines CD matures pourraient donc également être impliquées dans des mécanismes de tolérance. A partir de ces observations, Lutz et Schuler ont développé une notion de CD tolérogènes semi-matures, ces CD sont capables de migrer des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes en exprimant les molécules du CMH, les molécules de costimulation, produisant peu de cytokines inflammatoires (pas d'IL12) et sécrétant de l'IL-10 (Lutz and Schuler, 2002).

Il existe un problème de terminologie car la classification des CD a été réalisée dans le contexte d'une immunité et non dans un contexte de tolérance. La différence entre CD tolérogènes et immunogènes consiste peut être dans la différence de stimuli reçus. Ainsi, en présence de stimuli tels que le LPS, les motifs CpG, les ARN double brin, les cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IFN γ) ou des signaux T (CD40L), les DC vont maturer et produire des

cytokines inflammatoires (IL12 et IFN γ) pour initier une réponse de type T_H1 (Schulz et al., 2000; Vieira et al., 2000). A l'inverse, en présence de stimuli anti-inflammatoires tels que l'IL10, les CD vont rester sous une forme immature (mais pas complètement) et favoriser une réponse de type régulatrice. L'environnement joue donc un rôle primordial dans l'activation des CD et par conséquent dans le type de réponse immunitaire.

Le caractère tolérogène des CD ne semble pas médié exclusivement par leur phénotype mais également par leur environnement.

IV.D.2. Mode d'action des CD

Les CD tolérogènes agissent par deux voies principales : l'anergie des LT naïfs ou effecteurs et l'induction de cellules T régulatrices. Le rôle des CD dans l'induction de la tolérance centrale a été évoqué dans la partie précédente (partie III).

i) L'anergie des LT autoréactifs et cytotoxiques

L'interaction des CD tolérogènes avec les LT par le complexe TCR/CMH-peptide en absence de signaux de costimulation empêche l'activation des LT et entraîne une anergie des LT comme décrit précédemment (IV.B.2) (Schwartz, 2003).

Des études *in vitro* ont mis en évidence des CD régulatrices capables de stimuler des LT naïfs (visibles par l'expression de CD25 par les LT et la sécrétion d'IFN γ et d'IL-2) mais empêchant **la prolifération de LT cytotoxiques** (Qian et al., 2007; Zhang et al., 2004b). Ce nouveau rôle des CD tolérogènes ne fait pas intervenir les Treg et pourrait permettre de stopper la prolifération des LT_C lorsque la réponse immunitaire est finie (élimination du pathogène et des cellules infectées).

ii) La capacité de générer et d'expandre des cellules T régulatrices

L'expansion des Treg par des CD sera décrite ultérieurement. Cette expansion peut se faire par des CD immatures ou matures et être spécifiques d'antigènes du soi ou d'antigènes étrangers.

En contrepartie de la stimulation des Treg par les CD, les Treg sont également capables de stimuler la différenciation de CD tolérogènes. Ainsi, dans un modèle de tolérance à une greffe, les auteurs montrent la capacité des Treg à induire la différenciation de CD tolérogènes à partir de précurseurs de la moelle osseuse *in vitro* (Min et al., 2003).

IV.D.3. Exemples d'action des DC tolérogènes

i) Rôle des CD tolérogènes dans les réponses auto-immunes

Dans un modèle murin d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), la maladie est provoquée par l'injection sous cutanée du peptide MOG. Dans ce modèle, les injections répétées de CD semi-matures présentant le peptide auto-réactif MOG en intra-veineuse entraînent une protection contre la maladie. A l'inverse, l'utilisation de CD matures (cultivées en présence de LPS et d'anti-CD40) n'a pas d'effet protecteur contre l'EAE. Dans cette étude, la présentation du peptide par les CD semi-matures est permise suite à l'incubation des CD avec le peptide MOG (Menges et al., 2002). L'injection de CD ne présentant pas le peptide antigénique ne permet pas de protéger l'animal contre le développement d'EAE, l'induction de la tolérance est donc spécifique d'antigène. De plus, l'efficacité des CD dans la prévention de la maladie est corrélée à la génération de cellules T régulatrices (spécifiques de l'auto-antigène) *in vivo* (Menges et al., 2002).

De même, dans un modèle de souris NOD (Non Obese Diabetic), l'administration répétée de CD en intraveineuse permet d'empêcher le développement de la maladie (Feili-Hariri et al., 1999). L'étude des cytokines secrétées par les LT provenant des animaux injectés avec les CD et stimulés *in vitro* à l'aide d'un anti-TCR montre une prévalence de la différenciation des LT en T_H2 dans les animaux traités avec les CD (forte production d'IL-5, d'IL-4 et d'IL-10). Dans ce contexte, la réponse immune cytotoxique médiée par les LT_H1 et responsable de la pathologie est peu présente (Feili-Hariri et al., 2002). Les CD favoriseraient ainsi le développement des LT_H2 au détriment des LT_H1.

ii) Rôle des CD tolérogènes dans les greffes

Dans des modèles de transplantation, l'injection de CD tolérogènes avant la greffe permet de prolonger la survie du greffon par rapport à des animaux non-injectés mais ne permet pas d'induire une tolérance au greffon. Ces résultats sont obtenus aussi bien dans des modèles de transplantation d'organes vascularisés comme le cœur ou des transplantations non-vascularisés comme les îlots pancréatiques (Fu et al., 1996; Rastellini et al., 1995).

L'absence de survie indéfinie du greffon, peut être due à une maturation tardive des CD injectées qui entraîne l'activation du CD40 de ces CD. L'interaction du CD40 de la CD avec le CD40L du LT receveur entraîne le développement d'une réponse immunitaire. Cette hypothèse a été confirmée par des études montrant que le blocage de la voie CD40/CD40L par un anticorps anti-CD40L en parallèle d'une injection de CD tolérogènes permet d'induire

une prolongation de survie de la greffe (Lu et al., 1997) voire l'induction d'une tolérance (survie de la greffe supérieure à 100 jours) chez la souris (Niimi et al., 2001). Des expériences de transfert de splénocytes des animaux tolérants à des nouvelles souris greffées montrent une induction de tolérance chez les souris traitées suggérant la génération de Treg spécifiques du donneur (Niimi et al., 2001).

Des études similaires ont été réalisées dans un modèle de transplantation cardiaque développé chez le rat dans l'unité INSERM U643. Dans ce modèle, des rats LEWIS 1A reçoivent une transplantation cardiaque provenant d'un rat LEWIS 1W (de CMH différent) dans l'abdomen. La survie du greffon est suivie quotidiennement par palpation de l'abdomen. Le rejet du greffon correspond à l'arrêt des battements du cœur greffé. En absence de traitement, le rejet apparaît environ 6 jours après la transplantation. Les travaux de l'équipe de Cristina Cuturi ont montré que l'injection de CD immatures dérivées de la moelle osseuse syngéniques (et non du donneur, comme réalisé habituellement) la veille de la transplantation permettait de prolonger la survie du greffon à 22,5 jours en moyenne (Pêche et al., 2005). De plus, le traitement des animaux avec les CD immatures et **le LF15-0195** (analogue de la déoxysperguanine) permet d'induire une tolérance à l'allogreffe cardiaque chez ces animaux (Beriou et al., 2005; Chiffolleau et al., 2002).

Contexte et objectifs de la thèse

I. Etudes préliminaires

I.A- Intérêt du muscle comme organe cible

Le transfert de gènes dans le muscle est attractif car le muscle squelettique est un tissu abondant et facilement accessible. De plus, la biodistribution du transgène est théoriquement limitée comparé à une injection intraveineuse. Des études menées chez la souris ont montré que l'AAV1r, l'AAV7r, l'AAV6r et l'AAV8r permettent une transduction rapide et efficace du muscle squelettique (Blankinship et al., 2004; Chao et al., 2000; Gao et al., 2004 ; Gao et al., 2002a; Nakai et al., 2005; Wang et al., 2005c). L'AAV8r semble particulièrement efficace dans cet organe (Cao et al., 2007b).

Dans le cadre de cette thèse, le muscle a été utilisé pour développer un système de régulation dans un contexte de transfert de gènes.

I.B- Intérêt des gènes rapporteurs, l'exemple de l'EPO

Des gènes rapporteurs comme l'alpha anti-trypsine humaine (haAT) (Song et al., 2001; Song et al., 1998) et l'érythropoïétine (EPO) (Bohl et al., 1998; Kessler et al., 1996; McCarty et al., 2001; Snyder et al., 1997; Vincent-Lacaze et al., 1999) ont été particulièrement utilisés dans des modèles murins de transfert de gène. Leurs produits sécrétés ont l'avantage de pouvoir être titrés en périphérie par un simple prélèvement sanguin. L'EPO a également permis d'étudier les vecteurs AAVr chez le chat (Beall et al., 2000) et le primate (Chenuaud et al., 2004; Chirmule et al., 2000; Favre et al., 2002; Rudich et al., 2000). L'ADNc du gène de l'EPO présente l'intérêt d'être de petite taille (600 pb chez le singe) et la protéine EPO est facilement titrable dans le sérum par ELISA. De plus, une augmentation d'EPO a des conséquences visibles en analyses hématologiques (augmentation de l'hématocrite, du taux d'hémoglobine et du nombre de réticulocytes). L'EPO est présentée ici comme un gène rapporteur mais elle peut également être utilisée comme un gène thérapeutique dans les β -thalassémies (Al-Khatti et al., 1987).

Dans le cadre du transfert de gènes (dans notre cas, à l'aide d'AAVr), l'utilisation des gènes rapporteurs permet d'étudier la persistance à long terme, la cinétique d'expression, l'efficacité de transduction et la biodistribution du produit issu du transgène. De plus, ces gènes rapporteurs participent également à l'amélioration de l'efficacité des vecteurs AAVr qui

consiste par exemple à comparer différents sérotypes, à introduire des éléments favorisant la transduction (promoteur ou séquence activatrice) ou encore à réguler l'expression du transgène.

I.C- Utilisation d'un système de régulation

Les études de transfert de gènes à l'aide d'AAVr ont montré qu'il est possible d'obtenir une correction phénotypique d'une maladie. Cependant, si l'on veut reproduire l'activité biologique normale de la protéine mutée, il est nécessaire de pouvoir réguler l'expression du transgène afin que l'activité de la protéine issue du transgène soit comparable à celle de la protéine normale et rester dans la fenêtre thérapeutique. Une surexpression du transgène peut entraîner des effets secondaires indésirables. Ainsi, une surexpression du facteur IX chez des souris suite à un transfert de gènes entraîne la mort des animaux (Aljamali et al., 2008). Pour des raisons de sécurité, il est important de pouvoir stopper l'expression du transgène si besoin. Dans cette optique, des systèmes de régulation ont été développés comme le système ecdysone, le système Mifépristone, le système rapamycine ou encore le système tétracycline. Les travaux menés précédemment au laboratoire se sont plus particulièrement intéressés au système tétracycline (Le Guiner et al., 2007).

Le système tétracycline (Tet) est un système dérivé de l'opéron de résistance à la tétracycline du transposon Tn10 d'*Escherichia Coli* (Gossen and Bujard, 1992). Le premier système tétracycline, appelé **Tet-Off**, fait intervenir une protéine transactivatrice mi-virale, mi-bactérienne, le tTA (tetracycline controlled Trans-Activator) et un promoteur inductible, Ptet-1. La protéine tTA résulte d'une fusion entre le domaine de transactivation de la protéine VP16 (HSV) et le domaine de liaison à l'opérateur Tet-O de la protéine répressive TetR. Le promoteur Ptet-1 comporte l'opérateur Tet-O suivi du promoteur minimal du CMV (Cytomégalo virus). En absence de tétracycline, la protéine tTA va venir se fixer sur l'opérateur Tet-O de façon spécifique et permettre l'initiation de la transcription. En présence de tétracycline, celle-ci se lie au tTA, ce qui entraîne un changement de conformation de cette protéine transactivatrice dont la conséquence est une perte d'affinité du tTA pour l'opérateur Tet-O, et par conséquent une absence de transcription. Ce système répresseur peut être induit par la tétracycline mais également par la doxycycline, qui appartient à la même famille d'antibiotiques (les Tétracyclines) et est connue pour son innocuité.

Un système **Tet-On**, où la transcription est induite en **présence** de doxycycline a été développé par la suite. Celui-ci comporte une version mutée du Tet-R, appelé rTet-R qui à l'opposé du Tet-R, ne se fixe à l'opéron Tet-O qu'en présence de doxycycline. Le rTet-R a été fusionné au domaine de transcription du VP16 pour former le rtTA (reverse tetracycline controlled Trans-Activator) (Gossen et al., 1995). L'utilisation des systèmes Tet-On et Tet-Off ont été validés dans des souris transgéniques (Kistner et al., 1996).

I.D- Utilisation de vecteurs AAVr contenant le système Tet-ON

L'efficacité du système de régulation Tet-On a également été testée à l'aide de vecteurs AAVr chez la souris (Bohl et al., 1998). Pour cela, des vecteurs AAV2r contenant i) le gène rtTA sous contrôle d'un promoteur fort (CAG) et ii) un transgène rapporteur (le gène de l'érythropoïétine murine) sous contrôle du système de régulation Tet-On ont été injectés dans le muscle tibial cranial de souris. L'administration de doxycycline à ces souris a entraîné une augmentation de leur hématocrite et du taux d'érythropoïétine sérique. A l'inverse, le retrait de la doxycycline a entraîné une diminution de ces deux taux. Ceci montre que le système est inductible dans le temps. De plus, la réalisation de stimulations répétées montre que ce système est persistant. Ces résultats indiquent que malgré le caractère hétérologue du système de régulation, la souris ne développe pas de réponse immune contre les produits issus des transgènes (rtTA et érythropoïétine murine). De plus, l'injection de ce vecteur dans un modèle murin de β -thalassémie permet la correction de la maladie à long terme (Samakoglu et al., 2002).

Les animaux ayant reçu le transfert de gènes mais sans administration de doxycycline montrent également une faible augmentation de l'hématocrite. Ceci indique que le système « fuit » car même en absence de l'inducteur, l'expression de l'érythropoïétine est détectable. Cela sous-entend que le transactivateur rtTA se fixerait de façon non spécifique sur le promoteur p_{tet-1} .

II. Modèle de transfert de gènes développé au laboratoire

II.A- Utilisation du système Tet-ON chez le macaque

Suite à ces résultats encourageants, des travaux ont été mis en place au laboratoire pour tester ce système de régulation chez le macaque *fascicularis* (Chenuaud et al., 2004; Favre et al., 2002). L'objectif était de savoir si le modèle était transposable chez le primate. Pour cela, six animaux ont reçu des AAV2r contenant i) le gène rtTA sous contrôle du CAG et ii) le gène de l'érythropoïétine du macaque *fascicularis* sous contrôle du système de régulation Tet-On (figure 9A).

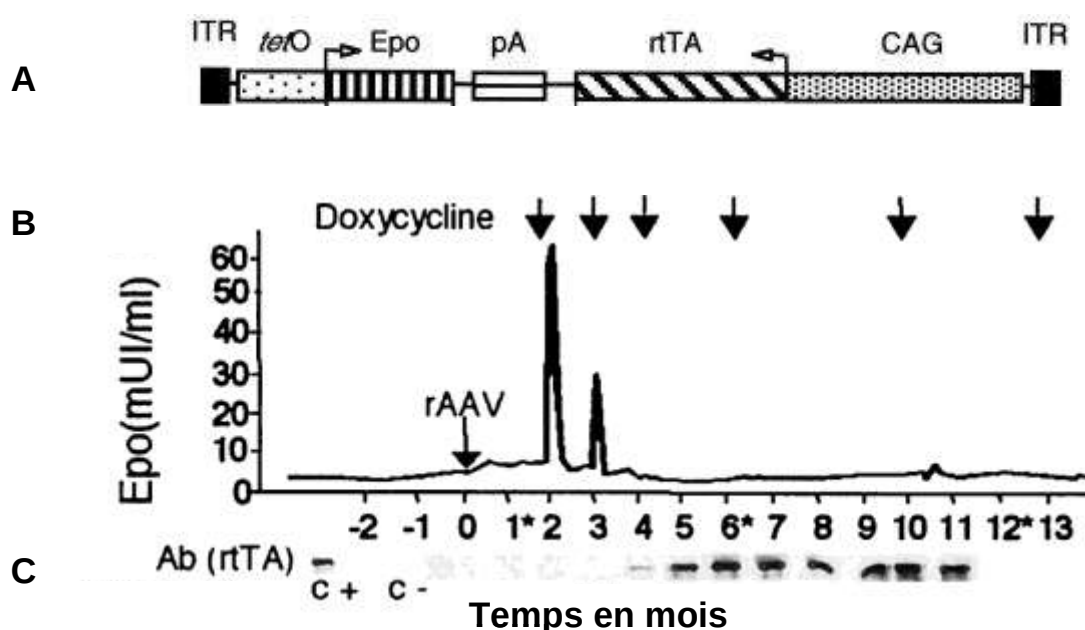


Figure 9 : Modèle de transfert de gènes développé au laboratoire.

A. La cassette d'expression comporte le gène codant pour le rtTA sous contrôle d'un promoteur constitutif, le CAG. Le rtTA est donc exprimé dans les cellules transduites. En présence de doxycycline, ce transactivateur rtTA va changer de conformation et va ainsi pouvoir se fixer sur l'opérateur TetO. La fixation du rtTA sur le TetO entraîne la synthèse de l'érythropoïétine (EPO). **B.** L'injection intramusculaire de vecteurs AAV2r codant pour cette cassette d'expression a été réalisée chez des macaques au temps 0. Le système de régulation est ensuite stimulé tous les mois (à partir du 2^{ème} mois) par administration de Doxycycline. La mesure de la synthèse d'EPO est observée par ELISA EPO dans le sérum de ces animaux. **C.** En parallèle, la présence d'anticorps anti-rtTA dans le sérum de ces animaux est analysée par Western Blot anti-rtTA. *D'après Favre et al. 2002*

Ces animaux ont été stimulés une fois par mois pendant 5 jours par des injections intraveineuses de doxycycline (Favre et al., 2002). A la première induction, une augmentation de l'hématocrite et de l'érythropoïétine sérique a été observée chez tous les animaux. Le transfert de gènes a donc efficacement transduit les cellules musculaires. Cependant, au bout de trois à quatre mois selon les animaux, l'administration de doxycycline n'était plus corrélée à une sécrétion forte d'EPO, le système de régulation ne semblait plus efficace chez cinq des six animaux (figure 9B).

Un seul animal a présenté une persistance de la sécrétion inductible d'EPO pendant plusieurs années. Comme chez la souris, une fuite du système a été observée (Favre et al., 2002).

II.B- Développement d'une réponse immune chez le primate

La recherche des anticorps sériques chez ces primates a montré le développement d'une réponse humorale contre le rtTA alors qu'aucun anticorps anti-EPO n'a été détecté. En effet, des anticorps IgG dirigés contre le rtTA ont été détectés par Western blot dans le sérum de 4 animaux sur les 6 appartenant au protocole. L'unique animal où le système de régulation a persisté dans le temps n'a pas développé d'anticorps anti-rtTA. Les anticorps sont détectés environ 4 mois après l'injection du vecteur (Figure 9C) (Favre et al., 2002). Ce délai suggère que la réponse humorale détectée est induite par la protéine rtTA synthétisée *in vivo* et non par une protéine rtTA native pouvant potentiellement contaminer le vecteur. Ce résultat est confirmé par l'absence de protéines rtTA détectées par Western blot dans les préparations virales.

Des coupes histologiques ont été réalisées à partir de biopsies musculaires prélevées à proximité des zones d'injection du vecteur. L'observation histologique des biopsies 1 mois post-injection ne montre pas d'infiltrat inflammatoire, suggérant que l'injection du vecteur n'entraîne pas d'inflammation. De nouvelles biopsies, réalisées 6 mois post-injection ont montrées un infiltrat modéré caractérisé par la présence de cellules CD4⁺, CD8⁺ et CD68. Ceci suggère la présence d'une réponse immune cytotoxique dans les muscles injectés. Un an après injection du vecteur, cet infiltrat n'est plus détectable. Aucun lymphocyte CD4 ou CD8 n'a été détecté chez l'animal où l'expression régulée de l'EPO est maintenue. Seule une inflammation très faible et quelques macrophages ont été observés (Favre et al., 2002).

Etant donné la détection d'anticorps anti-rtTA dans le sérum et l'observation transitoire

d'infiltrats lymphocytaires dans les muscles injectés de macaque, le développement d'une réponse cytotoxique contre le rtTA a été recherchée. Cette recherche a cependant été menée tardivement, c'est-à-dire plus d'un an et demi après l'injection des AAVr. La réponse primaire avait disparu suite à la destruction des cellules transduites par le vecteur AAVr. La mise en évidence d'une réponse cytotoxique a nécessité l'activation des LT mémoires spécifiques du rtTA. Pour cela, les cellules mononuclées issues de ganglions ou du sang périphérique ont été stimulées par des cellules dendritiques autologues présentant le peptide rtTA, le LacZ ou la GFP (Favre et al., 2002).

Suite à cette activation, un test ELISPOT anti-IFN γ et un test CTL ont été réalisés sur les cellules mononuclées activées. Pour ces tests, des cellules B papio autologues ont été utilisées, soit comme cellules cibles pour le test CTL, soit comme cellules stimulatrices pour le test ELISPOT. Pour chaque animal, des cellules B papio ont été dérivées de clones lymphocytaires B immortalisés par le virus herpes papio (B papio) puis transduits soit par un virus vaccine recombinant codant pour la protéine tetR (vtetR), soit par le virus vaccine sauvage (vWR). Les résultats des tests CTL et ELISPOT réalisés sur les **PBMC** activées n'ont pas permis de détecter des effecteurs spécifiques du rtTA. En ce qui concerne les **LNMC**, le test ELISPOT montre qu'en présence de B papio présentant le tetR (vtetR) et de 5×10^4 LNMC activés par les CD-rtTA, le nombre de spots détectés est supérieur à celui obtenu en présence de B papio présentant le virus sauvage (vWR), respectivement 81 ± 18 et 22 ± 3 spots. En présence des LNMC activés par les CD-GFP (5×10^4 cellules), la quantité de spots obtenue avec les 2 stimulations papio B ne semblent pas différente (57 ± 23 en présence de B papio vtetR et 73 ± 1 avec les B papio vWR) (Figure 10). En parallèle, les résultats obtenus dans les tests CTL montrent que l'addition de LNMC activées avec les CD-rtTA dans une culture de B papio entraînent une lyse cellulaire spécifiquement dans le cas des B papio présentant le tetR (vtetR). L'ensemble de ces résultats montre la présence de LT spécifiques du rtTA dans les animaux ayant reçu l'AAV-rtTA-EPO. Il est envisageable que cette réponse immune cytotoxique induite par le rtTA a entraîné un infiltrat inflammatoire suivi de la disparition des fibres musculaires transduites par le vecteur et contenant le transgène immunogène rtTA. Certains animaux ont montré une perte du nombre de copies du transgène rtTA et une réponse humorale, sans détection de réponse cytotoxique *in vitro*. Ceci peut s'expliquer par un seuil de sensibilité trop faible des techniques utilisées pour détecter la réponse cytotoxique (Favre et al., 2002).

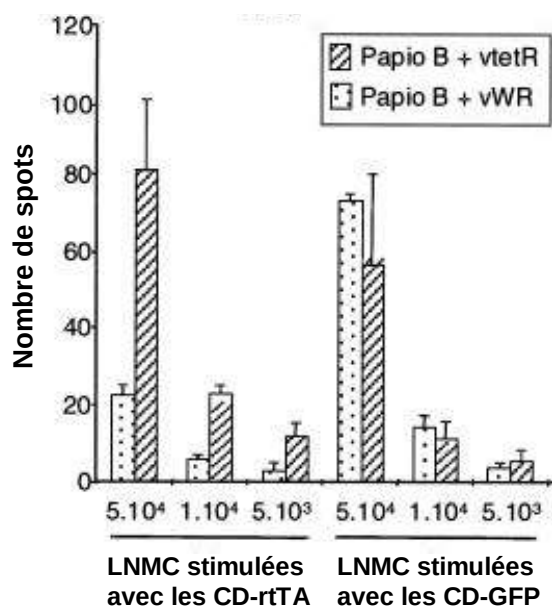


Figure 10 : Développement d'une réponse cytotoxique contre le rtTA chez les macaques injectés.

Des ELISPOT IFN γ ont été réalisés sur les cellules issues des ganglions drainant le muscle injecté plusieurs mois post-injection. Les LNMIC ont été stimulés pendant 10 jours par des CD présentant le rtTA ou la GFP à leur surface. Le test ELISPOT IFN γ a été réalisé sur différentes quantités de LNMIC activés (de 5x10³ à 5x10⁴ LNMIC) et incubés une nuit avec des cellules stimulatrices (B papio) autologues transduites avec le vTetR ou le vWR. *D'après Favre et al.2002*

II.C- Amélioration du système

A la suite de ces résultats, diverses stratégies ont été développées pour améliorer l'efficacité du transfert de gènes d'un système de régulation dans le muscle de primate et réduire le risque de développement d'une réponse immune contre le transgène rtTA (Chenuaud et al., 2004). Plusieurs modifications de la cassette d'expression du vecteur ont été réalisées et testées chez la souris. La cassette d'expression mise au point pour les premiers primates contenait deux promoteurs, le promoteur CAG pour le rtTA et le promoteur Ptet-1 pour l'EPO, situés chacun à une extrémité de la cassette d'expression. Les deux transgènes sont alors en sens opposé et séparés par un polyA commun bidirectionnel (Figure 9A). Des études menées chez la souris ont montré que la disposition des 2 transgènes l'un à la suite de l'autre et non pas l'un opposé à l'autre comme décrit précédemment permettait d'augmenter l'efficacité de la transduction. Cette disposition a donc été choisie pour la seconde série de primates injectés (Chenuaud et al., 2004). De plus, une séquence WPRE a été ajoutée dans la cassette d'expression car cette séquence favoriserait l'expression du transgène.

De plus, pour optimiser le niveau d'induction du système, différents transactivateurs rtTA ont été testés : le rtTA-M2, le rtTA-S2 et le rtTA-M2nls. En effet, depuis l'étude précédente, de nouvelles versions du rtTA, appelées rtTA-S2 et rtTA-M2 ont été générées. Ces nouvelles versions entraîneraient une activité plus faible du transgène en absence de doxycycline (moins de fuite du vecteur) et permettraient une plus forte induction du système de régulation dans

des cellules humaines cultivées *in vitro* (Urlinger et al., 2000). La comparaison des trois transactivateurs chez la souris a permis de conclure que le rtTA-M2 était le meilleur candidat. Il permet d'obtenir le plus fort niveau d'induction tout en conservant une activité basale minimale en absence d'inducteur (Chenuaud et al., 2004).

Le vecteur optimisé chez la souris a ensuite été testé chez le macaque à l'aide de vecteurs AAV1r et AAV2r. La cassette d'expression a été modifiée sur 2 points : l'EPO de macaque a remplacé l'EPO murine et un promoteur spécifique du muscle, le promoteur desmine a remplacé le CAG. Aucune fuite du système de régulation n'a été observée chez les animaux. Cela peut s'expliquer entre autre par l'utilisation du promoteur desmine qui est moins fort que le CAG et qui par conséquent entraînerait une expression plus faible du rtTA. La comparaison des 2 sérotypes dans le muscle de macaque confirme les résultats obtenus précédemment chez la souris, l'AAVr de sérotype 1 permet une meilleure transduction du muscle que l'AAVr de sérotype 2. Une augmentation d'expression de 10 à 20 fois a été observée entre les deux sérotypes. Cependant, comme chez les premiers animaux injectés, une réponse immune contre le rtTA s'est développée chez 7 animaux sur 8. L'animal n'ayant pas développé de réponse immune fait partie des animaux ayant reçu les fortes concentrations de vecteur AAV1r. Ce résultat indique que dans cette étude, le développement d'une réponse immune ne semble pas dépendre du sérotype utilisé, ni de la quantité de vecteur administré, mais plutôt de l'espèce animale utilisée (Chenuaud et al., 2004).

La présence d'une réponse immune chez les primates, non détectable chez les souris, met en évidence la pertinence de l'utilisation du macaque comme modèle pré-clinique.

III. Objectifs de recherche

Le modèle de transfert de gènes développé au laboratoire est efficace pour transduire le muscle chez le primate. Cependant la partie transactivatrice du transgène, le rtTA, entraîne le développement d'une réponse immunitaire tardive à la fois humorale, visible par l'apparition d'anticorps anti-rtTA, et cytotoxique, mise en évidence par la présence d'infiltrats et par des tests ELISPOT *in vitro*. La réponse cytotoxique entraîne à moyen terme la destruction des cellules musculaires transduites par l'AAVr (Favre et al., 2002). L'utilisation d'un transgène rtTA modifié ou d'un autre sérotype d'AAVr ne permet pas d'empêcher le développement de cette réponse immunitaire (Chenuaud et al., 2004). Une des techniques envisageable pour contrer le développement de cette réponse immune est **d'induire une tolérance spécifique au rtTA chez ces animaux.**

Dans cette optique, deux voies d'induction de tolérance ont été étudiées lors de cette thèse : la tolérance centrale et la tolérance périphérique.

Ainsi, nous avons souhaité apporter le rtTA directement dans le thymus à l'aide de vecteurs viraux afin d'induire une tolérance centrale vis-à-vis de cette protéine.

En parallèle, nous avons voulu développer des CD tolérogènes présentant les peptides dérivés du rtTA chez le singe ainsi que des Treg dans le but d'induire une tolérance périphérique vis-à-vis du rtTA.

Partie 1 : Etude de l'induction de la tolérance centrale

I. Introduction

La tolérance centrale vis-à-vis de peptides ou de protéines étrangères peut être induite par différents processus, dont : *i)* l'injection intra-thymique de ces peptides ou de cellules qui les expriment ou *ii)* par la transduction des cellules thymiques à l'aide de vecteurs viraux codant pour cette protéine. Ces deux méthodes utilisent les propriétés des cellules thymiques à induire une tolérance vis-à-vis du soi.

I.A- Induction de la tolérance centrale à la suite d'injection de peptides ou de cellules dans le thymus

I.A.1. Injection de peptides ou de protéines

La technique la plus simple pour introduire un peptide dans le thymus est de l'injecter directement dans le thymus. Ainsi, Khoury et al. ont utilisé un modèle de sclérose en plaque (EAE) chez le rat déficient pour l'expression de la protéine MBP (myelin basic protein). L'injection de MBP recombinante à ces animaux entraîne alors une forte réponse immune contre cette protéine. Les auteurs montrent dans ce modèle que l'injection intra-thymique (IT) de la protéine MBP, avant l'injection de MBP recombinante, réduit la réponse immune et donc le développement de la maladie (Khoury et al., 1993).

En parallèle, plusieurs études ont montré dans des modèles de transplantation cardiaque (Chowdhury et al., 1996; Chowdhury et al., 1998; Oluwole et al., 1993b; Oluwole et al., 1999; Oluwole et al., 1993c) ou rénale (Sayegh et al., 1993) chez le rat, que l'injection IT de peptides du CMH de classe I ou de classe II du donneur permettait la prolongation de survie du greffon et dans certains cas, l'induction d'une tolérance. Ces expériences ont été réalisées en présence d'un traitement ALS (sérum anti-lymphocytaire (ALS)) qui déplete une partie des LT en périphérie. La prolongation de la survie de la greffe n'est pas observée si le greffon provient d'un animal tiers (de CMH différent), ce qui indique la spécificité des cellules du donneur. De plus, chez ces mêmes animaux, la thymectomie s'accompagne d'un rejet de greffe (Oluwole et al., 1993c ; Sayegh et al., 1993).

Différents modes d'administration des peptides ont été testés et les auteurs ont montré que l'injection intraveineuse (IV) (Chowdhury et al., 1996; Oluwole et al., 1993c ; Sayegh et al., 1993) (Oluwole et al., 1999) ou intra-splénique (Sayegh et al., 1993) ne permettaient pas

d'induire une survie du greffon, même en présence d'ALS.

L'ensemble de ces études indique que **l'injection IT est la voie d'administration optimale d'un peptide pour induire une tolérance vis-à-vis de ce peptide.**

Une étude plus récente, menée par Trani et al., utilise un modèle de greffe de peau de souris transgéniques exprimant la protéine hémagglutinine (HA) (donneur) et de souris receveuses possédant un TCR capable de reconnaître HA. L'administration de la protéine HA en IT aux souris receveuses permet l'induction d'une tolérance au greffon. Cependant, la quantité de TCR capables de reconnaître HA ne diminue que transitoirement dans ces souris pour revenir à son taux maximum 4 semaines après l'injection IT. Dans cette étude, les auteurs montrent que suite à l'administration de la protéine HA en IT, la tolérance au greffon n'est pas liée uniquement à la délétion clonale des LT capables de reconnaître HA mais également à la production de Treg spécifiques de HA (Trani et al., 2003).

L'injection de peptides dans le thymus semble partiellement efficace. Dans la plupart des cas, le développement d'une réponse immune contre le peptide ou le greffon est observé.

Outre l'injection de peptides, l'injection de cellules entières dans le thymus a été étudiée aussi bien dans des modèles de pathologies faisant intervenir un seul gène, que dans des greffes ou encore dans des modèles de maladies auto-immunes.

I.A.2. Injection de cellules

En 1992, Behara et ses collaborateurs ont montré que l'injection IT chez le rat de fibroblastes transfectés avec le gène codant pour l'hormone de croissance humaine associée ou non à un traitement ALS entraîne la production d'une réponse humorale contre l'hormone de croissance. Ce système ne permet pas d'induire une tolérance à l'hormone de croissance lorsque celle-ci est injectée en sous-cutanée (Behara et al., 1992).

En parallèle, dans un modèle de rat déficient pour l'UDP-GlucuronosylTransférase (UGT), l'injection IT d'hépatocytes infectés avec un adénovirus codant pour l'UGT retarde (mais n'inhibe pas) le développement d'une réponse immune contre l'UGT à la suite d'un transfert de gène d'UGT à l'aide d'un vecteur adénoviral (Ilan et al., 1996).

Dans des modèles de diabète chez la souris et le rat (animaux NOD), des travaux ont montré l'efficacité de l'injection IT d'îlots pancréatiques à induire une tolérance, en particulier

lorsque les injections d'îlots pancréatiques sont réalisées sur des rongeurs nouveaux-nés (Charlton et al., 1994; Posselt et al., 1992; Posselt et al., 1990). Cependant, la déplétion en CPA des îlots pancréatiques avant d'être administrés en IT empêche l'induction de tolérance à la greffe, suggérant le rôle clé des CPA dans l'induction de tolérance par injection de cellules par voie IT (Campos et al., 1994).

Hormis l'injection d'îlots pancréatiques, les études citées ci-dessus montrent une efficacité intermédiaire. Dans les études sur les animaux diabétiques (souris et rats), **la présence de CPA semble augmenter l'efficacité des injections de cellules en IT**. Cela s'explique par le fait que l'injection de peptides ou de cellules (hors CPA) dans le thymus permet l'expression de peptides mais ces protéines doivent ensuite être captées et présentées par les CPA du thymus pour réaliser la délétion clonale des LT réactifs au peptide (sélection négative). Ainsi, dans un modèle de transplantation cardiaque réalisée sur des porcs thymectomisés, la transplantation d'un thymus du donneur permet une prolongation de la survie du greffon par rapport aux animaux n'ayant pas reçu le thymus. Si les animaux ne reçoivent pas la transplantation de thymus mais une injection de thymocytes du donneur, la prolongation de survie du greffon est plus courte que lors de la transplantation de thymus, indiquant l'importance des cellules du stroma thymique (CPA) dans l'induction d'une tolérance (Nobori et al., 2006). Ceci est confirmé par différentes études menées dans des modèles de transplantation dans lesquels l'injection intra-thymique de splénocytes (contenant des CPA) du donneur permet une survie du greffon chez le rongeur (Dono et al., 1995; Gillanders et al., 1997; James et al., 1993; Jones et al., 1997; Odorico et al., 1993; Oluwole et al., 1993a; Oluwole et al., 1993d).

La présentation d'antigènes exogènes dans le thymus peut également être réalisée par la transduction directe des CPA du thymus par des vecteurs viraux codant pour ces antigènes.

1.B- Induction de tolérance centrale à l'aide de vecteurs viraux

En 1995, DeMatteo et al. ont réalisé une analyse comparative de la capacité de différents vecteurs viraux codant pour la protéine LacZ à transduire le thymus chez la souris. Dans cette étude, ils ont montré que les vecteurs rétroviraux et AAVr ne transduisent pas efficacement le

thymus contrairement aux vecteurs adénoviraux (DeMatteo et al., 1995). Cette première comparaison a été réalisée avec des titres de 10^5 particules infectieuses (p.i.)/thymus pour les vecteurs rétroviraux et AAVr et 10^9 p.i./thymus pour les vecteurs adénoviraux. Les conditions de production des vecteurs ne permettaient pas d'obtenir des concentrations élevées pour les 2 vecteurs en question (et la taille du thymus de souris ne permet pas d'injecter une grande quantité de vecteurs). Lorsqu'ils normalisent le vecteur adénoviral à 10^5 p.i./thymus, le taux de transduction des cellules thymiques passe de 50% à 1%, ce taux restant supérieur à celui des vecteurs rétroviraux et AAVr (DeMatteo et al., 1995).

Dans cette étude, les auteurs ont montré que les cellules transduites par le vecteur adénoviral étaient des cellules épithéliales. Cependant, lorsque ces souris reçoivent une injection **intraveineuse** d'AdLacZ, aucune synthèse de LacZ n'est détectée, que l'IT soit associée ou non à un traitement ALS. Ce système ne permet donc pas d'induire une tolérance au LacZ. En réalité, lors de l'injection intra-thymique, le vecteur adénoviral se retrouve dans la circulation. Ce vecteur fortement immunogène entraîne alors la synthèse d'anticorps anti-adénoviraux neutralisants et une forte réponse cytotoxique (DeMatteo et al., 1995).

Cette même équipe a ensuite testé une injection adénovirale intra-thymique plus précoce sur des souris nouveaux-nés en absence de traitement immunosuppresseur (DeMatteo et al., 1997). Dans ces conditions, les souris ne développent pas d'anticorps neutralisants. Ceci peut s'expliquer par le fait que la maturation des LT n'a pas encore eu lieu et par conséquent la réponse immunitaire contre l'AdLacZ n'est pas possible. De plus, l'injection intraveineuse d'Ad-LacZ sur ces souris adultes permet une expression à long terme de la protéine LacZ. Cette technique permet donc d'induire une tolérance à la protéine LacZ à l'aide d'un vecteur adénoviral (DeMatteo et al., 1997).

Dans les mêmes années, une autre étude, menée par Ilan et ses collaborateurs (Ilan et al., 1996), a montré que l'injection d'Ad-UGT en IT dans un modèle de rat adulte déficient pour l'UGT, retarde mais n'élimine pas le développement d'une réponse immune contre l'UGT à la suite d'un transfert de gène d'UGT à l'aide d'un vecteur adénoviral (Ilan et al., 1996). Dans cette étude, l'injection intra-thymique chez le rat n'entraîne pas une réponse immune contrairement aux travaux de DeMatteo (DeMatteo et al., 1997), cette différence peut notamment s'expliquer par les transgènes utilisés, le LacZ serait alors plus immunogène que l'UGT.

L'immunogénicité des vecteurs adénoviraux les rend peu utilisables chez l'homme dans des

protocoles d'induction de tolérance. Les travaux de DeMatteo montrent que l'injection de vecteurs adénoviraux en intra-thymique chez des souris nouveaux-nés induit une tolérance. Cependant, chez l'homme, la maturation des LT qui est probablement plus précoce nécessiterait l'injection intra-thymique *in utero*.

Depuis l'étude de Matteo et al. publiée en 1995, **les techniques de production des vecteurs rétroviraux et AAVr se sont bien développées** permettant d'utiliser des lots de vecteurs concentrés et de les tester dans l'induction d'une tolérance centrale suite à une injection IT.

Les vecteurs rétroviraux, et plus spécifiquement les vecteurs lentiviraux (LV) ont été utilisés pour transduire le thymus dans un modèle de souris transgéniques ayant un TCR reconnaissant spécifiquement HA. Dans un premier article, Marodon et al. ont montré que l'injection intra-thymique de vecteur lentiviral codant pour la protéine GFP entraînait une transduction stable (3 mois) des cellules thymiques. Les auteurs ont conclu à une transduction des cellules épithéliales thymiques par la morphologie des cellules GFP positives, et également à une transduction des thymocytes par l'analyse des cellules du thymus par cytométrie de flux. Ils ont également réalisé des injections IT de LV codant soit pour la protéine GFP, soit pour la protéine HA sous contrôle du même promoteur (PGK) dans des souris transgéniques pour HA. Ils observent alors une diminution de la quantité de LT capables de reconnaître HA une semaine post-injection uniquement dans les souris injectées avec le LV-HA comme indiqué sur la figure 11A. Ces résultats suggèrent que l'injection de HA dans le thymus permettrait la sélection négative des LT capables de reconnaître HA (Marodon and Klatzmann, 2004).

Dans un second article (en utilisant le même modèle de souris et les mêmes vecteurs) (Marodon et al., 2006), il a été montré qu'en plus d'une délétion des thymocytes TCR HA, une sélection positive de cellules T régulatrices spécifiques de HA était observée. En effet, dans la population de LT spécifiques de HA, la fraction majoritaire SP CD4⁺ CD25⁻ diminue de 2 à 3 fois alors que la fraction minoritaire SP CD4⁺ CD25⁺ augmente de 2 à 10 fois dans la première semaine post-injection (Figure 11B). A moyen terme (1 à 2 mois post-injection), la sélection des Treg est clairement représentée alors que la délétion clonale n'est plus visible. Pour confirmer que les principales cellules transduites par le LV étaient des cellules épithéliales (hypothèse suggérée dans l'article précédent), les souris ont été injectées en intra-thymique, irradiées un mois plus tard puis ont reçu un transplant de moelle osseuse déplétée en LT provenant d'une souris TCR-HA. Les thymus des souris injectées avec le LV-GFP

comportaient toujours des cellules GFP un mois après l'irradiation, suggérant que les cellules transduites sont bien des cellules épithéliales (les LT et les CD ne sont pas résistantes à l'irradiation). De plus, dans ces conditions, un fort taux de Treg spécifiques de HA est détecté dans les souris ayant reçu le LV-HA (et non dans les souris avec le LV-GFP) montrant que l'expression de HA dans les cellules épithéliales est suffisante pour l'induction des Treg spécifiques de HA (Marodon et al., 2006). Enfin, dans un modèle de souris diabétiques, les souris NOD, l'injection intra-thymique d'un vecteur lentiviral codant pour la pré-proinsuline diminue l'incidence du diabète par rapport aux souris non-injectées (Figure 11C) (Marodon et al., 2006).

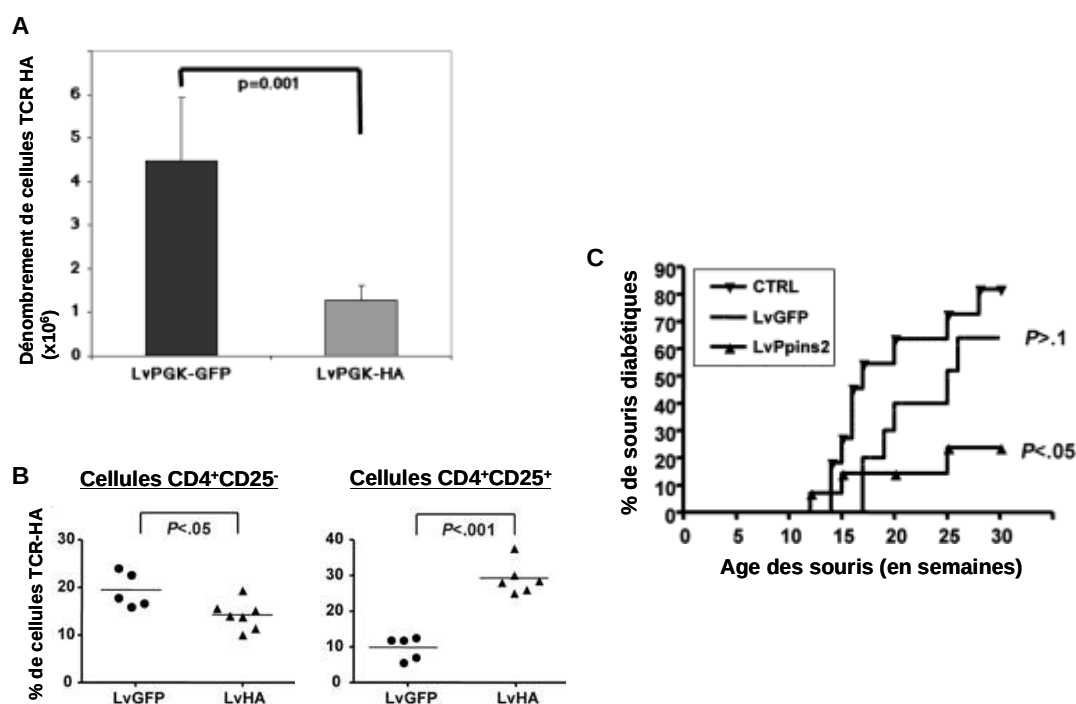


Figure 11: Induction d'une tolérance centrale après transduction du thymus à l'aide de vecteurs viraux

A. Dans un modèle de souris reconnaissant spécifiquement le TCR HA, l'injection intra-thymique d'un vecteur lentiviral codant pour HA entraîne une forte diminution des LT HA en périphérie. **B.** De façon plus précise, le pourcentage de T naïfs capables de reconnaître HA diminue (d'environ 20% à 15%, soit jusqu'à 2,5 fois) alors que le pourcentage de Treg spécifiques de HA augmente (d'environ 10% à 30%, soit une augmentation jusqu'à 10 fois pour les points extrêmes). **C.** L'injection intra-thymique d'un vecteur lentiviral codant pour la pré-proinsuline dans des souris NOD déficientes pour cette protéine permet de diminuer le diabète chez ces souris. En parallèle, le diabète n'est pas traité dans des souris NOD non injectées ou injectées avec le vecteur codant pour la GFP. *D'après Marodon et al, 2004, 2006*

Aucune étude récente ne semble utiliser le transfert de gènes à l'aide de vecteurs AAVr pour transduire le thymus.

II. Objectifs

Les études menées par Marodon et al. ont montré l'efficacité de l'injection intra-thymique de vecteurs lentiviraux codant pour HA dans l'induction d'une tolérance chez la souris. Ces résultats sont confirmés par l'injection intra-thymique de vecteurs lentiviraux codant pour la pré-proinsuline dans des souris diabétiques. Cette injection permet de réduire de façon importante le développement de la maladie (Figure 11) (Marodon et al., 2006).

Dans cette optique, **nous avons voulu tester si l'injection de vecteur lentiviral codant pour le rtTA et la GFP (gène rapporteur utilisé pour observer l'efficacité du transfert de gènes) permettait de transduire le thymus chez le singe.**

Nous avons ensuite testé l'efficacité des vecteurs AAVr pour transduire le thymus chez la souris. Comme décrit dans la première partie de l'introduction, des améliorations ont été réalisées dans la génération des vecteurs AAVr. Nous avons ainsi comparé l'efficacité de i) différents sérotypes d'AAVr et ii) des formes simple brin (ss) et double brin (sc) d'AAVr dans la transduction du thymus de souris. La combinaison optimale a été testée chez le macaque. Ceci a permis la rédaction d'un premier article.

L'induction d'une réponse immune ou d'une tolérance vis-à-vis du produit du transgène a également été observée chez les macaques injectés.

III. Résultats

III.A- Etude de l'efficacité de vecteurs lentiviraux pour transduire le thymus chez le singe

Suite aux résultats de Marodon et al., nous avons voulu tester la capacité des vecteurs lentiviraux à transduire le thymus chez le singe. Le vecteur lentiviral utilisé (LV-rtTA/GFP) code i) pour le rtTA sous contrôle d'un promoteur EF1 α et ii) de la GFP sous contrôle d'un IRES (Figure 12). La présence de la GFP permet d'observer la transduction des cellules dans le thymus et celle du rtTA, l'induction de la tolérance dans notre système de transfert de gènes. L'expression du vecteur a été vérifiée chez la souris. Le premier macaque injecté a reçu 2×10^9 TU de LV-rtTA/GFP dans le lobe droit en deux sites d'injection. L'injection du thymus a été réalisée par endoscopie thoracique. Quinze jours plus tard, le thymus a été prélevé puis analysé par RT-PCR, cytométrie de flux et immunohistologie. Aucun signal GFP, ni aucune inflammation n'a été détecté par ces techniques. Les vecteurs avaient été produits et purifiés sur double coussin de sucrose au laboratoire. L'absence d'expression du transgène peut s'expliquer par la faible concentration (2×10^9 TU/ml) et la purification des vecteurs. Afin de se placer dans des conditions optimales, nous avons fait produire la deuxième préparation de LV-rtTA/GFP dans un laboratoire référent en LV (Tronolab). Cette préparation a été concentrée à 4×10^9 TU/ml et purifiée par ultracentrifugation. Un deuxième animal a été injecté avec 8×10^9 TU (4 fois plus que le premier animal) de ces vecteurs LV-rtTA/GFP en intra-thymique. Comme précédemment, aucun signal GFP n'a été détecté dans le thymus de l'animal par cytométrie de flux, immunohistologie ou RT-PCR quantitative.

Ces résultats montrent que dans les conditions testées, les vecteurs lentiviraux ne permettent pas de transduire le thymus chez le singe. Comme la transduction du thymus à l'aide de vecteurs AAVr ne semble pas avoir été testée, nous avons décidé de tester l'efficacité des AAVr à transduire le thymus chez la souris puis chez le singe.

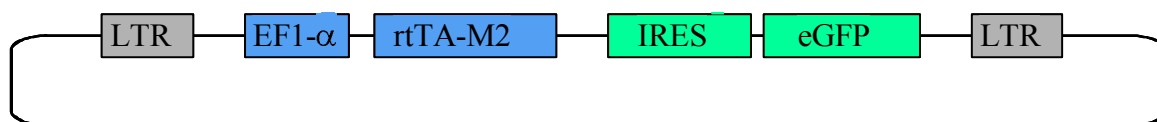


Figure 12 : Représentation schématique de la cassette d'expression du vecteur lentiviral. Le vecteur lentiviral code pour le rtTA et la GFP. Le rtTA est sous contrôle du promoteur constitutif EF1 α et l'expression de la GFP est permise par la présence d'un IRES (Internal Ribosome Entry Site). La cassette d'expression est entourée des 2 LTR (Long Terminal Repeat) spécifiques du vecteur lentiviral.

III.B- Etude de l'efficacité des vecteurs AAVr pour transduire le thymus chez la souris et le singe (Article I)

Résumé de l'article I :

La capacité de transduction du thymus à l'aide d'AAVr a été testée en utilisant différents sérotypes d'AAVr (1, 2, 4, 5 et 8, aussi appelés 2/1, 2/2, 2/4, 2/5, 2/8) et des vecteurs ss (simple brin) ou sc (double brin). Ces 10 AAVr différents codent pour la GFP sous contrôle du promoteur PGK. Des souris ont été injectées avec ces vecteurs (3 animaux/vecteur) puis sacrifiées un mois plus tard. La date d'euthanasie a été fixée à un mois car c'est le temps (moyen) correspondant au pic d'expression des ssAAVr. L'analyse RT-PCR du thymus des animaux montre que le vecteur scAAV8 est le plus efficace pour transduire le thymus (Figure 1). Une deuxième cohorte de souris a permis de tester i) la cinétique d'expression de ce vecteur dans le thymus, ii) les cellules transduites et également iii) la distribution du transgène en périphérie. L'étude de la cinétique montre une expression rapide du transgène (72 heures) qui diminue ensuite avec le temps. La transduction du thymus est d'environ 3,5 % des cellules thymiques. L'analyse des thymocytes par FACS montre que les cellules GFP positives sont présentes dans les différentes populations de thymocytes en respectant la répartition normale des thymocytes totaux du thymus (DN, DP, SP). L'immunohistologie montre que les cellules épithéliales, ainsi que les CD sont également transduites dans le thymus (Figure 2). En ce qui concerne les organes périphériques, l'expression du transgène est détectée dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques. La cinétique d'expression de la GFP dans les organes lymphoïdes secondaires suit la cinétique du thymus (décalée de quelques jours), cela corrèle avec une migration des cellules du thymus vers les organes lymphoïdes secondaires (Figure 3). Ceci est renforcé par l'observation que les cellules GFP positives dans la rate sont des LT.

A la suite de ces résultats encourageants, deux macaques ont été injectés en intra-thymique dans le lobe droit avec 2×10^{13} vg de scAAV8r GFP. La thymectomie des animaux a été réalisée 10 jours post-injection suivie de biopsies des ganglions lymphatiques, de la rate (splénectomie totale) et du foie à 30 jours post-injection. Contrairement aux vecteurs lentiviraux, l'expression de la GFP a été détectée dans le thymus des animaux injectés. L'observation des différentes zones du thymus montre une expression plus forte du transgène dans la zone injectée avec une diffusion dans les zones adjacentes. Comme chez la souris, les différentes populations de thymocytes sont transduites (Figure 4). L'étude des organes périphériques montre une transduction importante de la rate (LT CD4⁺) (Figure 5).

Article I :

**Efficient gene transfer following intrathymic rAAV vector administration
in mice and non-human primates**

Aurelie Moreau^{1*}, Rita Vicente^{2*}, Laurence Dubreil³, Guillaume Podevin¹, Oumeya Adjali²,
Chantal Jacquet², Jack-Yves Deschamps⁴, Yan Chereil³, Naomi Taylor^{2#}, Philippe Moullier^{1#},
and Valérie S. Zimmermann^{2#}

¹INSERM U649-Laboratoire de Thérapie Génique, CHU Hôtel-Dieu, Nantes, France; ²Institut
de Génétique Moléculaire de Montpellier, CNRS UMR 5535/IFR 122, F-34293 Montpellier
Cedex 5, France; ³UMR703 INRA/ENVN, Ecole Nationale Veterinaire, Nantes, France;
⁴Département de Pédiatrie, CHU Hôtel-Dieu, Nantes, France

* The first two authors contributed equally to this work and are listed in alphabetical order

Corresponding author

Short title: *In situ intrathymic rAAV gene transfer*

*Discussion de l'article en cours d'écriture
(détaillée en français dans le chapitre suivant (IV.Discussion))*

Abstract

The thymus is the primary site of T-cell development and intrathymic injection of a transgene-expressing lentiviral vector in mice allows the *in situ* correction of a T cell-specific genetic defect. Nevertheless, the efficiency of thymocyte transduction does not exceed 0.1-0.3%, and we were unable to detect any thymus transduction in macaques. As such, we initiated studies to test the capacity of recombinant Adeno-Associated Virus vectors (rAAV) to transduce the murine and primate thymus. Thymic administration of single-stranded (ssAAV) and self-complementary AAV (scAAV) vectors pseudotyped with capsid proteins of serotypes 1, 2, 4, 5 and 8 demonstrated that scAAV2/8 most efficiently transduced the murine thymus. Intrathymic administration of scAAV2/8 particles led to transgene expression in up to 5% of thymocytes in immune-competent mice with emigration of transduced cells to the periphery, representing 1% of splenic/lymph node T cells. Moreover, using ultrasound-mediated guidance, *in vivo* intrathymic administration of scAAV2/8 particles into macaques resulted in >1% gene transfer with transduced T cells migrating to the spleen. Thus, under conditions wherein there is a full thymocyte compartment and pre-existing lymphocyte pool, rAAV-mediated gene transfer allows significant transgene expression in the thymus with subsequent export of transduced T cells to the periphery.

Introduction

The thymus is the primary site of T cell development. T cell differentiation in this organ is initiated by the entry of hematopoietic progenitors, migrating from the bone marrow (BM). This maturation of progenitors to T cells, requiring approximately 28 days (Porritt et al., 2003), occurs via direct interactions with thymic stromal cells and cytokine stimulation. T cell differentiation can be divided into three major stages defined by the expression of CD4 and CD8 markers. The most immature or double negative (DN) stage is characterized by the lack of expression of CD4 and CD8 markers and represents 2-5% of thymocytes. DN thymocytes progress to a stage wherein there is a dual expression of CD4 and CD8 markers (Double Positive, DP, 80-90%) before lineage commitment to either CD4 or CD8 thymocytes (Single Positive, SP, 5-15%) which then emigrate from the thymus to the periphery. Schematically, the transition from DN to DP and DP to SP stages is regulated by the rearrangement and selection of a functional TCR, respectively. The selection step plays a key role in the induction of a broad repertoire of self-tolerant T cells. This is achieved by the deletion of autoreactive T cells and the generation of regulatory T cells. Because of these properties, the thymus is a critical site wherein T cell responsiveness and tolerance can be manipulated.

Targeting the thymus with an antigen of interest can result in the induction of tolerance. Indeed, this has been achieved following direct injection of soluble antigens (Khoury et al., 1993), injection of viral vectors harboring an antigen of interest (DeMatteo et al., 1997; Marodon et al., 2006) or even entire cells, as in the case of pancreatic islet cells (Posselt et al., 1992). Moreover, we previously demonstrated the feasibility of an *in situ* correction of a genetic immunodeficiency by direct intrathymic injection of a lentiviral vector (LV) expressing the deficient gene (Adjali et al., 2005a). Nevertheless, the efficiency of thymocyte transduction in our previous studies was extremely low, not exceeding 0.1-0.3% and efficient transduction was observed at late time points only because of the selective advantage of the gene-corrected thymocytes. Attempts to transpose this lentiviral-based thymocyte transduction strategy to macaques was unfortunately not successful; despite thorascopic-guided injection of high titer lentiviral vector stocks into the macaque thymus, we were unable to detect any thymus transduction (unpublished observations). Because of the potential of an intrathymic gene transfer strategy in immune modulation, it is important to develop tools for efficient thymocyte transduction in both mice and primates.

Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV) vectors hold great promise for gene transfer therapies. They allow long-term gene expression from both episomal and integrated forms of the viral genome, particles of high titer and purity can be produced, and in the vast majority of cases, administration is not associated with pathogenicity or toxicity (reviewed in Le Bec and Douar, 2006). In contrast with retroviral-based vectors, they are capable of infecting dividing as well as non-dividing cells and have not been associated with insertional mutagenesis. Moreover, as compared to adenovirus-based vectors, rAAV does not induce a significant immune response and is not associated with any human disease.

rAAV vectors are derived from single stranded DNA parvoviruses. The transduction efficiency of “conventional” rAAV2 vectors is known to be tissue-dependent with significant gene transfer in muscle and brain (Griffey et al., 2006; Kaplitt et al., 1994; Kaplitt et al., 1996; McCown et al., 1996; Sondhi et al., 2005; Xiao et al., 1997) and only low level infection of hematopoietic cells (Hargrove et al., 1997; Malik et al., 1997; Nathwani et al., 2000). Notably though, several other AAV serotypes, differing from the conventional AAV2 serotype in their expression of a distinct capsid protein, have been isolated from primates. These 12 AAV serotypes display different tissue and cell tropisms *in vivo* and *in vitro*, and as such, modulating the serotype may significantly enhance the ability to transduce a specific organ/ cell type with an AAV-derived vector (reviewed in Choi et al., 2005; Gao et al., 2005). Indeed, cross-packaging an rAAV2 vector into the capsid of another AAV serotype results in the transduction of a host range distinct from that of AAV2 (Grimm and Kay, 2003; Rabinowitz et al., 2002; Zhong et al., 2006). Efficient transduction by conventional single-stranded (ss) AAV vector serotypes has also been limited by the need to convert the ss genome into a transcriptionally active double-stranded (ds) form (Fisher et al., 1996). The recent advance of packaging the rAAV genome as two complementary strands in an individual AAV particle has significantly increased transduction efficiencies in hepatocytes, muscle, retina and liver (Hirata and Russell, 2000; McCarty et al., 2003; Nathwani et al., 2006; Wang et al., 2003; Yang et al., 2002). More recently, it has been shown that these self complementary (sc) rAAV vectors, which bypass the requirement for host cell-mediated viral second-strand DNA synthesis, markedly increase the transduction efficiency in murine HSC (Maina et al., 2008; Zhong et al., 2006). Studies assessing rAAV-mediated thymocyte transduction have yet to be reported.

In an attempt to achieve efficient gene transfer in the thymus, we evaluated *in situ* intrathymic

gene transfer using ss and sc rAAV2 vectors cross-packaged into the capsids of other AAV serotypes. These experiments, performed both in mice and macaques, demonstrated that an scAAV2 vector pseudotyped with the AAV8 capsid (scAAV2/8) is significantly more efficient than other serotypes in thymocyte transduction. Notably, the level of gene transfer was markedly higher than that which could be obtained with lentiviral vectors, approaching 5% of all thymocytes. Moreover, and in marked contrast with lentiviral vectors, transduction of the different thymocyte subsets reflected their relative proportion in the thymus. Importantly, thymic gene transfer resulted in the emigration of transduced T cells to the periphery, with as many as 1% of splenic/lymph node T cells expressing the harbored transgene. The efficiency of *in situ* rAAV intrathymic gene transfer in mice as well as macaques indicates the important potential of this approach in modulating T cell differentiation and immunity.

Materials and methods

rAAV constructs and production

The recombinant scAAV-GFP construct was derived from the pHPa-trs-SK plasmid (kindly provided by DM McCarty, University of North Carolina, NC, USA) encoding the eGFP (green fluorescent protein) under the control of the CMV promoter. This promoter was excised and replaced by the PGK promoter. The second pA signal (BGH pA signal) was excised. To construct the ssAAV-GFP plasmid, the entire PGK-EPO-SV40 fragment was excised from scAAV-GFP and inserted into psub201.

rAAV-1, rAAV-2, rAAV-4, rAAV-5 and rAAV-8 vectors stocks were produced by cotransfection of 293T cells with vector plasmid and an adenoviral plasmid providing helper functions needed for rAAV assembly, as previously described (Chenuaud et al., 2004). All vectors were purified by cesium chloride and dialysed against Ca^{2+} / Mg^{2+} - containing PBS. Vectors titers were determined by the dot-blot method to provide the number of particles/ml based on the quantification of viral DNA. The number of infectious particles/ml in the rAAV stocks was determined using a stable rep-cap HeLa cell line in a modified Replication Center Assay (RCA), as described previously (Salveti et al., 1998). Each scAAV vector was calculated as containing 2 copies of ss viral genomes.

Intrathymic and intraveinuous injection of recombinant scAAV vectors in mice and macaques.

C57Bl/6 mice were maintained under specific pathogen-free conditions in the IGMM animal facility (Montpellier, France). Injections were performed in 3-4 weeks old mice non-conditioned. Intraveinuous injection (100 μl) were performed in the tail vein. Mice were injected in the thymus with rAAV vectors (1.10^{10} or 4.10^{11} vg) or PBS alone, in a total volume of 10 μl , directly through the skin into the thoracic cavity immediately above the sternum, using a 0.3 ml 28 gauge 8 mm insulin syringe as previously described (Adjali et al., 2005a). Mice were anesthetized using an oxygen/isoflurane (evaporator Isotec3, TEM, Lormont, France). Mice were sacrificed 3, 10 and 30 days post-injection as indicated.

Two 3 year old cynomolgus macaques (*macaca fascicularis*) were purchased from BioPrim (Baziège, France). Neutralization assays were performed to assure that these animals did not harbor neutralizing antibodies against rAAV-8 particles. Animals were anesthetized with

ketamine and medetomidine and maintained using an oxygen/isoflurane mix. Morphine and atropine were administered subcutaneously.

rAAV vector injections were performed under thoracoscopic guidance, resulting in the delivery of 2×10^{13} vector genomes per animal at 2-3 sites in the right thymic lobe in a total volume of 1 ml. Serum samples were repeatedly collected as soon as 30 min post-injection and subsequently (6 hours, 1, 3, 7, 10, 21 and 30 days post-injection). Infectious rAAV particles were detected in serum samples obtained between 0.5 and 24 hours post-injection, but not at later time points, as assessed by an RCA assay (**Table 1**). Animals were thymectomized 10 days following injection and spleen and lymph nodes biopsies were obtained 30 days post-injection. Thymus, lymph node and spleen biopsies from non-injected macaques were used as controls.

All experiments were approved by the local animal facility Institutional Review Board in accordance with national guidelines.

Flow cytometry.

Cells isolated from thymus, spleen and lymph nodes were stained with the appropriate fluorochrome-conjugated antibodies: anti -CD4, -CD8, -CD3, -CD44, -CD25, and -CD19 antibodies (Becton Dickinson, San Jose, CA) for murine cells and anti -CD4 and -CD8 for macaques cells (BD-Pharmingen, France) as previously described (Adjali et al., 2005b). Briefly, non-specific staining was blocked by incubating cells with an anti-Fc γ RII antibody (24G2, Becton Dickinson) in PBS containing 2% FCS. Cells were then washed and incubated with the indicated antibodies diluted in PBS containing 2% FCS at 4⁰C. All acquisitions were performed on a FACSCalibur or FACSCanto (Becton Dickinson) and analyses were performed using FlowJo software (TreeStar, CA).

Quantitative real-time PCR and RT-PCR.

DNA was extracted with genomic DNA purification kit (Promega) while total RNA was isolated using TRIZol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). RNA was treated with Turbo DNaseI (Ambion) and reverse transcribed into first strand cDNA using poly-dT oligonucleotide and Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). Quantitative PCRs were performed using the GenAmp 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) with SYBR Green core reagents (Applied Biosystems). Primer sequences designed to target genomic GFP and the GFP cDNA are as follows;

5'-CACCATCTTCTTCAAGGACGA-3' and 5'-

CCATGATATAGACGTTGTGGCTG-3', and 5'-CACCATCTTCTTCAAGGACGA-3' and 5'-CCATGATATAGACGTTGTGGCTG-3', respectively. Sequences for genomic EPO (5'-GCTCCACTCCGAACCATCAC-3' and 5'-TCATCTGTCCCCTCTCCTGC-3') and HPRT cDNA (5'-CGTGATTAGCGATGATGAACC-3' and 5'-ATCCAGCAGGTCAGCAAAGA-3') are indicated. Thermal cycling conditions comprised a 2 min incubation at 50°C, a 10 min denaturation at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 15 sec), annealing (60°C for 1 min), extension (T_m for 15 sec), and 10 min at 72°C. T_m was 79°C for HPRT and the genomic and cDNA sequences of GFP and 77°C for Epo. For DNA samples, Ct values were compared to those obtained using dilutions of plasmids harboring GFP and Epo sequences, respectively. The ratio between transgene and genomic DNA copy number provided the amount of transgene copy per cell. For cDNA samples, relative expression of GFP, after normalization to HPRT values, was calculated as $2^{-(Ct_{GFP} - Ct_{HPRT})}$.

Immunohistochemistry.

Thymus and spleen samples were embedded in inclusion compound (Sakura finetek, Torrance, CA), frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen and stored at -80°C. Transverse thymus and spleen cryosections (10µm) were cut using a Leica CM 3050S cryostat. Frozen sections were mounted on slides with mounting medium (Mowiol medium, Calbiochem, Strasbourg) and examined for GFP expression using a laser scanning confocal microscope (C1-Nikon TE-2000) equipped with a blue argon laser emitting at 488nm. 10µm sections subjected to immunohistochemistry were thawed and rehydrated with PBS. Non-specific antigen binding was blocked in PBS containing 20% goat serum (blocking buffer). Sections were then stained by overnight incubation at 4°C in blocking buffer containing the following primary antibodies at the indicated dilutions: anti-CTK pAb, 1:40 (Signet, UK), anti-S100 pAb, 1:100 (Dakocytomation, France) and an anti-CD4 mAb, 1:25 (Becton Dickinson, San Jose, CA). After washing with PBS, sections were incubated with biotinylated goat anti-mouse or anti-rabbit antibodies, dilution 1:300 (ref E433 and E432 respectively, Dakocytomation, France), followed by an Alexa555 streptavidin complex, dilution 1:2000 (Molecular Probes, Eugene, OR). Sections were counterstained with topro-3 (1:1000, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) to stain nuclei, mounted and serially scanned using a confocal microscope (C1-Nikon TE-2000).

Results

scAAV2/8 vectors efficiently transduce murine thymocytes *in vivo*.

To determine whether AAV vectors are capable of *in situ* transduction of murine thymocytes, we produced self-complementary (sc) and single stranded (ss) AAV vectors pseudotyped with capsid proteins of different serotypes (AAV2/1, AAV2/2, AAV2/4, AAV2/5 and AAV2/8). The AAV vectors encoded the green fluorescent protein (eGFP) under the control of a constitutive promoter (PGK). These ten AAV vectors were injected either directly into the thymus of infant mice or administered intravenously (IV). One month later, mice were sacrificed and GFP expression in the thymus was quantified by real time RT-PCR. As shown in **Figure 1**, IT administration of scAAV vectors resulted in a significantly higher expression of the GFP transgene than ssAAV transduction. Amongst the scAAV vectors, there was at least a 5-fold higher level of GFP expression following administration of the 2/8 serotype as compared to all other serotypes tested (**Fig. 1**). Importantly, the route of administration had a major impact on thymus transduction as transgene expression in the thymus was significantly lower following IV rAAV administration, independently of the serotype tested (**data not shown**). As such, in all subsequent experiments designed to optimize gene transfer in thymus, we chose to administer the scAAV2/8 vector via the intrathymic route.

In order to characterize the kinetics of *in vivo* scAAV2/8 transduction as well as the phenotypes of transduced cells, mice were sacrificed at 3, 10 and 30 days following IT administration. The percentage of transduced cells, monitored as a function eGFP expression, was maximal 2 days after scAAV2/8 administration (3.65% +/- 1.2), decreasing by day 10 and remaining stable until at least day 30 (0.2 +/- 0.01 and 0.15 +/- 0.07, respectively) (**Fig. 2A**). At 72h post-injection, intrathymic administration of an scAAV2/8 vector resulted in efficient transduction of all thymocyte populations (**Fig. 2B**), epithelial cells and dendritic cells (**Fig. 2C**). The percentages of scAAV-transduced thymocytes within the double negative (DN, CD4-CD8-), double positive (DP, CD4+CD8+) and single positive mature (SP, CD4+CD8- and CD4-CD8+) subsets ranged from 4-8% and reflected their presence in the thymus (**Fig. 2B** and data not shown). Moreover the distribution of eGFP+ cells within the DN sub-populations, distinguished as DN1 to DN4, was similar to that observed for the total DN subset (**Fig. 2B**). These data are in marked contrast with those obtained following *in situ* intrathymic transduction using high titer lentiviral vector preparations (5×10^8 TU) wherein

only 0.3% of DN and 0.1% of DP thymocytes were transduced ((Adjali et al., 2005a) **and data not shown**).

Between 3 and 30 days post scAAV transduction, there was an evolution in the distribution of scAAV-transduced thymocyte populations. There was an initial increase in the relative transduction of mature SP thymocytes (reaching 50% of transduced cells), likely due to the differentiation of immature transduced progenitors. Surprisingly though, significant percentages of transduced DN cells were still detected at days 10 and 30 after *in vivo* transduction (11% and 14%, respectively, in a representative thymus). Given the kinetics of thymocyte differentiation wherein cells can proceed from DN to mature SP cells in approximately 4 weeks (Porritt et al., 2003), our data suggest that progenitors are transduced by AAV and these transduced progenitors remain viable for at least 4 weeks following transduction, pursuing their differentiation pathway.

scAAV-transduced thymocytes differentiate and emigrate to the periphery

To determine whether *in situ*-transduced thymocytes differentiate and migrate into the peripheral circulation, lymph nodes (LN) and spleens of intrathymically-injected scAAV-mice were analyzed 3, 10 and 30 days after vector administration. Transduction of peripheral lymphocytes was analyzed by RT-PCR and flow cytometry for the presence of eGFP. In both the LN and spleen, the emergence of eGFP expressing cells followed a bell-shaped curve (**Fig. 3A and B**). As expected, at day 3 post intrathymic injection, the percentage of eGFP⁺ lymphocytes in the periphery was extremely low, <0.07%. Importantly though, by 10 days post injection, the percentage of eGFP⁺ cells in the spleen or LN reached approximately 1% of all cells. The significance of these data is notable as these mice have a full lymphocyte compartment and the transduced cells do not have a selective advantage as compared to their non-transduced counterpart. This latter point is shown by our finding that by day 30, there is a prominent decrease in the percentage eGFP⁺ cells, decreasing to 0.1-0.3%. These data are in accord with our findings in the thymus; namely, that the highest percentages of mature SP thymocytes are detected at day 10 and decrease thereafter. As expected, at all time points assessed, the transduced peripheral LN and splenic cells had a CD3⁺ phenotype with quasi undetectable numbers of CD19⁺ B cells (0.02 $\pm$ 0.02%) (**Fig. 3C** and data not shown). Moreover, the ratio between transduced CD4 and CD8 T cells was in the normal range (1.7-2.3), strongly suggestive of an equivalent selection, emigration and short-term persistence of AAV-transduced CD4 as well as CD8 lineage cells. The finding that these T lymphocytes had

T a naïve phenotype (CD44^{low}/CD62L^{high}, data not shown) are further supportive of their recent emigration from the thymus, and moreover, indicate that AAV transduction does not *per se* activate these lymphocytes resulting in their acquisition of an effector or memory phenotype.

Thymocyte transduction in macaques intrathymically injected with an scAAV2/8 vector

To better establish the clinical potential of an intrathymic AAV-mediated gene therapy approach, we tested the efficiency of scAAV2/8 administration in macaques. We first assessed whether this technique was feasible in macaques by thoracoscopy. Indeed, we determined that this technique could be easily and safely translated in macaques, with accurate targeting of the thymus in anesthetized animals requiring a total procedure time of less than 15 min. Following this validation step, scAAV2/8 was injected in the right thymic lobes of two macaques in a total of 2-3 sites (total volume, 1 ml) and 10 days later, the macaques were thymectomized. Each thymic lobe was separated in 4 sections as shown in the schema in **Fig. 4A** and scAAV2/8 transduction in each section was quantified by PCR (**Fig. 4B**). Transduction varied between sections, most likely correlating with the zone of injection. Notably, in the most efficiently transduced thymocyte section, transduction reached 3 scAAV2/8 genome copies/thymocyte while thymocytes in adjacent/contiguous zones harbored between 1 and 1.5 copies of eGFP (**Fig. 4B**). In the non-injected left lobe, eGFP was also detected, albeit at significantly lower levels. Comparable localizations were obtained in the second macaque, but with lower levels of vector detected (data not shown). Analysis of the transduced cells by flow cytometry revealed a transduction of all thymocyte subsets (**Fig. 4C**). Finally, it is notable that the percentage of macaque thymocytes expressing the scAAV transgene was similar to that which we observed in the mouse, reaching 2%.

Transduced T lymphocytes are detected in macaques intrathymically injected with an scAAV2/8 vector

As scAAV2/8 vector transduction was detected in macaque thymocytes following intrathymic injection, we were interested in determining whether this would translate to transgene expression in lymph nodes and spleen. Indeed, one month following intrathymic injection of scAAV2/8, the two macaques underwent splenectomy and inguinal lymph node biopsies. As shown in **Fig. 5A**, eGFP transgene expression was detected in both the LN and spleen of the two macaques, but at a 10-fold higher level in the spleen. By immunocytochemistry, eGFP+CD4+

T cells were also detected in the spleen, signal localizing in a splenic nodule (**Fig. 5B**). Thus, intrathymic scAAV2/8 administration results in the differentiation of transduced thymocytes in both mice and macaques with mature transduced T cells in the periphery.

References

- Adjali, O., Marodon, G., Steinberg, M., Mongellaz, C., Thomas-Vaslin, V., Jacquet, C., Taylor, N., and Klatzmann, D. (2005a). In vivo correction of ZAP-70 immunodeficiency by intrathymic gene transfer. *Journal of Clinical Investigation* 115, 2287-2295.
- Adjali, O., Vicente, R. R., Ferrand, C., Jacquet, C., Mongellaz, C., Tiberghien, P., Chebli, K., Zimmermann, V. S., and Taylor, N. (2005b). Intrathymic administration of hematopoietic progenitor cells enhances T cell reconstitution in ZAP-70 severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13586-13591.
- Chenuaud, P., Larcher, T., Rabinowitz, J. E., Provost, N., Joussemet, B., Bujard, H., Samulski, R. J., Favre, D., and Moullier, P. (2004). Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther* 9, 410-418.
- Choi, V. W., McCarty, D. M., and Samulski, R. J. (2005). AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther* 5, 299-310.
- DeMatteo, R. P., Chu, G., Ahn, M., Chang, E., Barker, C. F., and Markmann, J. F. (1997). Long-lasting adenovirus transgene expression in mice through neonatal intrathymic tolerance induction without the use of immunosuppression. *J Virol* 71, 5330-5335.
- Fisher, K. J., Kelley, W. M., Burda, J. F., and Wilson, J. M. (1996). A novel adenovirus-adenovirus-associated virus hybrid vector that displays efficient rescue and delivery of the AAV genome. *Hum Gene Ther* 7, 2079-2087.
- Gao, G., Vandenberghe, L. H., and Wilson, J. M. (2005). New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther* 5, 285-297.
- Griffey, M. A., Wozniak, D., Wong, M., Bible, E., Johnson, K., Rothman, S. M., Wentz, A. E., Cooper, J. D., and Sands, M. S. (2006). CNS-directed AAV2-mediated gene therapy ameliorates functional deficits in a murine model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Mol Ther* 13, 538-547.
- Grimm, D., and Kay, M. A. (2003). From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 3, 281-304.
- Hargrove, P. W., Vanin, E. F., Kurtzman, G. J., and Nienhuis, A. W. (1997). High-level globin gene expression mediated by a recombinant adeno-associated virus genome that contains the 3' gamma globin gene regulatory element and integrates as tandem copies in erythroid cells. *Blood* 89, 2167-2175.

Hirata, R. K., and Russell, D. W. (2000). Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors. *J Virol* 74, 4612-4620.

Kaplitt, M. G., Leone, P., Samulski, R. J., Xiao, X., Pfaff, D. W., O'Malley, K. L., and During, M. J. (1994). Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet* 8, 148-154.

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.

Khoury, S. J., Sayegh, M. H., Hancock, W. W., Gallon, L., Carpenter, C. B., and Weiner, H. L. (1993). Acquired tolerance to experimental autoimmune encephalomyelitis by intrathymic injection of myelin basic protein or its major encephalitogenic peptide. *J Exp Med* 178, 559-566.

Le Bec, C., and Douar, A. M. (2006). Gene therapy progress and prospects--vectorology: design and production of expression cassettes in AAV vectors. *Gene Ther* 13, 805-813.

Maina, N., Han, Z., Li, X., Hu, Z., Zhong, L., Bischof, D., Weigel-Van Aken, K. A., Slayton, W. B., Yoder, M. C., and Srivastava, A. (2008). Recombinant self-complementary adeno-associated virus serotype vector-mediated hematopoietic stem cell transduction and lineage-restricted, long-term transgene expression in a murine serial bone marrow transplantation model. *Hum Gene Ther* 19, 376-383.

Malik, P., McQuiston, S. A., Yu, X. J., Pepper, K. A., Krall, W. J., Podsakoff, G. M., Kurtzman, G. J., and Kohn, D. B. (1997). Recombinant adeno-associated virus mediates a high level of gene transfer but less efficient integration in the K562 human hematopoietic cell line. *J Virol* 71, 1776-1783.

Marodon, G., Fisson, S., Levacher, B., Fabre, M., Salomon, B. L., and Klatzmann, D. (2006). Induction of antigen-specific tolerance by intrathymic injection of lentiviral vectors. *Blood* 108, 2972-2978.

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.

McCown, T. J., Xiao, X., Li, J., Breese, G. R., and Samulski, R. J. (1996). Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector. *Brain Res* 713, 99-107.

Nathwani, A. C., Gray, J. T., Ng, C. Y., Zhou, J., Spence, Y., Waddington, S. N., Tuddenham, E. G., Kemball-Cook, G., McIntosh, J., Boon-Spijker, M., et al. (2006). Self-complementary

adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* 107, 2653-2661.

Nathwani, A. C., Hanawa, H., Vandergriff, J., Kelly, P., Vanin, E. F., and Nienhuis, A. W. (2000). Efficient gene transfer into human cord blood CD34⁺ cells and the CD34⁺CD38⁻ subset using highly purified recombinant adeno-associated viral vector preparations that are free of helper virus and wild-type AAV. *Gene Ther* 7, 183-195.

Porritt, H. E., Gordon, K., and Petrie, H. T. (2003). Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J Exp Med* 198, 957-962.

Posselt, A. M., Barker, C. F., Friedman, A. L., and Naji, A. (1992). Prevention of autoimmune diabetes in the BB rat by intrathymic islet transplantation at birth. *Science* 256, 1321-1324.

Rabinowitz, J. E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., and Samulski, R. J. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 76, 791-801.

Salveti, A., Oreve, S., Chadeuf, G., Favre, D., Cherel, Y., Champion-Arnaud, P., David-Ameline, J., and Moullier, P. (1998). Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* 9, 695-706.

Sondhi, D., Peterson, D. A., Giannaris, E. L., Sanders, C. T., Mendez, B. S., De, B., Rostkowski, A. B., Blanchard, B., Bjugstad, K., Sladek, J. R., Jr., et al. (2005). AAV2-mediated CLN2 gene transfer to rodent and non-human primate brain results in long-term TPP-I expression compatible with therapy for LINCL. *Gene Ther* 12, 1618-1632.

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.

Xiao, X., Li, J., McCown, T. J., and Samulski, R. J. (1997). Gene transfer by adeno-associated virus vectors into the central nervous system. *Exp Neurol* 144, 113-124.

Yang, G. S., Schmidt, M., Yan, Z., Lindbloom, J. D., Harding, T. C., Donahue, B. A., Engelhardt, J. F., Kotin, R., and Davidson, B. L. (2002). Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol* 76, 7651-7660.

Zhong, L., Li, W., Li, Y., Zhao, W., Wu, J., Li, B., Maina, N., Bischof, D., Qing, K., Weigel-Kelley, K. A., et al. (2006). Evaluation of primitive murine hematopoietic stem and progenitor cell transduction in vitro and in vivo by recombinant adeno-associated virus vector serotypes 1 through 5. *Hum Gene Ther* 17, 321-333.

Table 1 : Detection of rAAV2/8GFP infectious particles/ml in serum by mRCA

	0	30 min	6 h	1 day	3 days	7 days	10 days	21 days	30 days
Mac 1	$< 5 \times 10^2$	2.7×10^4	9.3×10^6	1×10^7	$< 5 \times 10^2$	$< 5 \times 10^2$	$< 5 \times 10^2$	$< 5 \times 10^2$	$< 5 \times 10^2$
Mac 2	$< 5 \times 10^2$	1.3×10^5	1.5×10^7	8.5×10^6	$< 5 \times 10^2$	$< 5 \times 10^2$	$< 5 \times 10^2$	$< 5 \times 10^2$	$< 5 \times 10^2$

Figure Legends

Figure 1. **Influence of genome configuration and capsid proteins on *in vivo* thymus cells transduction efficiency.** ss and scAAV vectors based on the AAV2 backbone and expressing the GFP transgene were pseudotyped with capsid proteins of serotype 1, 2, 4, 5, and 8. 1×10^{10} vector-genome (vg)-containing particles of the indicated ss and scAAV vectors were injected directly into the thymi of 3-4 week old mice. Thymocytes were harvested from euthanized animals 30 days following AAV administration. *In vivo* expression of eGFP was assessed by qRT-PCR in duplicate samples and all data were normalized to HPRT. Normalized means $\pm$ SD of arbitrary units (AU) are shown.

Figure 2. **Kinetics of transgene expression and phenotype of transduced cells following *in vivo* intrathymic administration of scAAV2/8.** (A) Mice were injected intrathymically with 4×10^{11} vg-containing scAAV2/8 particles. Thymocytes were harvested from euthanized animals at days 3, 10, and 30 post injection and the percentages of eGFP+ thymocytes were assessed by flow cytometry. The means $\pm$ SD of three animals are shown for each time point. (B) Flow cytometry data showing the percentages of GFP+ cells as a function of side scatter (SSC) are presented at days 0, 3, 10 and 30 (top row). The phenotype of the eGFP+ cells was assessed as a function of CD4 and CD8 expression, allowing double negative (CD4-/CD8-), double positive (CD4+/CD8+) and mature single positive cells (CD4+, CD8+) to be distinguished (middle row). Double negative (DN) cells were further phenotyped on the basis of CD44 and CD25 expression distinguishing DN1 (CD44+CD25-), DN2 (CD44+CD25+), DN3 (CD44-CD25+) and DN4 (CD44-CD25-) subsets (bottom row). All dot plots are compared to the total thymocyte profiles (left panels). (C) Immunohistochemical analyses of thymic stromal cells from mice injected 10 days before with AAV2/8 sc vectors. eGFP+ cells are shown in panels a and d, CTK and S100 (staining of epithelial and dendritic cells, respectively) in panels b and e, and overlays in panels c and f.

Figure 3. **Thymocytes transduced by *in situ* injection of a scAAV2/8 vector differentiate and migrate to the periphery.** (A) Expression of the eGFP transgene was monitored in the lymph nodes and spleens of mice intrathymically injected with the scAAV2/8 vector. Expression was assessed by quantitative RT-PCR at days 3, 10 and 30 and was normalized to HPRT. Normalized means $\pm$ SD of arbitrary units (AU) are shown for duplicate samples.

(B) The percentages of lymph node and spleen cells expressing the eGFP transgene was also monitored by flow cytometry. The means $\pm$ SD of three animals are shown for each time point. (C) The phenotypes of transduced lymphocytes at day 10 following intrathymic scAAV2/8 administration was monitored by staining with anti-CD3 and anti-CD19 antibodies. The expression of the eGFP transgene in these subsets is shown in representative dot plots and is compared with expression in mock-transduced mice (PBS).

Figure 4. ***In vivo* administration of scAAV2/8 in a macaque thymus results in the transduction of differentiating thymocytes.** (A) Two 3 year old cynomolgus macaques were injected intrathymically in the right lobe with 2×10^{13} vg-containing scAAV2/8 particles in two or three point. Ten days following injection, thymi were removed under general anesthesia and 4 sections were made from each lobe, shown here in the schematic diagram and labelled as A to D. (B) Transduction efficiencies in the various sections were assessed by quantitative PCR of the eGFP transgene. All values were normalized to Epo and the mean numbers of eGFP copies per genomic DNA $\pm$ SD of duplicate samples are shown. (C) Flow cytometry data showing the percentages of eGFP⁺ cells as a function of side scatter (SSC) in the section B and A from right (right panels) and left (left panels) lobes, respectively, from a representative macaque injected 10 days previously with the scAAV2/8 vector (top row). The phenotypes of eGFP⁺ thymocytes in comparison to the total thymocyte population are shown as a function of CD4 and CD8 expression.

Figure 5. ***In situ* thymus injection of an scAAV2/8 vector in macaques results in the differentiation and migration of transduced thymocytes.** (A) Expression of the eGFP transgene was monitored following *in vivo* intrathymic administration of a scAAV2/8 vector in macaques (right lobe). Expression was assessed by quantitative RT-PCR in lymph nodes and spleen at day 30 following scAAV2/8 injection. The mean numbers of eGFP copies per genomic DNA $\pm$ SD are shown for samples from the two macaques. (B) Expression of eGFP in splenic sections was monitored by immunohistochemistry. Hematoxylin-eosin-safran staining is shown in panel a with centrale arteriole (CA), capsule (Cp) and cap (C) noted, eGFP⁺ cells are shown in panel b, CD4 staining is shown in panel c, and merges are shown in panel d (colocalizations are indicated by arrows).

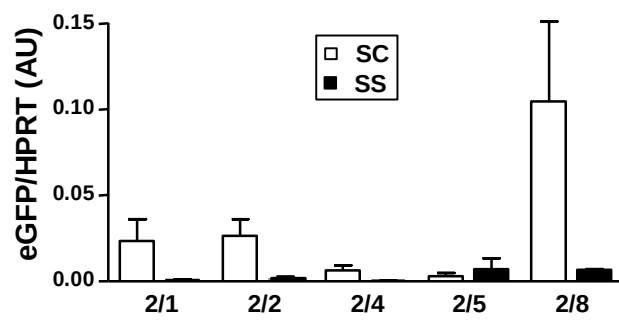


Figure 1: Influence of genome configuration and capsid proteins on *in vivo* thymus cells transduction efficiency.

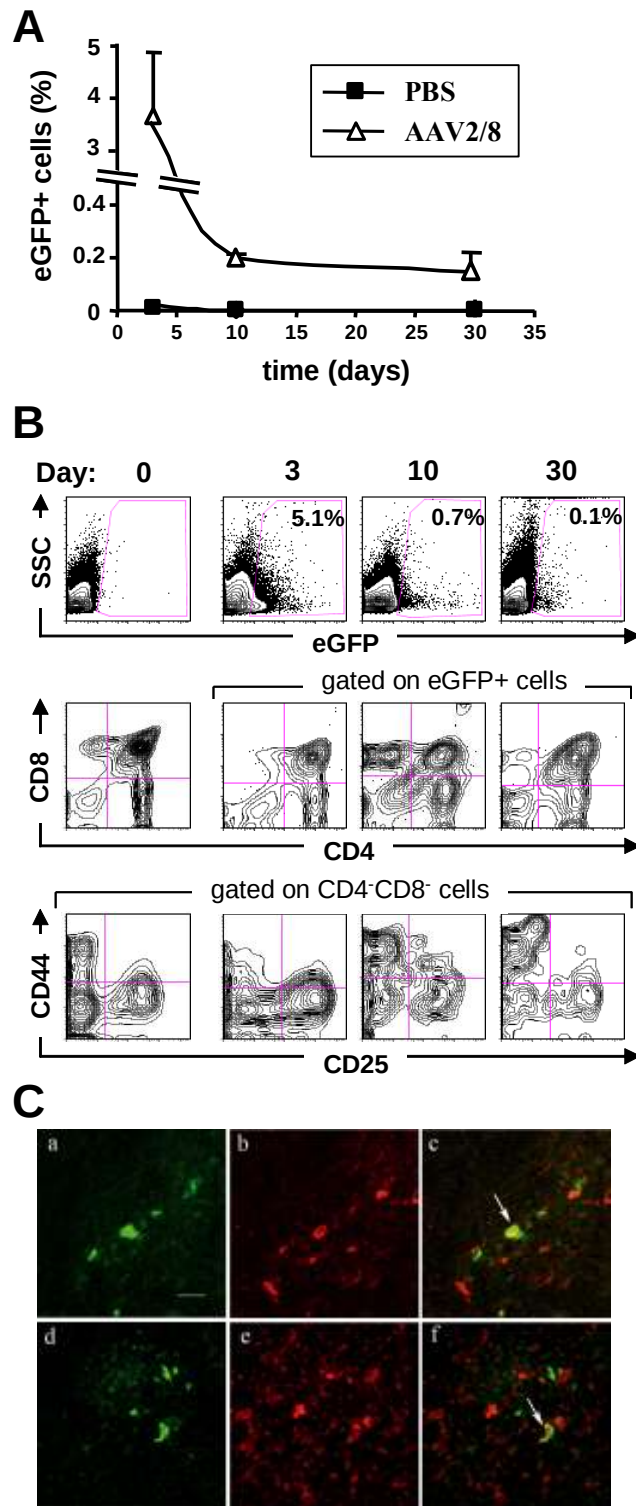


Figure 2: Kinetics of transgene expression and phenotype of transduced cells following *in vivo* intrathymic administration of scAAV2/8

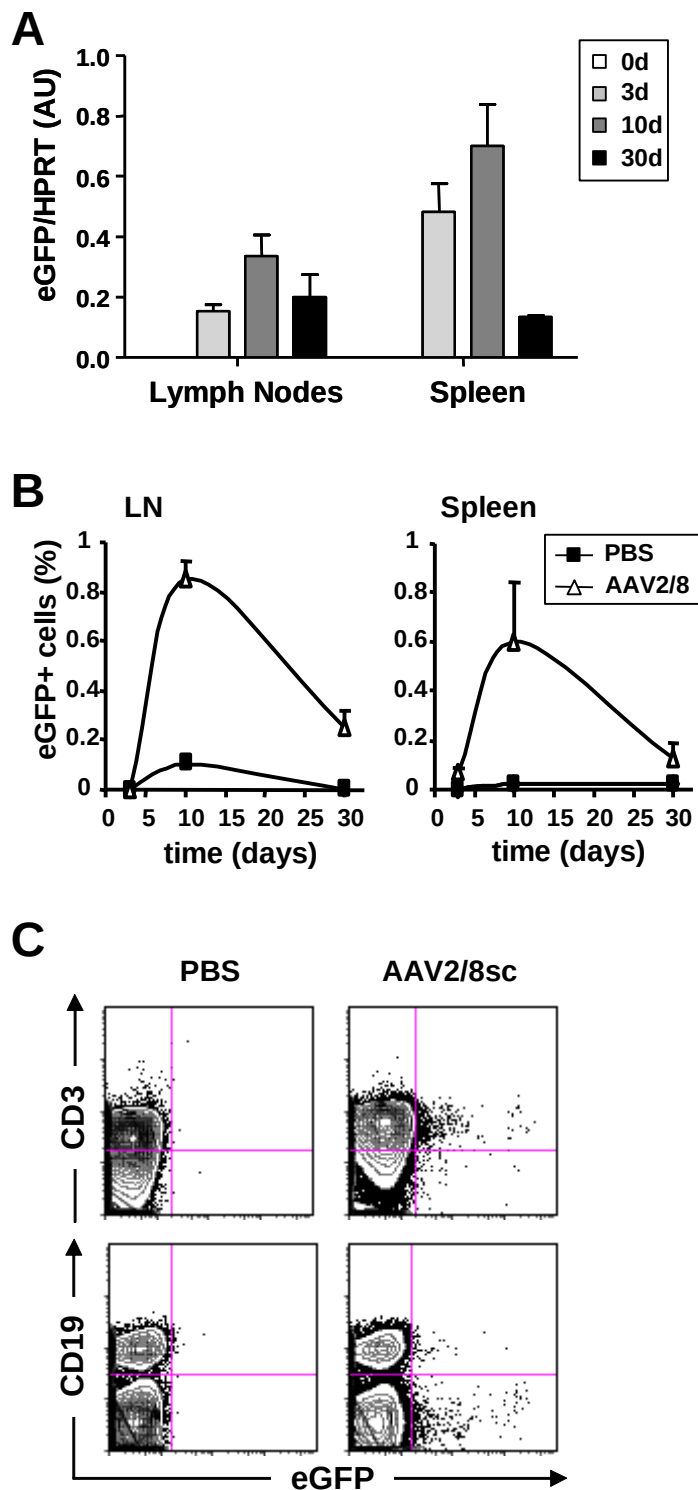


Figure 3: Thymocytes transduced by *in situ* injection of a scAAV2/8 vector differentiate and migrate to the periphery

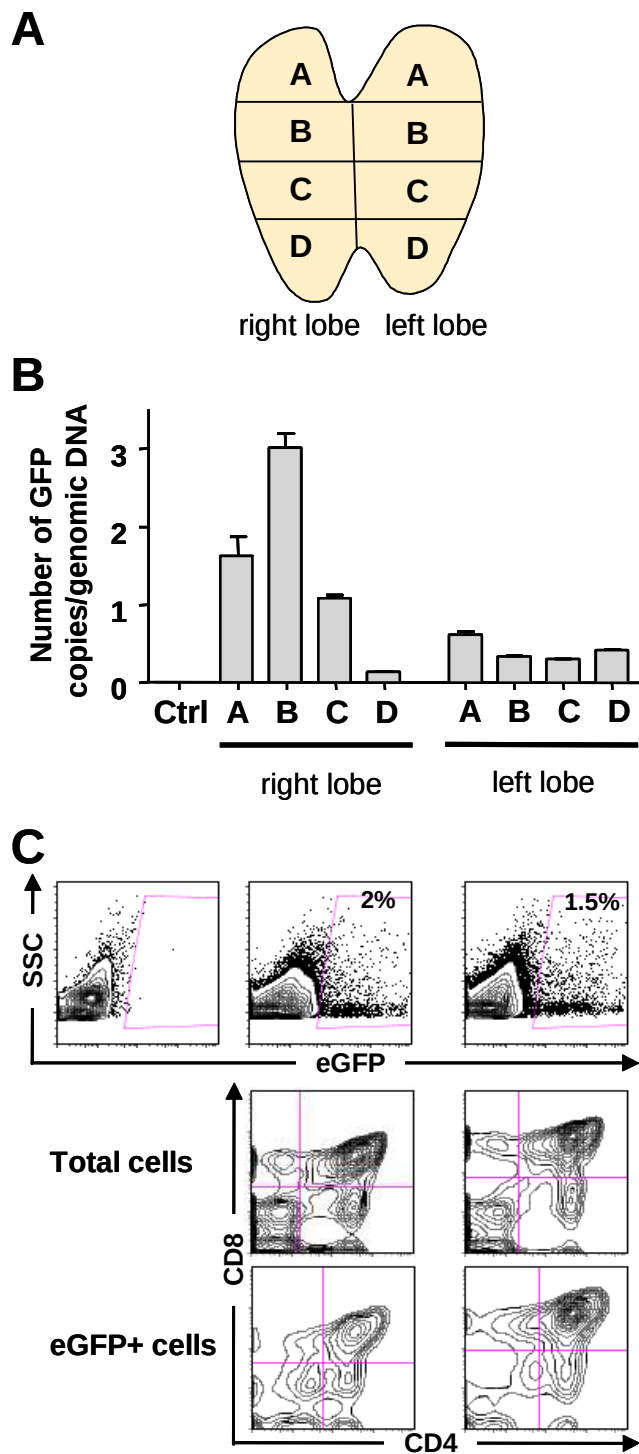
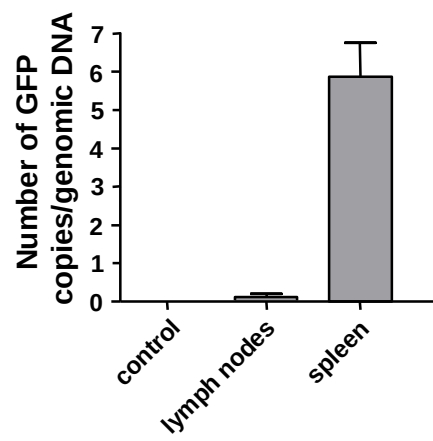
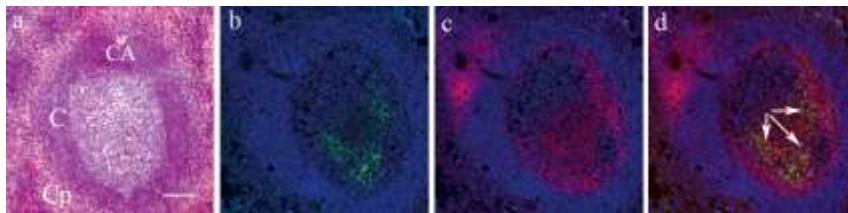


Figure 4: *In vivo* administration of AAV2/8sc in a macaque thymus results in the transduction of differentiating thymocytes

A**B**

C Cap
CA Central arteriole

Figure 5: *In situ* thymus injection of an scAAV2/8 vector in macaques results in the differentiation and migration of transduced thymocytes.

III.C- Développement d'une réponse immunitaire chez le primate (résultats supplémentaires)

La réponse immunitaire a été étudiée chez les deux macaques injectés avec l'AAV8r-GFP, une réponse humorale contre le transgène et contre l'AAVr de sérotype 8 a été observée. La réponse humorale contre la GFP a été détectée par Western Blot. Pour cela, nous transférons sur membrane de nitrocellulose de la protéine GFP dénaturée. La membrane est ensuite incubée avec le sérum des animaux. La présence d'anticorps anti-GFP dans le sérum est détectée par l'anticorps secondaire anti-IgG de singe (Figure 13). L'étude des sérologies AAV8 des animaux montre une séroconversion des 2 singes suite à l'administration des vecteurs. La présence de ces anticorps peut être corrélée à la fuite du vecteur en périphérie. Ainsi, des particules infectieuses d'AAV8r dans le sérum ont été détectées 30 minutes après injection intra-thymique de l'AAVr (table 1 de l'article I). Dans l'article I, nous n'avons pas évoqué la transduction du foie des animaux car l'objectif était de mettre en évidence la transduction du thymus par l'AAVr et nous ne souhaitons pas faire une étude de biodistribution du vecteur, c'est pourquoi seule la présence de la GFP dans les organes lymphoïdes secondaires a été décrite. Les résultats obtenus dans le foie montrent une forte transduction des cellules chez la souris et le singe visible par immunohistologie (macaque Figure 14A). Le nombre de copies du transgène dans le foie des animaux est important ; chez le macaque, il est environ 10 fois supérieur à celui obtenu dans le thymus. Lors de l'analyse d'une seconde biopsie de foie réalisée 4 mois post-injection, le nombre de copies du transgène ainsi que la quantité de cellules transduites sont quasiment nuls (Figure 14A). De plus, l'étude HES (marquage Hématoxyline/Eosine/Safran) du foie (à 1 et 4 mois) montre un infiltrat important (Figure 14B).

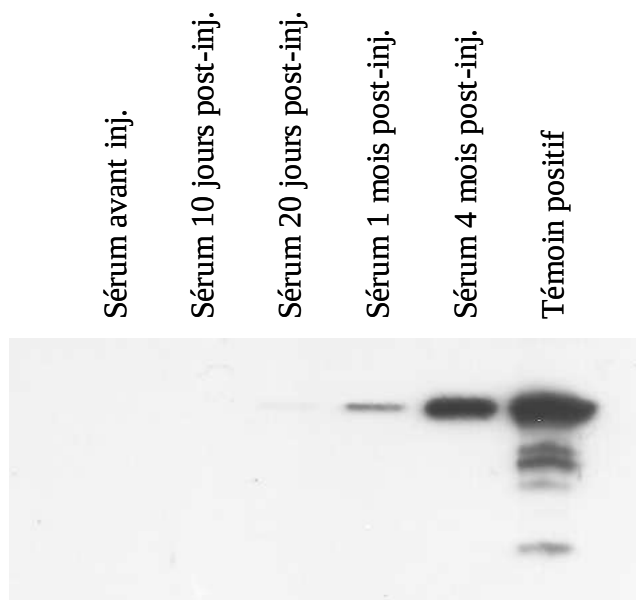


Figure 13 : Observation de la présence d'anticorps anti-GFP dans le sérum des animaux à différents temps post-injection de l'AAVr.

Les sérums récoltés à différents temps sont mis en présence de protéine GFP commerciale dénaturée. La présence d'anticorps anti-GFP dans les sérums est détectée à l'aide d'un anticorps anti-IgG de macaque couplé à la peroxydase puis révélée par un kit d'électrochimio-luminescence. Dans le témoin positif, la GFP est détectée par un anticorps anti-GFP commercial fait chez le lapin puis par un anticorps anti-IgG de lapin.

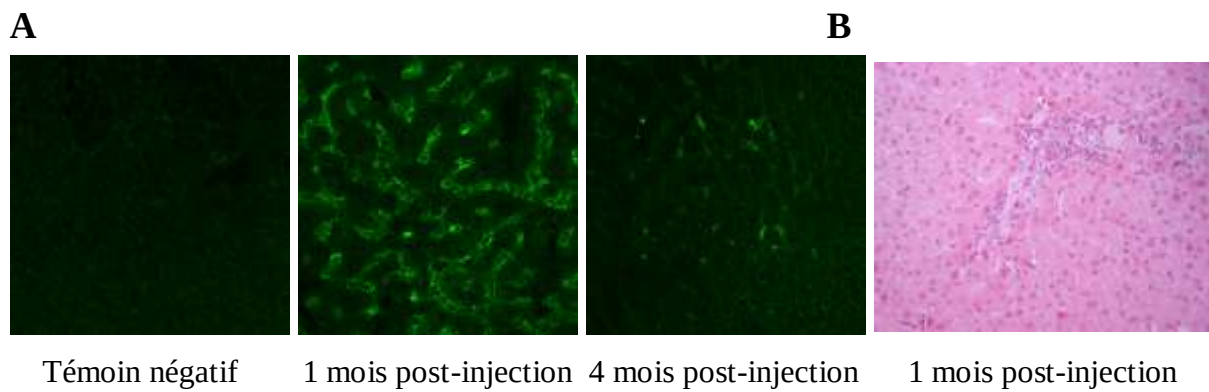


Figure 14 : Immunohistologie réalisée sur les foies de macaque

A. Des coupes de foie des primates ont été observées au microscope à fluorescence (confocal) lors des biopsies réalisées à 1 mois et à 4 mois post-injection. (grossissement x 40). B. Coloration HES des coupes de foie sur la biopsie réalisée 1 mois post-injection (grossissement x 25).

IV. Discussion

IV.A- Efficacité de transduction du thymus à l'aide de vecteurs AAVr

IV.A.1. Efficacité des AAVr par rapport aux vecteurs lentiviraux dans la transduction du thymus

Les études d'infection du thymus menées précédemment chez la souris à l'aide de vecteurs LV montraient une efficacité maximale de transduction inférieure à 0.3% (Adjali et al., 2005b). L'utilisation d'un vecteur scAAV8r est beaucoup plus efficace, elle permet une transduction moyenne de 3,5% des cellules du thymus à 72 heures post-injection. De plus, contrairement aux LV, les AAVr transduisent l'ensemble des thymocytes en respectant leur proportion physiologique. Les LV transduisent essentiellement les DN et quelques DP.

Une explication possible à la faible expression du transgène suite à une infection lentivirale est la présence de la protéine virale VSVG (glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculeuse). Cette protéine d'enveloppe présente à la surface des vecteurs lentiviraux permet d'augmenter l'efficacité d'infection des LV. De plus, elle favorise la stabilité des LV et ainsi permet leur concentration par ultracentrifugation, nécessaire à leur utilisation *in vivo*. Cependant, cette protéine est également connue pour sa toxicité (Cronin et al., 2005). Sa présence dans le vecteur LV-rtTA-GFP peut être responsable d'une faible expression du transgène dans le thymus de souris et l'absence d'expression dans le thymus de singe.

IV.A.2. Efficacité de l'AAV8r

L'injection de vecteurs AAVr dans le thymus des souris a mis en avant l'efficacité du sérotype 8 pour transduire le thymus. Le large tropisme du sérotype 8 est confirmé dans cette étude. Comme décrit dans l'introduction générale (paragraphe I.C.2), l'AAVr de sérotype 8 permet de transduire efficacement le muscle, le foie, le coeur et le pancréas avec une efficacité généralement supérieure aux autres sérotypes (comparaison avec les sérotypes 1 à 7) (Nakai et al., 2005; Wang et al., 2005c). Nous montrons dans cette étude son efficacité par rapport à d'autres sérotypes pour transduire un autre organe, le thymus. Plusieurs études ont également montré la forte efficacité de l'AAV8r à transduire le foie suite à des injections intra-veineuses de ce vecteur par rapport à d'autres sérotypes d'AAVr (Davidoff et al., 2005; Gao et al., 2004; Gao et al., 2002a). L'efficacité de l'AAV8r est donc intéressante pour

transduire l'organe souhaitée mais ce vecteur est peu spécifique d'organes, son passage dans la circulation entraîne donc la transduction non désirée de d'autres organes comme le foie.

Un autre avantage des AAV8r est qu'ils se produisent très bien. En effet, dans la première cohorte de souris comparant l'efficacité de différents sérotypes pour la transduction du thymus, le scAAV8r a été dilué 70 fois pour être à la même concentration que les autres AAVr. Cette forte concentration du vecteur renforce son efficacité car une injection d'un faible volume permet d'obtenir une forte quantité de particules injectées.

Dans cette étude, nous avons testé uniquement les AAVr produits au laboratoire. Il aurait également été intéressant de tester l'efficacité du sérotype AAV9r pour transduire le thymus. Ce sérotype, tout comme l'AAV8r est connu pour son tropisme large (foie, muscle, poumon) (Gao et al., 2004), il est alors envisageable que le thymus aurait été efficacement transduit par l'AAV9r. Cependant, la forte efficacité de l'AAV8r à transduire le foie, qui apparaît comme un inconvénient dans cette étude a également été observée à la suite d'injection intraveineuse d'AAV9r (Gao et al., 2004). Au moment de l'étude, nous n'avons pas testé l'AAV9r car nous avons rencontré des difficultés pour produire et faire produire ce sérotype.

IV.A.3. Efficacité des injections IT et IV

Des études ont montré que l'injection de peptides en intra-thymique était plus efficace que lors d'injection intra-veineuse (Chowdhury et al., 1996; Oluwole et al., 1999; Oluwole et al., 1993c ; Sayegh et al., 1993) (comme mentionné dans l'introduction de cette partie). De façon similaire, nous n'observons que très peu de transduction des cellules thymiques suite aux injections intra-veineuses d'AAVr.

IV.A.4. Efficacité des vecteurs sc et ss

La comparaison de la transduction des thymus de souris suite à l'injection de vecteurs sc ou ss AAVr montre l'efficacité supérieure des scAAVr à transduire le thymus. Ceci conforte de nombreuses études comparatives des 2 types de vecteurs dans différents organes (muscle, foie, cerveau, moelle épinière, œil) (Andino et al., 2007; Hollis et al., 2008; McCarty et al., 2003; Nathwani et al., 2006; Yokoi et al., 2007).

La transduction des cellules par le scAAVr est plus rapide que celle réalisée par les ssAAVr car ce vecteur ne nécessite pas la machinerie cellulaire pour se répliquer. Cette caractéristique des scAAVr est particulièrement intéressante dans notre étude. En effet, nous voulions

analyser les cellules transduites par les AAVr dans le thymus, or, la différenciation des thymocytes dure environ 28 jours chez la souris (Porritt et al., 2003). Afin d'observer les cellules transduites par le vecteur dans le thymus, il ne faut donc pas se placer trop longtemps après l'infection sinon l'observation des cellules transduites dans le thymus ne reflète pas réellement les cellules infectées par l'AAVr car une partie de ces cellules sont sorties du thymus.

IV.A.5. Observation des cellules transduites

Les cellules transduites dans le thymus par l'AAVr sont à la fois des thymocytes et des cellules résidentes.

Comme décrit dans le chapitre III.C de l'introduction générale, il existe différents stades de développement thymiques correspondant aux différentes populations de thymocytes, classées selon leur expression du CD4 et du CD8 : les DN (double négatives), les DP (double positives) et les SP (simples positives) CD4⁺ ou CD8⁺. Il existe 4 sous-types de DN qui se différencient selon leur expression de CD44 et CD25 chez la souris, les DN1, les DN2, les DN3 et les DN4. Les cellules DN1 comprennent les précurseurs des thymocytes provenant de la moelle osseuse et la différenciation se termine au stade SP. Comme évoqué précédemment, contrairement aux LV, les AAVr transduisent les différentes populations de thymocytes quel que soit leur stade de différenciation. L'observation de DN1 exprimant la GFP dans le thymus 10 jours ainsi que 30 jours après injection du vecteur pose quelques questions. En effet, la différenciation des thymocytes durant environ 28 jours chez la souris, les thymocytes transduits au stade DN1 ne devrait plus être à ce stade de différenciation lors de l'observation des cellules transduites 10 jours plus tard. De même, lors des thymectomies réalisées à 30 jours post-injection, nous pourrions nous attendre à détecter uniquement des SP GFP⁺. Nous suggérons 2 hypothèses pour expliquer ce phénomène, soit l'AAVr transduit la moelle et par conséquent des précurseurs de thymocytes avant leur arrivée dans le thymus, soit il existe une population de thymocytes qui reste au stade DN1 dans le thymus. Pour répondre à cette question, nous avons recherché la présence de cellules GFP positives dans la moelle de souris par cytométrie de flux. Nous avons détecté des cellules GFP⁺ dont le phénotype correspondait à des LT. Nous n'avons cependant pas détecté de cellules progénitrices exprimant la GFP dans la moelle osseuse. Cette absence de détection de précurseurs transduits dans la moelle n'exclut pas la possibilité de transduction de ces cellules, il est possible qu'elles soient présentes en très faible quantité et que la cytométrie ne soit pas suffisamment sensible pour

les détecter. Cependant les résultats obtenus favorisent plutôt la deuxième hypothèse, c'est-à-dire qu'il existerait une population de précurseurs des thymocytes présente de façon permanente dans le thymus. Cette hypothèse est en opposition avec les études réalisées précédemment (Goldschneider et al., 1986; Scollay et al., 1986). Dans ces études, les auteurs ont montré que les transferts de thymocytes en intra-veineuse et en intra-thymique, ainsi que le transfert de moelle osseuse en intra-thymique permettaient d'induire une différenciation transitoire des thymocytes. A l'inverse, le transfert de moelle osseuse en intra-veineuse assurait le développement des LT dans le thymus à long terme. Ces résultats suggèrent que contrairement à la moelle osseuse, le thymus ne serait par un environnement favorable au maintien des précurseurs. Il en découle un ensemencement obligatoire et régulier du thymus avec des précurseurs provenant de la moelle osseuse (Donskoy and Goldschneider, 1992; Foss et al., 2001). Pour étudier cette seconde hypothèse dans notre modèle d'étude, il serait intéressant d'isoler des cellules DN1 GFP+ puis de les injecter à un nouvel animal pour voir si ces cellules restent sous une forme DN1 ou si elles se différencient. Pour étudier la première hypothèse, nous pourrions également transférer la moelle osseuse des souris injectées avec les AAVr-GFP à de nouveaux animaux et observer l'expression de la GFP dans les thymocytes produits dans ces souris pour savoir si des précurseurs GFP sont bien présents dans la moelle osseuse.

En ce qui concerne la transduction des CPA dans le thymus, l'analyse des thymus par immunohistologie a permis de mettre en évidence la transduction des cellules résidentes du thymus (CD et cellules épithéliales) chez la souris.

Dans l'optique d'induire une tolérance à la GFP, la transduction des thymocytes n'est pas souhaitée. Seule la transduction des CPA est intéressante. Suite à l'injection intra-thymique d'AAVr, nous avons observé la transduction de CPA. Ces résultats suggèrent que le transgène peut être présenté par les CPA aux thymocytes et entraîner la délétion clonale des LT réactifs contre la GFP. Cependant, le développement d'une réponse immunitaire a été détecté chez ces animaux et la fuite du vecteur en périphérie ne nous permet pas de savoir si la transduction des CPA a pu entraîner une tolérance ou non.

Le taux de transduction des cellules thymiques suite à une injection intra-thymique d'AAVr est plus fort (au moins 10 fois supérieur) que celui obtenu suite à une injection d'un vecteur lentiviral. Si le pourcentage de transduction des CPA thymiques est similaire (ou d'une différence de 10 fois) entre les vecteurs lentiviraux et AAVr, il était donc envisageable que

l'induction de tolérance obtenue avec les vecteurs lentiviraux soit également observée suite à une injection de vecteurs AAVr. Nous savons que les AAVr sont capables de transduire les CPA thymiques mais nous ne connaissons pas le pourcentage de CPA transduits suite à l'injection des vecteurs AAVr et lentiviraux.

Nous n'avons pas regardé si des thymocytes/futurs Treg étaient transduits par la GFP dans le thymus car la présence de Treg GFP positives ne signifie pas que ces cellules sont spécifiques de la GFP. Il en est de même pour les thymocytes de façon générale. En effet, la spécificité pour la GFP est apportée suite à l'interaction des thymocytes avec des CPA exprimant la GFP associée au complexe du CMH de classe II à leur surface. L'expression de la GFP par les thymocytes (futurs Treg ou non) ne signifie donc pas que ces cellules pourraient moduler une réponse immune en périphérie.

A l'inverse, la transduction de thymocytes peut être intéressante dans une approche visant à traiter des déficiences de la différenciation des LT causées par un gène muté. Dans ce contexte, l'utilisation des AAVr pour apporter le gène normal dans les thymocytes pourrait permettre de rétablir la différenciation des LT comme cela a déjà été montré à l'aide de vecteurs lentiviraux dans des souris ZAP-70 déficientes (Adjali et al., 2005a).

IV.A.6. Diffusion du vecteur dans le thymus et la fuite en périphérie

Suite à l'administration du vecteur AAV8r dans le thymus de primate, une diffusion du vecteur aux zones adjacentes de la zone d'injection a été observée. La présence de copies du transgène a été retrouvée dans tout le thymus indiquant que le thymus est un organe où la diffusion du vecteur se fait relativement bien. A l'inverse, nous savons que dans le muscle, le nombre de copies du transgène diminue de 10 fois environ lorsque l'on se place à 1 cm du site d'injection (données du laboratoire). Dans le thymus, cette diminution est environ d'un facteur 2.

Cependant, comme dans de nombreux autres modèles d'injections d'AAVr, des particules virales sont retrouvées dans la circulation périphérique quelques heures après injection, comme décrit dans la table 1 de l'article I. Nous pensons que la fuite du vecteur en périphérie est responsable de la forte transduction du foie et du développement de la réponse immune observée chez les macaques. En effet, dans les travaux de Nathwani et al., les auteurs montrent que l'injection d'AAV8r dans la veine saphène (circulation périphérique) entraîne une forte transduction du foie (transduction similaire à celle obtenue lors de l'injection du vecteur dans la veine porte (niveau hépatique) (Nathwani et al., 2007). En ce qui concerne la

rate chez le macaque, la présence de LT GFP+ peut provenir d'une migration des LT transduits du thymus dans la rate. Cependant, sachant que nous obtenons 2 fois plus de copies du vecteur dans la rate que dans le thymus, il est fort probable qu'une partie des cellules ont été transduites dans la rate suite à la fuite du vecteur en périphérie et sa distribution dans les différents organes.

IV.B- Intérêt et difficultés d'utiliser un modèle de primate

IV.B.1. Obtention de résultats divergents chez la souris et le primate

L'intérêt d'utiliser le primate est de se mettre dans des conditions pré-cliniques et ainsi d'observer si les résultats obtenus chez la souris seraient applicables chez l'homme ou non. Le modèle de transfert de gènes développé au laboratoire montre qu'un primate développe une réponse immune à la suite d'injections d'AAVr-rtTA/EPO dans le muscle alors que la souris ne la développe pas. En parallèle, nous montrons dans cette étude que l'injection de vecteurs lentiviraux chez le primate ne permet pas de transduire le thymus dans les conditions applicables chez l'homme, contrairement aux résultats obtenus chez la souris (Marodon et al., 2006). Cela peut s'expliquer par la trop faible quantité de vecteurs injectés. Il est cependant difficile d'augmenter cette quantité aujourd'hui car ces vecteurs ont été produits par un des laboratoires référents pour la production de lentivirus (Tronolab, Suisse). De plus, le volume de vecteurs injectés dans le thymus du deuxième animal (2 ml) nous apparaît déjà maximal. L'analyse histologique du thymus ne montre pas d'inflammation ni d'infiltrats, éliminant l'hypothèse d'une destruction des cellules transduites.

IV.B.2. Mise au point d'une technique d'injection intra-thymique chez le primate

L'injection intra-thymique chez la souris est réalisée en routine dans le laboratoire de Naomi Taylor à Montpellier. Le thymus étant situé juste au dessus du cœur, une aiguille de petite taille est introduite dans la cavité située à la base du cou, au dessus du sternum.

L'injection intra-thymique des primates est plus complexe. Dans cette étude, nous avons développé une technique d'injection du thymus sous endoscopie thoracique. Les injections ont été réalisées par un chirurgien pédiatre du CHU de Nantes, Guillaume Podevin. L'utilisation d'un endoscope permet des injections précises en évitant une chirurgie thoracique lourde qui met en péril la vie de l'animal. Lors des injections intra-thymiques chez le singe, plusieurs sites d'injection ont été réalisés pour éviter d'induire une inflammation en injectant une grosse quantité de vecteurs en un seul point.

IV.B.3. Limites de l'expérimentation chez le primate

Le thymus est un organe qui involue avec l'âge et son efficacité semble surtout importante dans les premières années de vie. Il est donc important d'utiliser des animaux jeunes. Les souris sont injectées à 3 ou 4 semaines. En ce qui concerne les macaques, nous avons utilisé des animaux âgés d'environ 3 ans. Ces animaux sont pubères à l'âge de 3 ans et demi- 4 ans. Lors de la thymectomie, la taille du thymus est importante (environ 5x5cm). Il est difficile d'obtenir des singes plus jeunes pour l'expérimentation.

Le coût des primates ne nous permettait pas de réaliser une cinétique chez le macaque. Il fallait donc choisir une seule date pour la thymectomie. Les résultats chez la souris montrent une transduction maximale du thymus à 3 jours. De plus, comme la différenciation des thymocytes dure environ 28 jours (chez la souris), nous devions réaliser la thymectomie avant ce temps si nous souhaitions observer la transduction des thymocytes avant leur passage dans la circulation. D'un autre côté, peu d'études sur des modèles de primates non humains à l'aide de scAAVr ont été réalisées. Dans ces études, le pic maximal d'expression du transgène varie entre 72H et 2 semaines (Gao et al., 2006; Nathwani et al., 2007; Nathwani et al., 2006). De plus, il est possible que le pic d'expression du transgène soit un peu retardé chez le primate par rapport à celui observé chez les souris. En absence de cette information, nous avons préféré réaliser la thymectomie à 10 jours plutôt qu'à 3 jours post-injection du vecteur AAVr.

IV.C- Induction d'une réponse immunitaire

IV.C.1. Action tolérogène des AAVr dans certaines études

Comme évoqué dans l'introduction (paragraphe II.B.2), l'essai clinique de transfert de gènes hépatique à l'aide de vecteurs AAV2r codant pour le facteur IX a mis en avant le développement d'une forte réponse immune contre la capside d'AAVr qui a entraîné la lyse des cellules transduites et la perte d'expression du facteur IX (Manno et al., 2006). Cette réponse immunitaire n'avait pas été observée dans des modèles murins. Les auteurs expliquent le développement de cette forte réponse immune par la présence de LT mémoires CD8⁺ spécifiques de la capside d'AAV qui auraient été générés lors d'infections préalables des patients par l'AAV sauvage (Mingozzi et al., 2007b). Les expérimentations préalables n'avaient pas envisagé ce problème car les souris ne sont pas contaminées par l'AAV sauvage.

Les résultats obtenus chez la souris dans ce modèle de transfert de gène hépatique à l'aide

d'AAVr codant pour le FIX humain (hFIX), étaient très différents de ceux obtenus chez l'homme car ils montraient une induction de tolérance à la suite de transfert de gènes. Ainsi, suite à ce transfert de gènes, les animaux ne développaient pas d'inhibiteurs contre le FIX et l'immunisation de ces animaux avec le hFIX n'entraînait pas de prolifération des LT, ni de sécrétion de cytokines inflammatoires, suggérant que ces animaux étaient tolérants au hFIX. De même, les souris tolérantes ne développaient pas de réponse immunitaire (ni humorale, ni cytotoxique) suite à l'injection d'un vecteur adénoviral, codant pour le hFIX et connu pour être immunogène (Dobrzynski et al., 2006).

L'observation de l'augmentation de l'expression du GITR et de Foxp3 dans les splénocytes des souris tolérantes suggérait l'induction de Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Dobrzynski et al., 2006). Ceci a été confirmé par une étude menée par Cao et al. montrant que le transfert de Treg isolés dans la rate d'animaux tolérants à des souris naïves permet de protéger ces dernières contre le développement d'une réponse immune suite à leur immunisation avec le hFIX. De plus, chez des souris naïves, la déplétion des Treg à l'aide d'un anti-CD25 entraîne le développement d'inhibiteurs neutralisants suite à l'administration d'AAVr-hFIX, indiquant le rôle primordial des Treg dans l'induction de la tolérance au hFIX suite à une injection d'AAVr-hFIX (Cao et al., 2007a). Les mécanismes d'anergie et de délétion clonale des LT spécifiques du transgène ont été mis en évidence dans des souris ayant un TCR spécifique de l'OVA (Dobrzynski et al., 2004). De même, dans ce modèle de souris transgéniques, l'induction de Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ spécifiques de l'OVA a été observée dans le thymus et les organes lymphoïdes secondaires des animaux suite à l'injection d'AAVr-OVA dans la veine porte (modèle de transfert de gènes hépatique) (Cao et al., 2007a).

Suite à l'essai clinique où le développement d'une réponse immune a été observée chez les patients traités par transfert de gènes, l'utilisation de drogues immunosuppressives associées au transfert de gènes hépatique d'AAV2r-hFIX a été testée chez le primate non humain. Ainsi, le traitement des animaux avec du MMF, de la rapamycine et un anti-CD25 ne bloque pas le développement d'une réponse humorale contre le produit du transgène. A l'inverse, l'utilisation du MMF et de la rapamycine sans l'anti-CD25 permet d'induire une tolérance au produit du transgène. Ces résultats suggèrent que le blocage de la réponse immunitaire est permise par le cotraitement MMF/Rapamycine. En parallèle, l'absence du traitement anti-CD25 permet l'induction de Treg $CD4^+CD25^+$ qui favoriserait la tolérance au produit du transgène (Mingozzi et al., 2007a).

Ces études menées chez la souris et le primate suggèrent que le transfert de gènes et notamment le transfert de gènes visant à transduire le foie (injection dans l'artère hépatique ou la veine porte) permet d'induire une tolérance au transgène dans certaines conditions (nécessité de traitements immunosuppresseurs chez le macaque).

IV.C.2. Obtention d'une réponse immune dans notre modèle

Suite à ces études montrant une induction de tolérance à l'aide d'AAVr et les résultats de Marodon et al. indiquant l'efficacité d'une injection intra-thymique de LV à induire une tolérance, l'injection d'AAVr dans le thymus semblait une voie d'administration peu immunogène et pertinente pour induire une tolérance. De façon inverse, nous avons observé le développement d'une réponse immunitaire contre la capside et contre le transgène chez nos primates.

L'induction d'une réponse immune peut s'expliquer par la présence des particules virales en périphérie. Ainsi, suite aux injections intra-thymiques d'AAVr chez le singe, le vecteur est retrouvé dans le sérum dès 30 minutes post-injection. Ceci corrèle avec la forte expression de GFP détectée dans la rate et le foie des singes. De plus, l'analyse histologique du thymus des primates ne montre pas d'infiltrat cellulaire, indiquant que la réponse immunitaire n'a pas dû s'initier dans le thymus.

L'analyse du sérum des 2 primates injectés montre le développement d'une réponse immunitaire à la fois contre le transgène (Figure 13) et contre la capside de l'AAV8. Ceci corrèle avec l'expression du transgène retrouvée dans le foie à un mois post-injection. Une deuxième biopsie de foie réalisée sur ces animaux à 4 mois post-injection montre une expression très faible du transgène dans le foie (Figure 14A). Le développement d'une réponse immunitaire contre la GFP dans le foie des singes est confirmé par la présence d'infiltrats dans le foie (Figure 14B). Cependant, aucun défaut dans la fonction du foie n'a été observé chez ces animaux (bilan hépatique similaire avant et après injection de l'AAVr).

Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus précédemment par Nathwani et ses collaborateurs. Dans leurs études menées sur le transfert de gènes dans le foie de primate à l'aide de vecteurs AAVr-hFIX, ils montrent que la transduction du foie est associée chez certains animaux au développement d'une réponse humorale contre le transgène, celle-ci est observée aussi bien avec des ss- ou des sc-AAVr et en utilisant trois sérotypes différents (AAV2r, AAV5r et AAV8r) (Davidoff et al., 2005; Nathwani et al., 2002; Nathwani et al., 2007; Nathwani et al., 2006). Ils observent ainsi le développement d'inhibiteurs du hFIX en

utilisant un scAAV8r (Nathwani et al., 2006). Ce vecteur est celui utilisé dans notre étude, seule la cassette d'expression est modifiée. Les auteurs suggèrent que l'utilisation de la protéine FIX de macaque au lieu du facteur IX humain n'aurait peut-être pas entraîné le développement d'une réponse immunitaire. Dans notre cas, notre transgène, la GFP, a une origine très éloignée du primate (la GFP provient d'une méduse) favorisant ainsi le développement d'une réponse immune.

Dans les études de Nathwani et de ses collaborateurs, une réponse humorale contre la capside de l'AAVr utilisée a été détectée chez tous les primates.

Dans l'objectif d'induire une tolérance centrale, le problème majeur qui apparaît dans cette étude est la fuite du vecteur. Les solutions possibles pour éviter le développement d'une réponse immune contre le transgène seraient d'injecter un volume plus faible de vecteurs pour éviter la fuite des AAVr en périphérie. Cependant, ceci peut également limiter l'efficacité de la transduction du thymus. Une alternative serait d'utiliser un promoteur spécifique des cellules thymiques, la fuite des AAVr en périphérie ne serait alors plus un problème. L'utilisation de promoteur spécifique ne résout cependant pas tous les problèmes car les cellules exprimant le produit du transgène à la suite d'une injection d'AAVr se limitent rarement à celles ciblées par le promoteur (Adjali et al., 2005a; Chenuaud et al., 2004).

IV.C.3. Observation de la transduction des cellules du foie à l'aide d'un vecteur scAAV8

L'injection intra-thymique de vecteurs scAAV8r-GFP nous a mené à étudier la transduction du foie chez la souris et le macaque. Nous avons alors observé un tropisme différent selon les espèces. Ainsi, comme montré sur la figure 15, la transduction du foie chez la souris montre un tropisme pour les hépatocytes alors que l'analyse du foie de singe, montre un tropisme préférentiel des AAVr pour les cellules endothéliales et l'absence de transduction des hépatocytes. Dans ces expériences, la même préparation de vecteurs scAAV8r-GFP (même lot de production) et le même mode d'injection (intra-thymique) ont été utilisés. La seule différence réside dans l'espèce animale. Dans les études de transduction du foie à l'aide de vecteurs AAVr décrites précédemment chez le primate (Nathwani et al., 2007; Nathwani et al., 2006), les auteurs parlent de la transduction des hépatocytes chez le singe mais sans évoquer de marquage spécifique des hépatocytes. Ils utilisent cependant un vecteur contenant une séquence promotrice/activatrice spécifique des hépatocytes (apolipoprotéine hépatique + alpha-anti-trypsine).

A la vue des résultats obtenus dans notre étude et des divergences obtenus avec les études de Nathwani, il serait intéressant d'observer quelles sont les cellules du foie transduites chez le singe lors d'une injection intraveineuse de scAAV8r. Même si nous pensons que la transduction du foie dans notre étude est permise par les particules virales présentes en périphérie, il existe peut-être une différence de transduction du foie entre l'injection intraveineuse et l'injection intra-thymique de vecteurs AAVr.

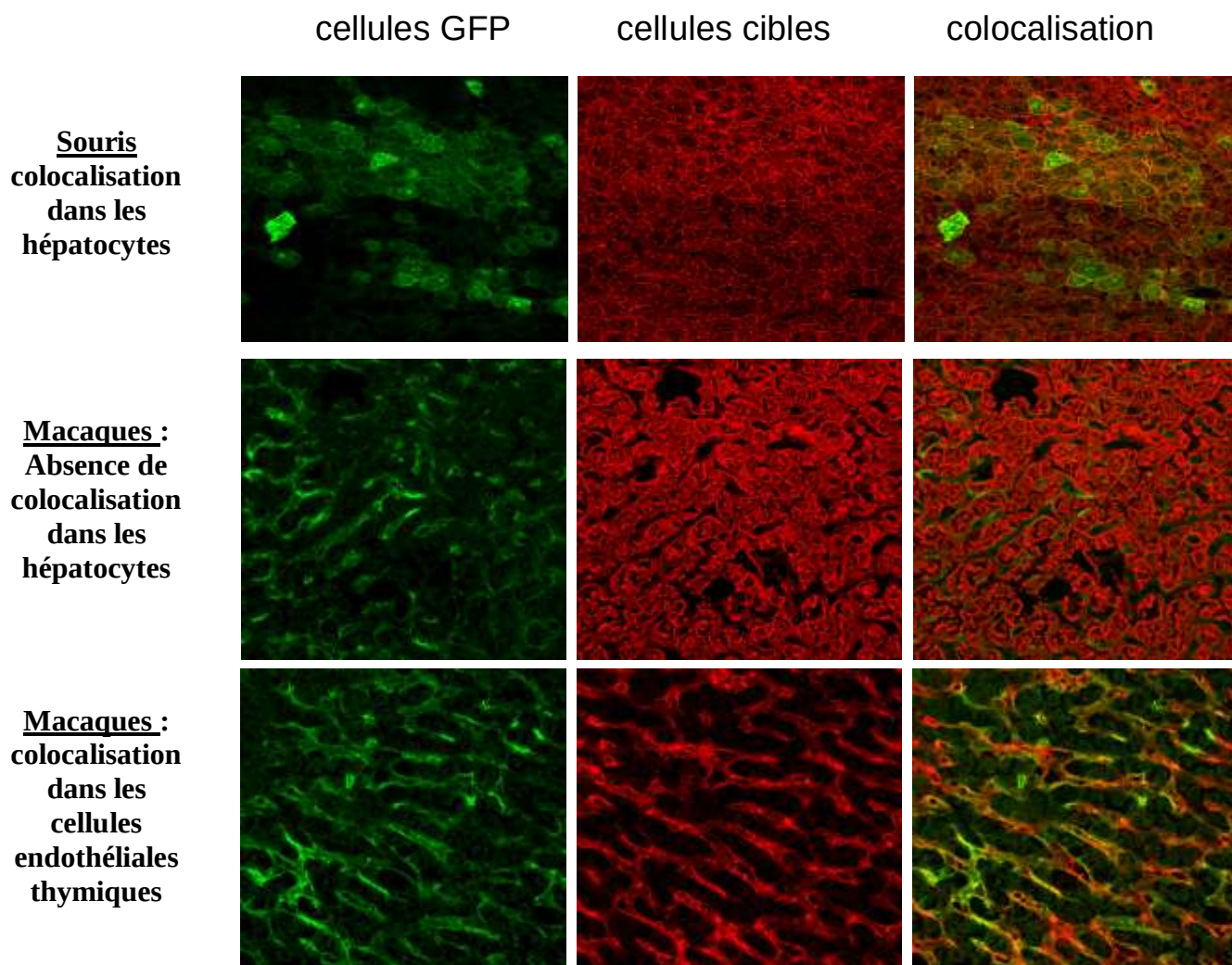


Figure 15 : Recherche des cellules du foie transduites par les vecteurs scAAV8r-GFP chez la souris et le singe.

Des marquages immunohistologiques reconnaissant les hépatocytes (anticorps anti-cytokératine) et les cellules endothéliales (anticorps anti-facteur VIII) ont été réalisés sur des coupes de foie de souris injectées avec le scAAV8r-GFP en intra-thymique et des coupes issues de biopsies de foie des 2 macaques injectés avec le même vecteur. Chez la souris, le marquage des cellules endothéliales ne colocalise pas avec les cellules GFP positives. Les marquages ont été analysés à l'aide d'un microscope confocal (grossissement x40).

**Partie 2 : Etude de
l'induction d'une
tolérance
périphérique**

I. Introduction

Comme mentionné dans l'introduction, les CD tolérogènes et les Treg sont des acteurs clés dans le maintien de la tolérance périphérique. Dans le cadre de cette thèse, nous avons voulu générer chez le macaque des CD tolérogènes *ex vivo* et isoler puis expandre des Treg naturels. Pour s'assurer que les cellules obtenues sont bien celles souhaitées, il est nécessaire de connaître les propriétés de ces cellules. Dans cette introduction de résultats, nous allons évoquer les propriétés de ces deux types cellulaires ainsi que les données de la littérature en ce qui concerne la génération des CD *ex vivo* et l'expansion des Treg.

I.A- Propriétés des CD tolérogènes

I.A.1. Caractéristiques générales des CD tolérogènes

- ✓ **capacité de capture et de présentation d'un antigène à sa surface.** La tolérance est antigène spécifique, la CD doit donc être capable de capter un antigène, l'apprêter puis le présenter à sa surface associé au CMH (Wilson et al., 2004).
- ✓ **expression des molécules du CMH et absence d'expression (ou expression faible) des molécules de costimulation.** L'expression du CMH va permettre au LT d'interagir avec la CD tolérogène de façon spécifique et l'absence de molécules de costimulation empêche l'activation du LT et entraîne ainsi son anergie (Schwartz, 2003; Steinbrink et al., 1999).
- ✓ **migration des cellules vers les organes lymphoïdes.** La capture antigénique peut se faire dans différents tissus puis les CD doivent migrer dans les organes lymphoïdes secondaires où se fait l'interaction LT/CD.
- ✓ **résistance des CD à la maturation à la suite de stimulations pro-inflammatoires, comme les TLR ou le CD40.** Ces cytokines pro-inflammatoires sont responsables de l'activation des CD (maturation des CD) et par la suite de l'induction de la réponse effectrice (Vieira et al., 2000). Les CD tolérogènes résistent à ces stimuli.
- ✓ **faible production d'IL-12 et forte production de molécules tolérogènes tels que l'IL-10, TGF β , HO-1, IDO, PD-L1, ILT3 ou ILT4.** Les cytokines sécrétées par les CD vont induire préférentiellement un type de réponse immune : ainsi la sécrétion d'IL-12 est corrélée à une réponse effectrice alors que la présence d'IL-10, de TGF β , d'IDO (indoleamine-2,3-dioxygénase) ou de HO-1 (Heme-oxygénase-1) est corrélée à une réponse tolérogène.

L'implication dans la réponse tolérogène de l'IL-10 et d'HO-1 sera décrite ci-dessous car ces 2 molécules ont été utilisées lors de cette thèse.

I.A.2. Rôle de l'IL-10 dans la réponse tolérogène

L'IL-10 est une cytokine clé dans la régulation de la réponse immunitaire et dans l'induction de la tolérance en agissant sur différents mécanismes de la réponse immunitaire (Corinti et al., 2001; Jonuleit et al., 2001; Moore et al., 2001). L'intervention de l'IL-10 dans la balance T_H1 et T_H2 a été montrée au début des années 1990 chez la souris. Cette cytokine inhibe la synthèse des cytokines de la voie T_H1 , ce qui favorise la voie T_H2 (Vieira et al., 1991). L'IL-10 agit également sur d'autres types cellulaires. Ainsi, l'IL-10 est capable d'inhiber la production des cytokines comme l'IL-1 α , l'IL-6, le TNF α par les macrophages (Fiorentino et al., 1991). L'IL-10 joue aussi un rôle dans l'activité des cellules B en inhibant leur apoptose.

L'IL-10 est sécrétée par différents types cellulaires, notamment les LT_H2 , des LB, les Treg naturels, les Tr1 et les CD tolérogènes. L'implication de l'IL-10 sécrétée par les LB dans les maladies auto-immunes a été montrée mais de façon controversée. Ainsi, chez les patients atteints de lupus érythémateux, la forte sécrétion d'IL-10 par les LB favorise la synthèse d'auto-anticorps (Llorente et al., 1995). A l'inverse, des études montrent le rôle régulateur de LB producteurs d'IL-10 dans des pathologies auto-immunes chez la souris (Fillatreau et al., 2002; Mauri et al., 2003) et chez l'homme (Duddy et al., 2007). Cette régulation serait liée à la sécrétion d'IL-10 par ces LB (Fillatreau et al., 2002). En ce qui concerne les LT régulateurs, comme évoqué dans l'introduction générale (paragraphe IV.C.2), les Treg naturels synthétisent de l'IL-10 et cette cytokine intervient dans leur activité *in vivo*. De plus, l'IL-10 permet la génération des Tr1 (Roncarolo et al., 2006).

L'IL-10 favorise l'effet tolérogène des CD. Ainsi, les CD humaines générées en présence d'IL-10 *ex vivo* présentent une faible expression du CMH de classe II et surtout de la molécule de costimulation CD86 sur ces CD (Buelens et al., 1995). L'absence d'expression du CD86 empêche l'activation des LT et par conséquent favorise l'anergie des LT, aussi bien des LT CD4⁺ (Buelens et al., 1995) que des LT CD8⁺ (Steinbrink et al., 1999) et de façon antigène spécifique (Steinbrink et al., 2002). De plus, les CD humaines traitées avec de l'IL-10 sont résistantes à la maturation (absence du marqueur de maturation des CD, le CD83) et ne produisent pas d'IL-12 (cytokine clé de la réponse immunitaire) (Buelens et al., 1997). Ces cellules favorisent également le développement de cellules T régulatrices (Roncarolo et al.,

2006).

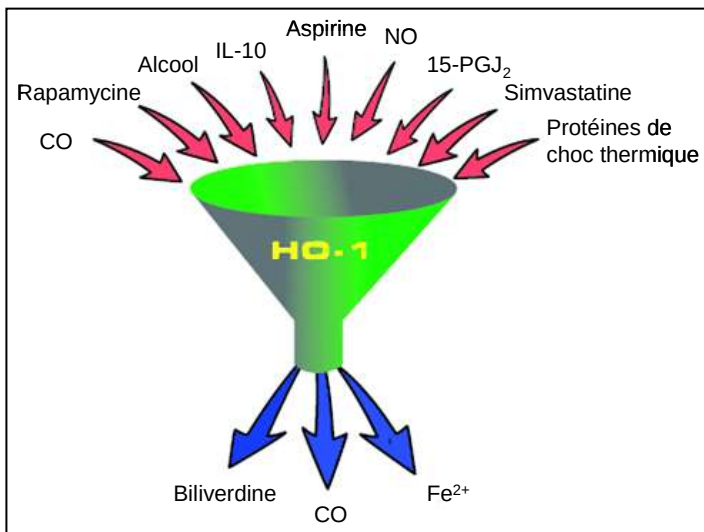
L'efficacité des CD traitées avec de l'IL-10 a été testée dans des souris immunisées avec de l'ovalbumine. L'immunisation entraîne le développement d'une forte réponse immunitaire chez les souris injectées avec des CD pulsées avec l'OVA sans traitement IL-10. A l'inverse, une prolifération minime des LT est détectée dans les animaux immunisés et injectés avec des CD traitées avec de l'IL-10 et chargées avec l'OVA (Muller et al., 2002). De même, dans un modèle de maladie du greffon contre l'hôte obtenu après transfert de lymphocytes humains dans une souris SCID, l'injection de CD traitées avec de l'IL-10 permet de réduire le développement de la pathologie (ce qui n'est pas le cas après injection de CD non traitées) (Sato et al., 2003). De plus, la génération de CD chez le macaque en présence d'IL-10 et de Vitamine D3 permet d'obtenir des CD ayant des caractéristiques tolérogènes (résistance à la maturation et faible capacité de ces CD à induire une prolifération de LT allogéniques). L'injection intra-veineuse de ces CD à des animaux allogéniques est bien tolérée. En effet, une augmentation de la réactivité des LT du receveur à des antigènes du donneur ou d'un animal tiers est détectée mais il n'y a pas d'augmentation de la production d'anticorps anti-donneur suite à l'injection des CD allogéniques (Zahorchak et al., 2007).

I.A.3. Rôle d'HO-1 dans la réponse tolérogène

Les hèmes oxygénases (HO) sont des enzymes régulatrices qui interviennent dans la dégradation de l'hème en biliverdine, monoxyde de carbone (CO) et en ion fer Fe^{2+} (Tenhunen et al., 1968). Il existe 2 principales isoformes d'HO dont la forme **inductible** est HO-1. L'expression de HO-1 est induite en réponse à un stress dû à différents stimuli tels que l'hème, les métaux lourds, les cytokines inflammatoires ou l'oxyde nitrique (NO) (Otterbein et al., 2003; Ryter et al., 2006).

L'activité tolérogène de HO-1 a été mise en évidence en surexprimant cette protéine par transfert de gènes ou à l'aide de drogues comme le CoPP (Cobalt Protoporphyrines). Ceci a permis de montrer l'efficacité d'HO-1 dans le traitement du diabète et du rejet de greffe dans des modèles de transplantation (Araujo et al., 2003; Braudeau et al., 2004; Hu et al., 2007; Laumonier et al., 2008; Martins et al., 2005; Soares et al., 1998). Cette action immunosuppressive a également été mise en évidence dans des souris transgéniques HO-1^{-/-}. En effet, la réponse immunitaire induite par le LPS chez ces souris est beaucoup plus importante que chez des souris HO-1^{+/+} (activation NF κ B, augmentation des cytokines induisant des réponses T_H1 et T_H2 et des chimiokines) (Tracz et al., 2007).

Le pouvoir immunosuppresseur des produits d'HO-1 est lié à des actions anti-apoptotiques



(Brouard et al., 2000; Ferris et al., 1999), anti-inflammatoires (Lee and Chau, 2002; Otterbein et al., 2000) et anti-prolifératives (Pae et al., 2004). De plus, l'activité de HO-1 semble impliquée dans les effets tolérogènes de certaines molécules énumérées sur la figure 16 (Bach, 2005).

Figure 16 : Rôle central d'HO-1 dans l'activité de certaines molécules

HO-1 dégrade l'hème en trois produits : la biliverdine, le monoxyde de carbone et l'ion Fer. Ces produits interviennent dans les fonctions des différents éléments cités. Bach assimile ainsi HO-1 à un entonnoir thérapeutique *D'après Bach, 2005.*

Par exemple, l'action anti-inflammatoire de l'IL-10 est annulée si l'activité HO-1 est inhibée. En effet, dans un modèle murin de choc septique, l'administration d'IL-10 à des souris ayant reçu une dose létale de LPS entraîne la survie dans 80% des animaux (par rapport à 13% de survivants sans IL-10). Cependant, l'administration à ces animaux d'IL-10 et d'un inhibiteur de l'activité HO-1 entraîne une diminution de la survie des souris (30%) (Lee and Chau, 2002). HO-1 est par conséquent nécessaire pour l'activité tolérogène de l'IL-10.

Les CD jouant un rôle clé dans la tolérance, l'implication d'HO-1 dans ces cellules a été étudiée. Ainsi, Chauveau et al. ont montré que les CD immatures de rat et d'homme exprimaient HO-1 et que les CD matures (maturation en présence de LPS) exprimaient pas ou peu HO-1. De plus, dans des CD stimulées avec du LPS, la surexpression d'HO-1 à l'aide de CoPP inhibe la maturation des CD d'un point de vue phénotypique. En ce qui concerne leur fonction, la surexpression d'HO-1 à l'aide du CoPP entraîne une diminution de la capacité de ces CD à stimuler la prolifération de LT allogéniques (Figure 17A). En parallèle, la sécrétion de cytokines inflammatoires tel que l'IFN γ est diminuée lorsque les CD (stimulées ou non au LPS) sont cultivées en présence de CoPP. A l'inverse, leur sécrétion d'IL-10 est favorisée (Figure 17B). **L'expression d'HO-1 dans les CD immatures corrèle avec leur activité tolérogène.** L'inhibiteur de l'activité d'HO-1, le SnPP (protoporphyrine issue de l'étain) ne semble pas entraîner de modifications importantes de la fonction des cellules (Figure 17).

Pour les CD matures, cela peut s'expliquer par le fait qu'elles expriment peu d'HO-1, l'inhibiteur a donc peu d'effet (Chauveau et al., 2005). Une étude récente a montré que la surexpression d'HO-1 (CoPP) dans les CD s'accompagne également de la diminution de la sécrétion de TNF α et d'IL-12 par ces cellules (Listopad et al., 2007).

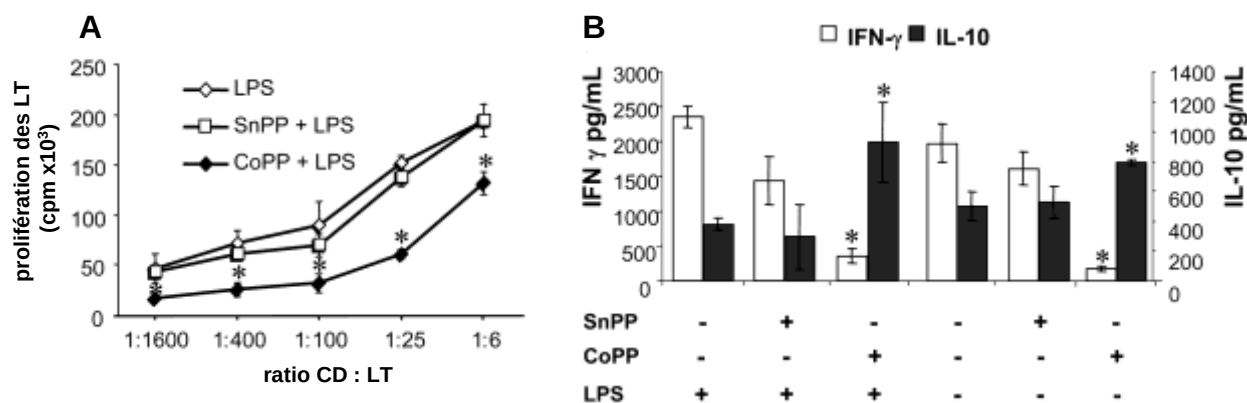


Figure 17 : Implication d'HO-1 dans l'activité tolérigène des CD.

L'induction (CoPP) ou l'inhibition (SnPP) de l'activité HO-1 a été réalisée dans des CD cultivées en présence de LPS. La capacité des CD traitées à stimuler une prolifération de LT allogéniques (A) ainsi qu'à sécréter des cytokines pro- et anti-inflammatoires (B) a été analysée. D'après Chauveau et al., 2005.

A la suite de ces résultats, l'implication d'HO-1 dans l'effet tolérigène des CD a été montrée dans différents modèles de diabètes et de transplantation. Ainsi, l'administration de CoPP à des animaux greffés ou diabétiques a pour conséquence une diminution de la quantité de CD immunogènes dans les organes lymphoïdes secondaires et par conséquent des LT effecteurs (Li et al., 2007a; Li et al., 2007b; Martins et al., 2005). Cette action est réversible si l'activité de HO-1 est inhibée (Li et al., 2007b). De même, l'induction de l'expression d'HO-1 dans les organes du donneur 24H avant la transplantation entraîne une diminution des ARNm codant pour le CMH de classe II ou les molécules de costimulation (du donneur) dans la rate du receveur. Ces résultats suggèrent qu'en présence d'HO-1, les CD du donneur sont peu actives et ont peu migré hors du greffon, apportant une protection au greffon (Kotsch et al., 2007). A l'inverse, l'administration d'inhibiteurs de l'activité HO-1 dans des modèles de survie du greffon à long terme entraîne le rejet prématuré du greffon (Yamashita et al., 2006).

HO-1 favorise donc le développement des CD tolérigènes *in vivo* et par conséquent la tolérance.

I.B- Génération de CD toléroènes ex vivo

La génération de CD ayant des propriétés toléroènes est un sujet d'étude important et développé notamment pour des applications dans des modèles de transplantation où l'apport d'une tolérance au greffon est indispensable. La figure 18 montre les différentes techniques étudiées pour l'obtention de CD toléroènes.

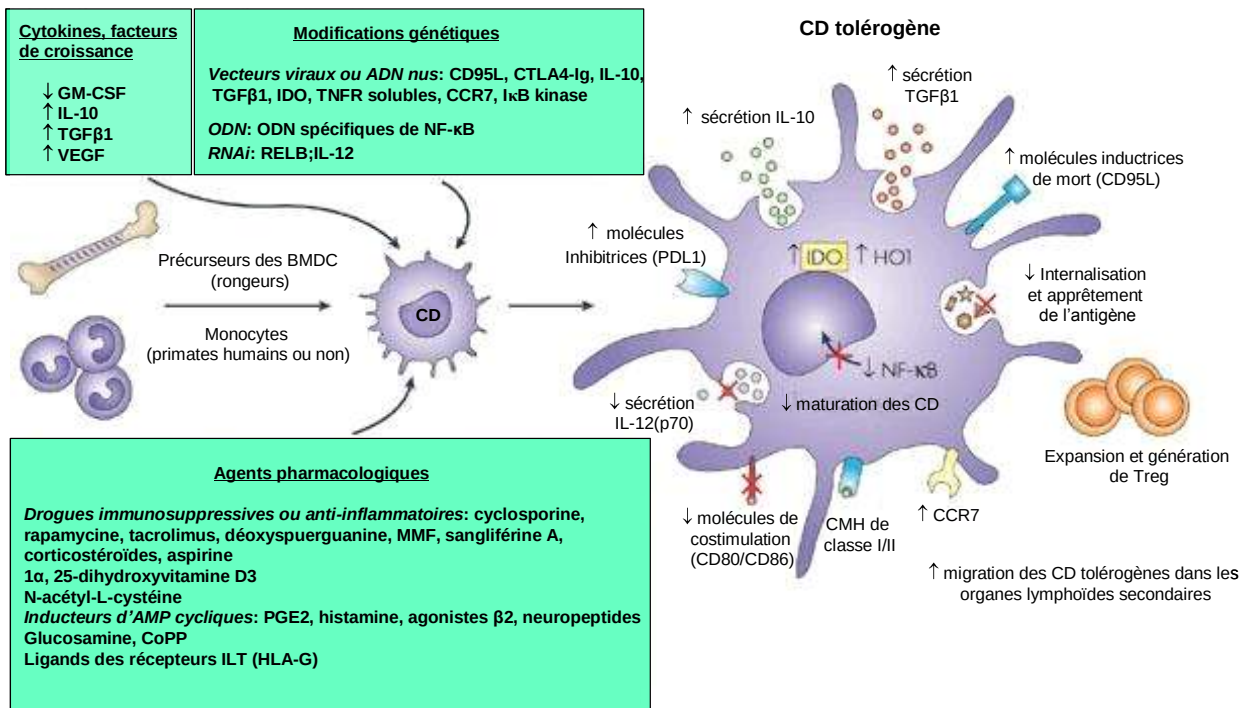


Figure 18 : Schéma représentant les différentes possibilités de générer des CD toléroènes ex vivo. D'après Morelli et Thomson, 2007

I.B.1. Origine des CD de singe

i) Utilisation de précurseurs du sang

Dans le cadre de cette thèse, un des objectifs était de générer des CD toléroènes chez le macaque. Comme chez l'homme, la génération des CD chez le primate se fait principalement à partir des monocytes du sang périphérique (Ashton-Chess and Blanco, 2005; Asiedu et al., 2002; Barratt-Boyes et al., 2000; Mortara et al., 2006; O'Doherty et al., 1997; Zahorchak et al., 2007). Il est vrai que dans une optique d'application clinique, la génération des CD à partir du sang est beaucoup plus simple qu'à partir de ponction de moelle osseuse.

La technique la plus classique pour isoler les précurseurs des CD chez le singe, utilisée chez l'homme, consiste à trier les précurseurs CD14+ (par des billes magnétiques) contenus dans les PBMC (Ashton-Chess and Blanco, 2005; Asiedu et al., 2002; Barratt-Boyes et al., 2000;

Zahorchak et al., 2007).

Les cellules sont ensuite mises en culture en présence de GM-CSF (entre 800 et 1000U/ml) et d'IL-4 (entre 500 et 1000U/ml). Le GM-CSF entraîne la différenciation des précurseurs en cellules myéloïdes (CD et macrophages). En parallèle, l'IL-4 favorise la génération de CD en inhibant le développement des macrophages. L'ajout de différentes cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6, PGE $_2$, CD40L) dans le milieu de culture entraîne la génération de CD matures (Ashton-Chess and Blanco, 2005; Asiedu et al., 2002; Barratt-Boyes et al., 2000; Mortara et al., 2006).

ii) Différenciation à partir de la moelle osseuse totale

Il existe quelques articles dans la littérature où les cellules dendritiques de primate sont dérivées de la moelle osseuse à partir de précurseurs CD34 $^{+}$ (Ashton-Chess and Blanco, 2005; Pinchuk et al., 1999). Dans ces 2 articles, les cellules CD34 $^{+}$ de la moelle osseuse sont triées par des billes magnétiques puis mises en culture en présence de GM-CSF, de TNF α et de SCF (Stem Cell Factor/c-kit ligand). Après quelques jours de culture, lors du changement de milieu, le SCF est ôté et remplacé par de l'IL-4. Comme précédemment, les auteurs montrent qu'il est possible de stimuler la maturation des CD générées en utilisant des cytokines pro-inflammatoires.

A l'heure actuelle, il ne semble qu'aucune étude n'ait utilisé comme chez le rongeur, la moelle totale (sans sélection de précurseurs) pour générer des CD chez le singe. La technique utilisée chez le rongeur, et notamment chez le rat à l'unité INSERM U643, est la suivante. La moelle osseuse est récupérée dans l'os de la patte. Une lyse des hématies est réalisée puis les cellules sont filtrées (pour éliminer les débris) et mises en culture en présence de GM-CSF et d'IL-4. La sélection des cellules se fait lors du changement de milieu selon le principe de sélection des monocytes. Ainsi, l'ensemble du milieu de culture va être jeté, les cellules surnageantes ou semi-adhérentes sont alors éliminées, laissant uniquement les cellules adhérentes. Ce sont ces cellules adhérentes que se différencient en CD. A la fin de la culture, deux types de CD différentes sont présentes : des CD matures qui sont les cellules surnageantes et des CD immatures tolérogènes **adhérentes**. Ces CD adhérentes ont été utilisées dans le modèle de transplantation de l'unité INSERM U643 décrit dans l'introduction générale (paragraphe IV.D.3).

I.B.2. Modifications des conditions de culture

i) Génération des CD en présence de faible quantité de GM-CSF

Des études menées chez la souris ont montré que la génération de CD à partir de la moelle osseuse pouvait être réalisée en présence de faible quantité de GM-CSF, sans utiliser d'IL-4. Ainsi, Lutz et al. ont montré que les CD dérivées de la moelle osseuse et cultivées en présence de faible taux de GM-CSF avaient un phénotype de CD immatures ($CD11c^+ CMHII^{low} CD86^-$) associé à une forte capacité de capture et de présentation d'un antigène étranger et une faible stimulation de LT allogéniques. De plus, ces cellules sont résistantes à la maturation (induite notamment par le LPS). Enfin, l'injection de ces CD immatures 7 jours avant une allo-transplantation cardiaque permet la survie du greffon (Lutz et al., 2000).

ii) Utilisation de cytokines anti-inflammatoires

De façon générale, pour obtenir des CD tolérogènes, les auteurs utilisent des cytokines de différenciation de la lignée myéloïde, comme le GM-CSF et de l'IL-4. Ils n'utilisent pas de molécules activatrices, type CD40 ou LPS qui sont utilisées pour obtenir des CD immunogènes (matures). A l'inverse, l'utilisation de certaines drogues ou cytokines anti-inflammatoires favorise le développement de CD tolérogènes. Ainsi, comme décrit précédemment, les CD traitées avec de l'IL-10 entraînent l'anergie des LT effecteurs et en parallèle favorisent le développement des cellules T régulatrices.

I.B.3. Modifications des CD avec des agents pharmacologiques

De nombreux agents pharmacologiques, mentionnés dans la figure 18 peuvent être utilisés pour modifier les CD, seuls ceux impliqués dans cette thèse seront décrits.

i) Les drogues immunosuppressives

Les drogues immunosuppressives, comme les corticostéroïdes, la cyclosporine A, le tacrolimus, la rapamycine, l'aspirine, la déoxysperguanine, le MMF ou la sangliférine A sont connues pour empêcher la maturation ou l'activation des CD et pour inhiber la capacité des CD à synthétiser de l'IL-12. Certaines de ces drogues inhibent également la translocation nucléaire de NF κ B, nécessaire à l'activation des CD (Hackstein and Thomson, 2004).

Ainsi, les CD traitées avec de la rapamycine et injectées chez la souris ont une faible capacité de stimuler la prolifération de LT $CD4^+$, mais elles favorisent la génération de Treg. *In vivo*,

dans des modèles murins de transplantation cardiaque réalisée en présence ou non d'une courte immunosuppression (injection de rapamycine les 10 premiers jours suivant la transplantation), l'injection de CD syngéniques traitées avec de la rapamycine et chargées avec les antigènes du donneur permet une tolérance à l'allogreffe (Turnquist et al., 2007). (Taner et al., 2005).

ii) Les inducteurs de l'activité d'HO-1

Comme décrit précédemment, l'utilisation d'inducteurs d'HO-1 ont permis de mettre en évidence le rôle de cette protéine. Le traitement d'animaux greffés ou diabétiques avec un inducteur d'HO-1, comme le CoPP, a un effet tolérogène et permet de prolonger la survie de la greffe ou de ralentir l'avancée de la maladie. Il existe également des inhibiteurs d'HO-1, comme le SnPP, le ZnPP ou le MnPP qui sont des protoporphyrines issues de l'étain (Sn), du zinc (Zn) et du manganèse (Mn). A l'inverse, ces inhibiteurs favorisent le rejet de greffe.

Les CD peuvent également être modifiées génétiquement suite à l'infection de ces cellules par des vecteurs viraux, pour leur faire exprimer par exemple de l'IL-10, du TGFβ ou du CTLA4 de façon continue (Asiedu et al., 2002; Coates et al., 2001; Gorczynski et al., 2000; O'Rourke et al., 2000; Takayama et al., 1998). Ce type de modifications n'ont pas été utilisées lors de cette thèse (pour revue (Morelli and Thomson, 2003)).

I.C- Propriétés des Treg naturels

I.C.1. Caractéristiques générales des Treg (Sakaguchi, 2005)

✓ **Les Treg sont générés dans le thymus et représentent environ 5% des LT CD4⁺ en périphérie.** Chez l'homme, elles représentent moins de 0,5% des PBMC totaux (Levings et al., 2001).

✓ **Les Treg sont des acteurs clé du maintien de la tolérance** en contrôlant le développement de réponse immune contre des antigènes du soi mais également du non-soi (Itoh et al., 1999). Les Treg peuvent également être utilisés pour favoriser une tolérance à des antigènes du non-soi (dans des modèles de transplantation par exemple) (Sakaguchi et al., 1995) comme décrit dans le paragraphe IV.C.3 de l'introduction générale.

✓ **Les Treg expriment des molécules tels que CD25 (Sakaguchi et al., 1995) et Foxp3** (Allan et al., 2005; Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Levings et al., 2001) mais également CTLA4 (Read et al., 2000; Takahashi et al., 2000), GITR (McHugh et al., 2002;

Shimizu et al., 2002), CD62L (Ermann et al., 2005). L'absence d'expression de Foxp3 dans les patients IPEX ou les souris Foxp3^{-/-} est corrélée à des pathologies auto-immunes (Sakaguchi, 2005).

✓ **Les Treg produisent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL10** (Asseman et al., 1999; Hara et al., 2001), **ou le TGFβ** (Nakamura et al., 2004; Nakamura et al., 2001) mais ne produisent pas d'IL-2 ni d'IL-4 .

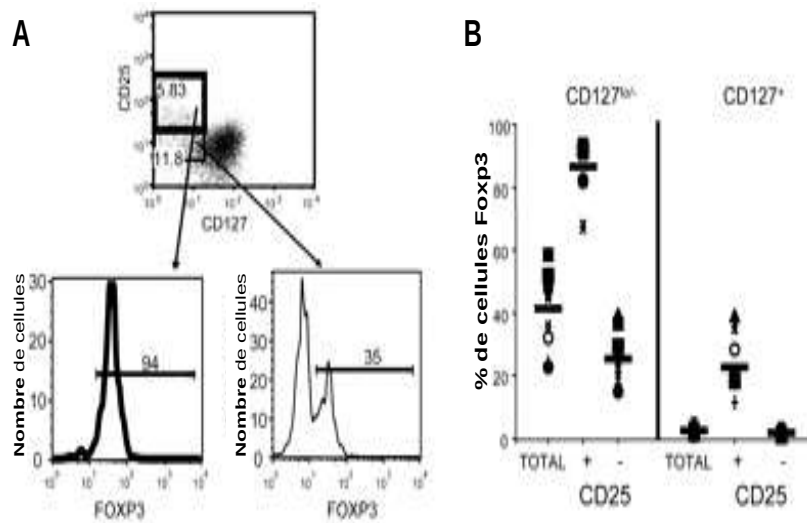
L'IL-2 joue un rôle central dans l'activité des Treg. En effet, l'IL-2 est indispensable à la prolifération des Treg *in vitro* et à leur activité suppressive (Furtado et al., 2002; Thornton et al., 2004). De façon contradictoire, ces cellules ne synthétisent pas d'IL-2, elles utilisent donc l'IL-2 sécrétée par les LT effecteurs pour proliférer, puis inhibent ces LT. Les souris déficientes en IL-2 développent des pathologies auto-immunes sévères, leur nombre de Treg est alors très faible (Horak et al., 1995; Suzuki et al., 1995).

I.C.2. Différence entre les Treg murins et humains

L'étude des Treg murins est indispensable pour comprendre les mécanismes d'action de ces cellules *in vivo*. Cependant, les Treg murins et les Treg humains sont différents. Ainsi l'isolement des Treg chez la souris de laboratoire est simple car seuls les Treg sont CD4⁺CD25⁺. A l'inverse, dus aux infections diverses de leur environnement, les hommes et les primates non humains possèdent des cellules CD4⁺CD25⁺ qui ne sont pas des Treg mais des LT effecteurs qui suite à leur activation, expriment le CD25 (Baecher-Allan and Hafler, 2006; Liu et al., 2006). Pour dissocier les Treg naturels des LT activés, une des solutions est d'observer l'expression de Foxp3. Cependant, ce marqueur de Treg est intracellulaire, l'isolement des Treg par Foxp3 entraîne donc la mort des cellules. Une alternative pour dissocier les Treg des T effecteurs a été découverte par 2 équipes simultanément. Ainsi Liu et al. et Seddiki et al. ont montré que le CD127 (récepteur à l'IL-7) permettait de dissocier ces 2 populations. Les Treg humains sont CD4⁺CD25⁺**CD127^{-/low}** et les LT activés sont CD4⁺CD25⁺**CD127⁺** (Figure 19) (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006).

De façon similaire, l'expression de Foxp3 est différente entre les souris et les hommes suite à une stimulation *in vitro*. Ainsi, les LT CD4⁺CD25⁻ murins stimulés *in vitro* vont acquérir le marqueur CD25 tout en restant Foxp3⁻. A l'inverse, les LT humains CD4⁺CD25⁻ stimulés *in vitro* vont acquérir l'expression de CD25 et de Foxp3 sans acquisition de la fonction

suppressive (Gavin et al., 2006; Walker et al., 2003).



I.C.3. Caractérisation des Treg chez le singe

Des études récentes ont permis d'isoler et de caractériser les Treg chez les primates non humains. Hartigan O'Connor et al. ont ainsi montré qu'il était possible comme dans les études menées par Liu et al., d'isoler les Treg chez le singe en triant les cellules $CD4^+CD25^+CD127^-$ (Hartigan-O'Connor et al., 2007; Liu et al., 2006) alors que d'autres équipes ont isolé les Treg chez le babouin et le macaque sans utiliser le CD127 (Gansuud et al., 2007; Haanstra et al., 2008; Porter et al., 2007). Les Treg isolés (avec ou sans le CD127) expriment Foxp3 et sont capables de supprimer une prolifération de LT activés (Gansuud et al., 2007; Haanstra et al., 2008; Hartigan-O'Connor et al., 2007; Porter et al., 2007). Ils possèdent donc les mêmes caractéristiques que les Treg humains et murins. Dans l'étude de Porter et al., les auteurs montrent qu'il est possible d'isoler des Treg chez le singe à partir du sang (1,9% des LT totaux sont des Treg), mais également à partir des ganglions (3,1% des LT totaux) ou de la rate (1,7% des LT totaux) (Porter et al., 2007).

I.D- Expansion et génération de Treg spécifiques d'antigène

L'efficacité des Treg dans le traitement de diverses pathologies a montré des résultats encourageants. Cependant, les Treg représentent moins de 5% des LT $CD4^+$ chez l'homme, leur isolement à partir du sang périphérique ne permet pas d'en obtenir un nombre suffisant pour avoir un effet thérapeutique à la suite de leur injection. Des techniques d'expansion des Treg se sont donc développées pour résoudre ce problème.

I.D.1. Expansion à l'aide de billes anti-CD3/anti-CD28 ou d'antigènes libres

La technique la plus simple pour amplifier des Treg est de les mettre en culture avec des billes anti-CD3/anti-CD28 en présence d'IL-2 chez la souris (Tang et al., 2004; Trenado et al., 2006), chez le singe (Gansuud et al., 2007) ou chez l'homme (Godfrey et al., 2004; Hoffmann et al., 2004). Par définition, ces billes vont stimuler les récepteurs CD3 et CD28 des Treg et entraîner leur prolifération. Par cette technique, l'amplification des Treg est importante. En effet, l'étude réalisée chez le macaque par Gansuud et al. montre une expansion des Treg de 300 à 2000 fois sur 4 semaines (Gansuud et al., 2007). L'avantage des billes est leur forte capacité à stimuler la prolifération, cependant, cette expansion n'est pas antigène spécifique. Une alternative à l'obtention de Treg spécifiques d'antigènes, sans utiliser de CD, est d'utiliser des billes sensibilisées avec un peptide représentant le complexe CMHII/peptide allogénique (équivalent à un anti-TCR spécifique) à la place des billes anti-CD3 (Masteller et al., 2005). Dans cette expérience, les Treg sont donc amplifiés de façon antigène spécifique à l'aide des billes sensibilisées avec le peptide, d'anti-CD28 et d'IL-2. Leur efficacité *in vivo* dans la prévention du diabète est supérieure à celle des Treg amplifiés de façon polyclonale mais n'a pas été comparée à une expansion avec des CD (Masteller et al., 2005).

I.D.2. Expansion à l'aide de CD et spécificité d'antigène

Une des fonctions des CD est de stimuler les LT pour les activer et les expandre. Leur utilisation pour l'expansion des Treg est donc justifiée. De plus, **la présentation d'un peptide par la CD permet l'obtention de Treg spécifiques, plus efficaces que les Treg amplifiés de façon polyclonale.**

Dans les modèles de diabète, la comparaison de différentes CPA syngéniques (splénocytes versus CD dérivées de la moelle osseuse (BMDC)) a montré que les BMDC étaient les CPA les plus efficaces pour expandre les Treg (Tarbell et al., 2004). Cette observation a été confirmée par d'autres auteurs dans des expériences de culture cellulaire *in vitro*. Ainsi les BMDC sont plus efficaces pour l'expansion des Treg que les CD spléniques, les LB, les macrophages ou encore les CD des ganglions (Yamazaki et al., 2003; Yamazaki et al., 2006). De plus, l'utilisation de CD présentant un peptide allogénique associé à ces molécules du CMH permet une plus forte expansion des Treg qu'avec des CD ne présentant pas cet antigène. Les Treg amplifiés, spécifiques du BCD (antigène naturel des cellules β des îlots pancréatiques), sont très performantes pour empêcher le développement du diabète (Tarbell et al., 2004).

Dans le modèle de transplantation décrit dans l'introduction générale (paragraphe IV.D.3), la tolérance doit être induite contre les antigènes du donneur ; c'est pourquoi l'expansion des Treg du receveur se fait à l'aide de CD syngéniques mais présentant les antigènes du donneur (Golshayan et al., 2007).

A l'inverse, dans les modèles de GVHD, la tolérance doit être induite vis-à-vis du receveur. L'expansion des Treg du donneur à l'aide de CPA du receveur de la transplantation de moelle permet d'obtenir des Treg spécifiques des antigènes du receveur (Trenado et al., 2006). L'efficacité de ces Treg spécifiques du receveur est supérieure à celle des Treg amplifiés de façon polyclonale *in vivo* (Trenado et al., 2006). De même, la comparaison de Treg du donneur amplifiés avec des CD syngéniques, allogéniques (du receveur) ou d'un tiers animal montre que les Treg spécifiques du receveur sont les plus efficaces pour empêcher la GVHD (Figure 20) (Yamazaki et al., 2006).

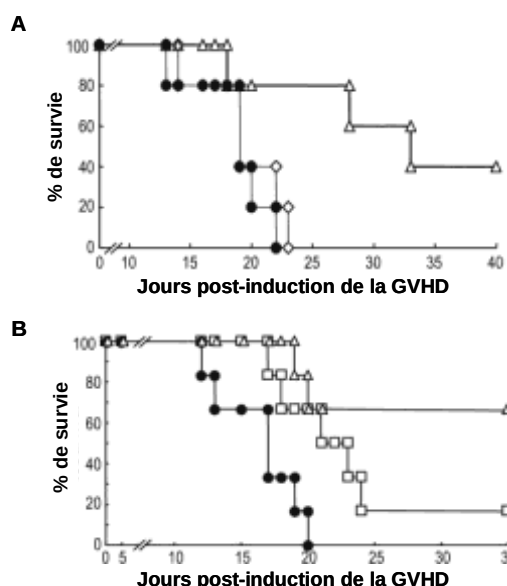


Figure 20 : Action suppressive antigène spécifique des Treg *in vivo*

Dans un modèle murin de GVHD, des souris BALBc irradiées reçoivent des LT allogéniques CD4+CD25- provenant d'une souris B6 (ronds pleins, schémas A/B) seuls ou avec i) des Treg B6 amplifiés avec des CD syngéniques (losanges vides, schéma A), ii) des Treg B6 amplifiés avec des CD BALBc (triangles vides, schémas A/B), iii) des Treg B6 amplifiés avec des CD d'un troisième animal (CBA) (carrés vides, schéma B). La survie des animaux est observée dans les différentes conditions.

D'après Yamazaki et al, 2006.

Chez l'homme, l'expansion de Treg en présence de CD autologues présentant l'allo-antigène HLA-A2 (Human leukocyte antigen A2) indique que ces Treg sont capables de supprimer la prolifération de LT effecteurs stimulés par des CD autologues présentant A2 (Jiang et al., 2003). De plus, suite à la première expansion des Treg en présence de CD présentant un antigène, les Treg sont spécifiques de cet antigène. Ces Treg peuvent alors être amplifiés de façon polyclonale (à l'aide de billes et IL-2) sans perdre leur spécificité (Jiang et al., 2006b).

Comme évoqué précédemment (paragraphe IV.D.1 de l'introduction générale), l'état de maturité des CD semble jouer un rôle important dans la distinction entre les cellules tolérogènes ou immunogènes. En ce qui concerne l'expansion des Treg par les CD, certains auteurs montrent que les CD matures sont plus efficaces pour expandre les Treg aussi bien

chez le rongeur (Brinster and Shevach, 2005; Hill et al., 2007) que chez l'homme *in vitro* et *in vivo* (Banerjee et al., 2006). A l'inverse, d'autres études montrent la supériorité des CD immatures pour assurer cette même fonction chez le rongeur (Matsumura et al., 2007; Turnquist et al., 2007) et chez l'homme (Jiang et al., 2003). Dans l'étude de Turnquist et al., les CD immatures favorisent la stimulation des Treg au détriment des LT effecteurs naïfs ou effecteurs. De plus, l'activité suppressive des Treg est plus efficace lorsque ces cellules ont été mises en présence de CD immatures par rapport à des CD matures (Turnquist et al., 2007).

I.D.3. Nécessité de l'utilisation d'IL-2

Dans les expériences d'expansion de Treg citées ci-dessus, la présence d'IL-2 dans le milieu de culture est indispensable à l'expansion des Treg.

Il existe cependant quelques études chez le rongeur montrant que l'expansion des Treg en utilisant certaines CD, comme les pDC (Ouabed et al., 2008) ou les BMDC (Brinster and Shevach, 2005) pourrait se réaliser sans IL-2. Dans l'étude de Brinster et al., les auteurs discutent d'une possible contamination des Treg par des LT conventionnels (lors de l'isolation des cellules). Suite à la stimulation par les CD, ces cellules contaminantes pourraient alors proliférer et sécréter de l'IL-2, permettant ainsi l'expansion des Treg (Brinster and Shevach, 2005).

Après expansion, les Treg conservent un haut niveau d'expression du CTLA4, du GITR, du CD25 et de Foxp3 aussi bien chez la souris que chez l'homme (Golshayan et al., 2007; Jiang et al., 2003; Jiang et al., 2006c). De façon similaire, les Treg amplifiés conservent leur fonction suppressive chez la souris et chez l'homme (Golshayan et al., 2007; Jiang et al., 2003; Jiang et al., 2006c). Certains auteurs montrent que les Treg amplifiés ont une meilleure activité suppressive *in vitro* que les Treg « frais ». (Tang et al., 2004; Tarbell et al., 2004; Yamazaki et al., 2006). Cette suppression est encore plus efficace si les Treg sont amplifiés de façon antigène spécifique (Yamazaki et al., 2006).

De plus, comme pour les CD, **les drogues immunosuppressives interviennent dans l'expansion et l'activité des Treg**. Ainsi, la rapamycine permet d'augmenter l'expansion des Treg *ex vivo* (Battaglia et al., 2005) et *in vivo* (Ruggenenti et al., 2007; Tian et al., 2004). En ce qui concerne l'activité des différentes drogues, certaines favorisent l'action des Treg *in vivo*, comme le MMF et la vitamine D3 par exemple alors que les inhibiteurs de la calcineurine ont un effet néfaste sur les Treg *in vivo* (pour revue, (Demirkiran et al., 2008)).

II. Objectifs

Les CD tolérogènes et les Treg sont les deux acteurs principaux de la tolérance périphérique (comme détaillé dans la quatrième partie de l'introduction générale). Lors de cette thèse, nous avons voulu savoir s'il était possible d'induire une tolérance à l'aide de CD tolérogènes ou de Treg chez le singe. Dans un premier temps, il était nécessaire de générer chez le macaque ces deux types cellulaires.

La génération de CD chez le singe a été réalisée soit à partir de précurseurs du sang périphérique, soit à partir de précurseurs de la moelle osseuse comme décrit précédemment. Aucune étude ne décrit comme c'est le cas chez le rongeur, une génération de CD à partir de la moelle totale. **Nous avons donc voulu tester l'efficacité du protocole de rongeur chez le macaque puis l'activité tolérogène des CD générées.** De plus, comme les études menées par Chauveau et al. ont montré que l'Hème-Oxygénase de type 1 (HO-1) était impliqué dans les caractéristiques tolérogènes des CD chez le rat et l'homme (Chauveau et al., 2005), **nous avons voulu connaître l'implication d'HO-1 dans l'activité tolérogène des CD simiennes.** Cette étude a permis la rédaction d'un second article en cours de soumission (Article II).

L'expansion de Treg isolés à partir du sang périphérique et amplifiés par des CD semble une solution intéressante pour obtenir des Treg efficaces et spécifiques d'un antigène (dans notre cas, le transgène). Selon l'origine et l'état de maturation des CD, la capacité des CD à expandre les Treg semble controversée. **Nous avons testé l'efficacité de différentes CD pour expandre les Treg chez le macaque.** Cette partie du travail a fait l'objet d'un troisième article publié (Article III).

La synthèse d'IL-10 par les CD tolérogènes apparaît comme un élément clé de leur activité protectrice de la réponse immune. Ainsi, les CD générées en présence d'IL-10 semblent particulièrement efficaces pour induire une tolérance dans des modèles murins (Muller et al., 2002; Sato et al., 2003). **Pour tester l'efficacité d'une tolérance périphérique au transgène rtTA dans le modèle de transfert de gènes développé au laboratoire chez le singe, nous avons injecté à ces animaux des CD traitées à l'IL-10 et présentant le rtTA.** Cette étude est en cours de réalisation et les résultats préliminaires obtenus seront décrits dans ce manuscrit.

III. Résultats

III.A- Génération de CD tolérogènes simiennes et rôle d'HO-1 dans ces cellules (Article II)

La génération de CD chez le singe peut se faire à partir de précurseurs du sang périphérique ou de la moelle osseuse comme décrit précédemment. A l'heure actuelle, aucune étude n'a testé la génération de CD simiennes à partir de la moelle osseuse totale, comme utilisé chez le rongeur et notamment à l'unité INSERM U643. En parallèle, Lutz et al. ont montré que l'absence d'IL-4 dans la culture de CD murines permettait de générer des CD plus immatures.

Résumé de l'article II :

Dans l'optique d'une génération de CD tolérogènes, ce deuxième article décrit pour la première fois la génération de CD simiennes différenciées à partir de la moelle osseuse totale sans IL-4. Comme chez le rat, les cellules obtenues à la fin de la culture peuvent se séparer en cellules dendritiques adhérentes ou non (Peché et al., 2005). Les CD adhérentes sont les plus immatures, ce sont les cellules d'intérêt dans cette étude. Dans la figure 1, nous montrons le phénotype, la morphologie et la capacité de ces cellules à stimuler la prolifération de LT allogéniques (Figure 1). Ainsi, les CD adhérentes nommées **iBMDC** (immature Bone Marrow derived Dendritic Cells) expriment le CMH, le CD11b, le CD11c, et de façon faible les molécules de costimulation CD80 et CD86 ainsi que le marqueur de maturation des CD, le CD83. De plus, ces cellules ont une morphologie caractéristique de CD immatures et une capacité faible à faire proliférer des LT allogéniques (comparé aux CD non-adhérentes). Les iBMDC expriment également fortement la protéine HO-1, connue pour être impliquée dans les actions anti-inflammatoires des CD (Chauveau et al., 2005). L'ensemble de ces caractéristiques définit les CD adhérentes de macaque comme des CD immatures, similaires aux iBMDC de rat (Peché et al., 2005).

Pour aller plus loin dans la fonction tolérogène de ces cellules, nous avons testé leur capacité à inhiber une prolifération allogénique. Dans ce test, la prolifération des PBMC de macaque (ou de LT de rat) est provoquée par des PBMC irradiées allogéniques de macaque (ou des CD spléniques irradiées allogéniques de rat). Les iBMDC irradiées simiennes ou de rat, lorsqu'elles sont ajoutées à la culture, sont très efficaces pour inhiber la prolifération des LT prouvant leur action tolérogène *in vitro*. Sachant que les iBMDC expriment HO-1 (démonstré

ici pour les CD simiennes et dans l'article de Chauveau et al. pour les CD de rat), nous avons voulu savoir si HO-1 était impliqué dans l'activité tolérogène *in vitro*. Dans cet article, nous montrons que le traitement des iBMDC par un inhibiteur de l'activité HO-1 (le SnPP) bloque la capacité des iBMDC à inhiber la prolifération des LT et empêche donc l'activité tolérogène des iBMDC aussi bien chez le rat que chez le singe (Figure 2). L'implication d'HO-1 dans l'activité fonctionnelle des iBMDC simiennes et de rat est donc clairement mise en évidence dans cette étude. Nous avons voulu renforcer ces résultats obtenus *in vitro* par une étude *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé le modèle de transplantation cardiaque mis au point chez le rat à l'unité INSERM U643 (décrit précédemment dans l'introduction générale). Dans ce modèle, l'injection des iBMDC la veille de la transplantation permet de prolonger la survie de la greffe. Dans cet article, nous montrons que la co-injection des iBMDC et d'un inhibiteur de l'activité HO-1 (le SnPP) aux animaux empêche la prolongation de survie du greffon apportée par les CD (Figure 2). HO-1 joue donc également un rôle primordial *in vivo* dans l'action tolérogènes des iBMDC.

Article II :

Heme-oxygenase-1 mediates the immunomodulatory effect of immature bone marrow-derived dendritic cells *in vitro* and *in vivo* both in rodents and in nonhuman primates

Auréli Moreau¹, Marcelo Hill², Paméla Thébault², Jack-Yves Deschamps³, Elise Chiffolleau², Christine Chauveau², Philippe Moullier¹, Ignacio Anegón², Brigitte Alliot-Licht B.² † and Maria-Cristina Cuturi² *†.

¹ INSERM U649, CHU Hotel-Dieu, Nantes Cedex, F44000 France ; ² INSERM U643, Nantes, F44000 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, F44000 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France ; ³ Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Service d'urgence, Nantes, F44000 France.

† Authors contributed similarly as senior investigators.

* Corresponding author

Short title: *HO-1 mediates immunomodulation induced by iBMDC*

Article en cours de soumission

Abstract

By the regulation of T-cell responses, immature dendritic cells (iDC) play a critical role in the induction and maintenance of tolerance. Heme oxygenase-1 (HO-1) is a potent immunosuppressive enzyme expressed by iDC. HO-1 overexpression in DCs impairs their T cell priming capacities. We hypothesized that HO-1 expressed by iDCs plays a role in their active immunomodulatory properties. Here, we generated and characterized macaque immature bone marrow-derived DC (iBMDC) with low T-cell stimulation capacity and high expression of the immunosuppressive enzyme heme oxygenase-1 (HO-1). We show, for the first time, that HO-1 can mediate the active immunosuppressive properties of macaque and rat iBMDC *in vitro*. Furthermore, HO-1 inhibition abrogates prolongation of allograft survival induced by injection of syngeneic iBMDC in rats. Our results provide mechanistic support for the use of iDC-based therapy in non-human primate pre-clinical studies, highlighting a role for HO-1 in the tolerogenic properties of iBMDC.

[FASEB J.](#) 2009 May 6.

The FASEB Journal. 2009;23:3070-3077

Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates.

[Moreau A](#), [Hill M](#), [Thébault P](#), [Deschamps JY](#), [Chiffolleau E](#), [Chauveau C](#), [Moullier P](#), [Anegon I](#), [Alliot-Licht B](#), [Cuturi MC](#).

*INSERM U649, CHU Hotel-Dieu, Nantes, France;INSERM U643, Nantes, France;CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Nantes, France;Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France; and||Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Service d'Urgence, Nantes, France.

Clinical translation of dendritic cell (DC)-based cell therapy requires preclinical studies in nonhuman primates (NHPs). The aim of this work was to establish the in vitro conditions for generation of NHP tolerogenic DCs (Tol-DCs), as well as to analyze the molecular mechanisms by which these cells could control an immune response. Two populations of NHP bone marrow-derived DCs (BMDCs) were obtained: adherent and nonadherent. Although both populations displayed a quite similar phenotype, they were very different functionally. We characterized the adherent BMDCs as Tol-DCs that were poor stimulators of T cells and actively inhibited T-cell proliferation, whereas the nonadherent population displayed immunogenic properties in vitro. Interestingly, the anti-inflammatory and immunosuppressive enzyme heme oxygenase-1 (HO-1) was up-regulated in Tol-DCs, compared to the immunogenic BMDCs. We demonstrated that HO-1 mediates the immunosuppressive properties of Tol-DCs in vitro (in NHPs and rats) and that HO-1 is involved in the in vivo tolerogenic effect of Tol-DCs in a rat model of allotransplantation. In conclusion, here we characterized the in vitro generation of NHP Tol-DCs. Furthermore, we showed for the first time that HO-1 plays a role in the active inhibition of T-cell responses by rat and NHP Tol-DCs.-Moreau, A., Hill, M., Thébault, P., Deschamps, J. Y., Chiffolleau, E., Chauveau, C., Moullier, P., Anegon, I., Alliot-Licht, B., Cuturi M. C. Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates.

Introduction

Heme oxygenases (HOs) are the rate-limiting intracellular enzymes that degrade heme to biliverdin, CO, and free divalent iron.¹ The inducible form, HO-1, has been described as anti-inflammatory¹ and immunosuppressive molecule.² In transplantation, overexpression of HO-1, or administration of its enzymatic products, prolongs allograft survival in rats.³⁻⁶ We have previously reported that HO-1 is expressed in human and rat immature dendritic cells (iDC).² Importantly, induction of HO-1 expression in DC impairs their allostimulatory capacities.² However, it remains to be determined whether HO-1 expressed by DC also actively inhibits an ongoing alloreactive T cell response. We believe that this issue is biologically relevant because if HO-1-expressing DC can actively inhibit alloreactive T cells, they might be an outstanding tool to induce allograft tolerance. In fact, there is an increased interest in applying iDC-based therapy *in vivo* to induce tolerance in the transplantation setting.^{7,8} However, an increased knowledge concerning iDC biology in non-human primates (NHP) is needed for the successful completion of pre-clinical studies.

We previously described the generation of iBMDC in rats and their ability to prolong allograft survival. In this study, we generated iBMDC from macaques and studied the role of HO-1 in the active immunosuppressive properties of NHP and rat iBMDC *in vitro*. We additionally analyzed whether HO-1 activity is needed to prolong rat allograft survival *in vivo* upon injection of iBMDC.

Materials and Methods

Animals

Cynomolgus macaques were purchased from BioPrim, (Baziège, France) and rats from the "Centre d'Elevage Janvier" (Genest-Saint-Isle, France). All animals were used for experimentation in accordance with our institutional and national ethical guidelines.

Generation of BMDC

Rat and macaque DC were generated from bone marrow precursors as previously described for rodents.^{7,9,10} Briefly, high quantities of macaque DC¹⁰ were generated from total BM. After lysis of red blood cells, cells were cultured (1×10^6 cells/ml) in complete medium supplemented with 1% heat inactivated macaque serum (collected in our animals) and 100U/ml recombinant human GM-CSF (Leucomax, Novartis, Basel, Switzerland). On day 3, the supernatant was replaced by fresh medium containing GM-CSF. On day 7, the non-adherent (NON-ADH) and adherent (ADH) cells were harvested.

Results/Discussion

We first generated and characterized macaque BMDC. We differentiated BM cells into DCs using a similar protocol to the one used in rodents, in which we previously described the generation of tolerogenic iBMDC able to prolong allograft survival *in vivo*⁷. At the end of the macaque BM culture, two populations were identified: one formed of large irregular-shaped adherent clusters (ADH population) and another consisting of individual non-adherent cells (NON-ADH population) (data not shown). Analysis of the phenotype of both populations revealed them to be heterogeneous with no major differences between the two. Most cells expressed CD45, HLA-DR and CD11b⁺ (Fig.1A) and about 10-20% of the HLA-DR positive cells additionally expressed CD86 (Fig.1B). Less than 5% of cells expressed CD83 (Fig.1A), CD20, CD56 and CD34 (data not shown). Further phenotypic characterization was performed by MGG and HO-1 staining (Fig. 1C). Cells with DC morphology,^{11,12} with a large eccentric nucleus and small dendrites, were observed in both populations. Interestingly, the two populations differed in their expression of HO-1. The ADH-BMDC showed a high level of HO-1 staining with around 54% of positive (+++) cells whereas the NON-ADH-BMDC exhibited a low level of HO-1 staining with 43% of cells being positive (+) (Fig.1C). Although the expression of costimulatory molecules and HLA-DR was similar between ADH-BMDC and NON-ADH-BMDC, the capacity to induce T cell proliferation was different in the two BMDC populations. As shown in Figure 1D, a very low degree of PBMC proliferation was induced by ADH-BMDC compared to NON-ADH ones. These results are in agreement with previous results in rats and humans showed that iDC expressing HO-1 are poor inducers of T-cell proliferation.² Moreover our results showed that the ADH-BMDC population generated in macaques have the same characteristics as those described in rats that were shown to have tolerogenic effects *in vivo*.⁷

We next performed experiments in both rats and macaques using ADH-BMDC that are herein referred to as iBMDC, to study their tolerogenic effects and to determine whether HO-1 is implicated in their active immunosuppressive capacity. iBMDC were thus tested for their capacity to regulate an allogeneic MLR in macaques and rats. Our results show that the addition of irradiated iBMDC to MLRs decreased the T-cell proliferation both in macaques (Fig.2A) and in rats (Fig.2B), in a dose-dependent manner.

To further determine whether HO-1 expressed by iBMDC plays a role in their immunomodulatory properties, we performed the same MLR suppressive assay with iBMDC that had previously been treated with SnPP (tin-protoporphyrin), a selective *in vitro* and *in vivo* inhibitor of HO-1 enzymatic activity.¹³⁻¹⁵ The iBMDC were pre-treated with SnPP, then washed and added to the MLR. This pulse SnPP treatment has been previously described by Taille et al¹⁶. This protocol leads to inhibition of HO-1 in iBMDC only and not in the stimulatory APCs present in the MLR. As shown in figure 2, the T-cell proliferation inhibition induced by iBMDC was abolished by HO-1 inhibition in macaques (Fig.2C) and in rats (Fig.2D). Further work will need to focus on determining whether HO-1 expressed by iBMDC directly inhibits alloreactive T cells, or whether there is impairment in stimulatory capacity of the APCs present in the MLR. Moreover, the role of HO-1-derived catabolites such as bilirubin⁶ or CO⁵ will need to be established. We also neutralized other molecules known to be involved in the regulation of an immune response, such as TGF- β , IL-10, and indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), but their effects were either insignificant, inconstant or absent (data not shown). The inhibition of iNOS partially reversed the inhibition of rat iBMDC⁷ but this effect was not observed in the macaque system (data not shown).

In order to assess the role of HO-1 in the suppressive activity of iBMDC *in vivo*, we used a previously described model of prolongation of heart allograft survival by the administration of syngeneic iBMDC in rats.⁷ Allograft survival of recipients treated with an intravenous injection of iBMDC one day before transplantation was compared to that observed following treatment with SnPP to block HO-1 production. As shown in Figure 2E, the prolongation of allograft survival due to the iBMDC treatment (n=12) was totally abrogated by the administration of SnPP (n=4) (p<0.05). These data demonstrate that HO-1 is implicated in the prolongation of allograft survival mediated by iBMDC *in vivo*.

The induction of HO-1 expression by pharmacological activators or gene transfer has been shown to have suppressive effects in a variety of conditions or disorders involving activation of the immune system, including transplantation, autoimmune disorders and inflammation.^{1,3,17,18} We have previously reported that HO-1 impairs the allostimulatory capacity of human and rat DCs.² Other groups have also shown that HO-1 can modulate maturation and/or migration of DC.^{4,13,19} In fact, HO-1 is beginning to be considered as a critical player in the network of immunosuppressive molecules expressed by DCs.⁸ Here we show, for the first time, that HO-1 can mediate the active immunosuppressive

capacities of tolerogenic DCs *in vitro* and *in vivo*. Finally, the identification of macaque iBMDC with tolerogenic potential mediated by HO-1 provides a step towards their application *in vivo*.

References

1. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev.* 2006;86:583-650.
2. Chauveau C, Remy S, Royer PJ, et al. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and pro-inflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood.* 2005;106:1694-1702.
3. Braudeau C, Bouchet D, Tesson L, et al. Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther.* 2004;11:701-710.
4. Martins PN, Kessler H, Jurisch A, et al. Induction of heme oxygenase-1 in the donor reduces graft immunogenicity. *Transplant Proc.* 2005;37:384-386.
5. Akamatsu Y, Haga M, Tyagi S, et al. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide protects hearts from transplant associated ischemia reperfusion injury. *Faseb J.* 2004;18:771-772.
6. Yamashita K, McDaid J, Ollinger R, et al. Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. *Faseb J.* 2004;18:765-767.
7. Peche H, Trinite B, Martinet B, Cuturi MC. Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors. *Am J Transplant.* 2005;5:255-267.
8. Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:610-621.
9. Lutz MB, Suri RM, Niimi M, et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol.* 2000;30:1813-1822.
10. Moreau A, Chiffolleau E, Beriou G, et al. Superiority of bone marrow-derived dendritic cells over monocyte-derived ones for the expansion of regulatory T cells in the macaque. *Transplantation.* 2008;in press.
11. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature.* 2003;425:516-521.
12. Schmitt C, Fohrer H, Beaudet S, et al. Identification of mature and immature human thymic dendritic cells that differentially express HLA-DR and interleukin-3 receptor in vivo. *J Leukoc Biol.* 2000;68:836-844.
13. Listopad J, Asadullah K, Sievers C, et al. Heme oxygenase-1 inhibits T cell-dependent

skin inflammation and differentiation and function of antigen-presenting cells. *Exp Dermatol*. 2007;16:661-670.

14. Shan Y, Pepe J, Lu TH, Elbirt KK, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Induction of the heme oxygenase-1 gene by metalloporphyrins. *Arch Biochem Biophys*. 2000;380:219-227.

15. Sardana MK, Kappas A. Dual control mechanism for heme oxygenase: tin(IV)-protoporphyrin potently inhibits enzyme activity while markedly increasing content of enzyme protein in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:2464-2468.

16. Taille C, El-Benna J, Lanone S, et al. Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. *J Biol Chem*. 2004;279:28681-28688.

17. Chauveau C, Bouchet D, Roussel JC, et al. Gene transfer of heme oxygenase-1 and carbon monoxide delivery inhibit chronic rejection. *Am J Transplant*. 2002;2:581-592.

18. Abraham NG, Asija A, Drummond G, Peterson S. Heme oxygenase -1 gene therapy: recent advances and therapeutic applications. *Curr Gene Ther*. 2007;7:89-108.

19. Kotsch K, Martins PN, Klemz R, et al. Heme oxygenase-1 ameliorates ischemia/reperfusion injury by targeting dendritic cell maturation and migration. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9:2049-2063.

20. Lindsey ES, Ono K, Pearce MB. Use of vascular stapler in clinical renal transplantation. *Jama*. 1968;205:180-181.

Legends Figures

Figure 1: Characterization of macaque BM-derived DC generated in the presence of GM-CSF.

(A) The phenotypic profile of the two populations of macaque BMDC (ADH and NON-ADH BMDC) was analysed. BMDC were stained with CD45-FITC (D058-1283), HLA-DR-PE (L243), CD86-APC (2331), purified CD83 (HB15ε), purified CD40 (SC-3), CD11b-PE (ICRF44), CD16-PE (3G8), CD14-FITC (M5E3), (BD-Pharmingen, Le Pont de Claix, France), CD11c-FITC (3,9) (Clinisciences, Montrouge, France) and purified CD80 (M24) (Innogenetics). For CD83, CD40 and CD 80 phenotyping, cells were first incubated with purified primary Ab, followed by FITC-secondary Ab (Donkey-anti-mouse-IgG (H⁺L), Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). These antibodies were directed against human antigens but cross-reacted with the cynomolgus macaque. Matching isotype control mouse Abs were included. Cells were analysed using a FACSCalibur with Cellquest software 3.1f (BD-Pharmingen). Intracellular staining with CD68-FITC (F7135, Dako, Trappes, France) was performed on cytocentrifuged cells after permeabilization with saponin. Semi quantitative analysis was performed by counting CD68-positive cells in 10 visual fields of x20 magnification. (B) BMDC were stained using a combination of anti-HLA-DR PE and anti-CD86 APC Abs. The numbers within the quadrants indicate the percentage of cells expressing the relevant markers. (C) BMDC (20000 cells) were cytocentrifuged onto microscopic glass slides, dried overnight at room temperature and underwent May Grunwald Giemsa (MGG) coloration. Cells were also fixed in acetone, permeabilized and stained with an anti-HO-1 primary mAb (HO-1-1, Stressgen, San Diego, CA) followed by a secondary FITC-Ab (Donkey-anti-mouse-IgG). Representative photographs of MGG and HO-1 staining were taken with a Nikon 950 digital camera (original magnification x40 + zoom and x63 respectively). The percentage of HO-1-positive cells was calculated in visual fields of x20 magnification. (D) Irradiated ADH and NON-ADH BMDC were cocultured with allogenic PBMC (1×10^5 cells) at different ratios in a 5-day MLR. PBMC proliferation was measured by ³[H] thymidine uptake during the last 9h and was expressed as counts per minute (cpm). Irradiated PBMC from the same BM donors were used as a control of the allogeneic response. The data are representative of ≥ 3 independent experiments.

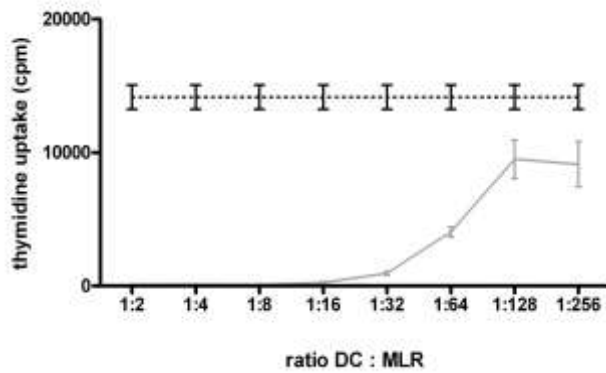
Figure 2: Immunomodulatory effect of iBMDC *in vitro* and *in vivo* in macaques and rats.

Role of HO-1

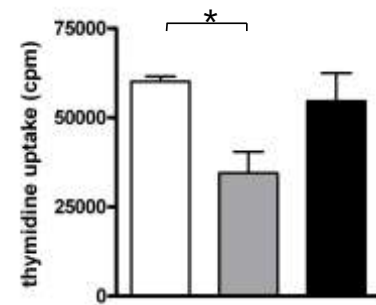
(A)(B). Graded doses of irradiated BMDC (grey line) provided from third party macaques (A) or LEW.1A (B) were added to an allogeneic MLR and cultured for 3 days. MLRs were performed between PBMC (1×10^5) from two different macaques (one of which was irradiated) (A) or between 1×10^5 T cells from RT1u and 5×10^4 irradiated splenic DC from LEW.1A (B). T cell proliferation was measured by ^3H thymidine uptake and was expressed as counts per minute (cpm). The MLR baseline is shown by a dotted line. The data are representative of (A) 12 experiments using cells from different macaques and (B) 3 experiments. (C)(D). Macaque (C) or rat (D) iBMDC were pre-incubated with 50 μM SnPP (an inhibitor of HO-1 activity, Frontier Scientific, Carnforth, UK) (black histogram) for 2 hours or not (grey histogram) and then washed. Next, iBMDC were irradiated and added to an allogeneic MLR (in C one iBMDC for 64 PBMC and in D one iBMDC for 32 T cells) and cultured for 3 days. Responder cell proliferation was measured by ^3H thymidine uptake and was expressed as cpm. The MLR baseline is represented as a white histogram. The data are representative of ≥ 3 experiments using cells from different animals. (E) LEW.1W rats served as heart donors and LEW.1A as recipients (RT1u and RT1a, respectively, complete MHC mismatch). Heterotopic cardiac allografts were performed as previously described.²⁰ Recipients were untreated, (untreated, n=8) or injected with 7×10^6 syngeneic iBMDCs the day before transplantation (iBMDCs, n=12). A group of allograft recipients receiving iBMDCs were treated by intraperitoneal injections of SnPP (60 $\mu\text{g/kg}$) once every 4 days (iBMDC + SnPP, n=4). As a control, heart allograft recipients received only intraperitoneal injections of SnPP (60 $\mu\text{g/kg}$) (SnPP, n=4). A two-tailed unpaired *t* test with 95% confidence intervals was performed using GraphPad Prism version 4. Mean values were considered statistically different if the *p* value was below 0.05 ($p < 0.05$).

FIGURE 2

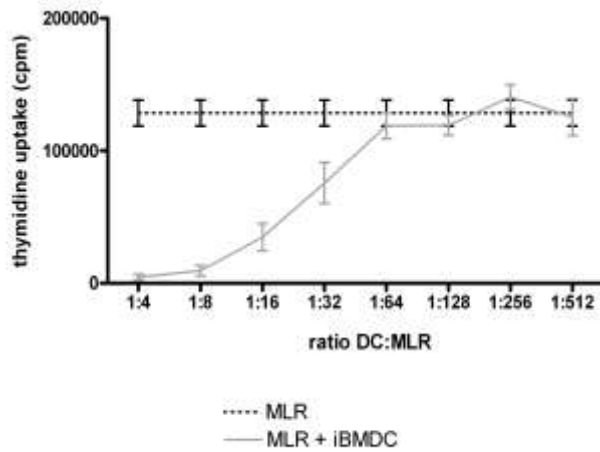
A - macaque



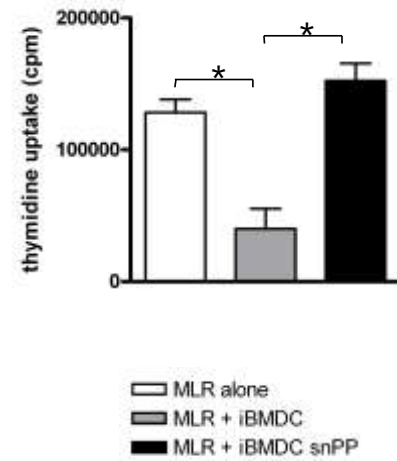
C - macaque



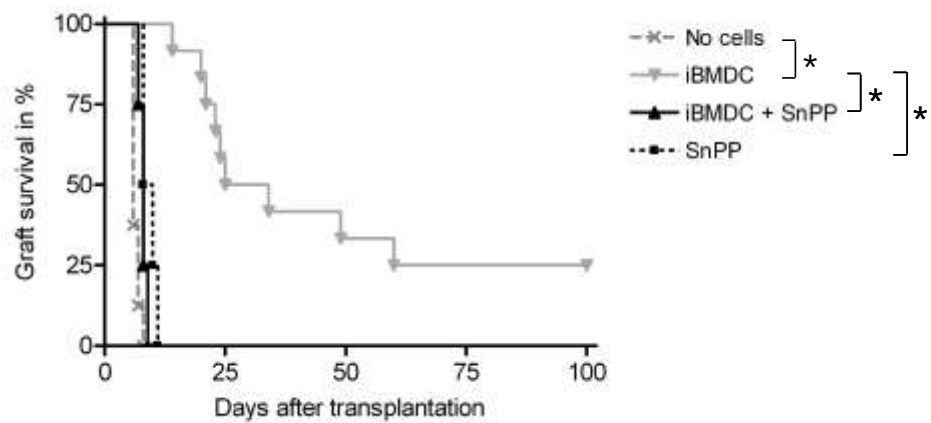
B - rat



D - rat



E



III.B- Expansion de Treg chez le primate (Article III)

Résumé de l'article III :

Les études menées sur l'expansion des Treg à l'aide de CD montrent que l'efficacité de l'expansion des Treg peut varier selon le type de CD utilisées que ce soit au niveau de l'origine des CD que de leur état de maturation. Nous avons donc généré des CD de différentes origines (sang et moelle osseuse) et dans différentes conditions, puis nous avons testé leur capacité à expandre les Treg. Les CD ont été différenciées à partir de deux origines : les précurseurs CD14⁺ issus du sang périphérique et les précurseurs de la moelle osseuse avec ou sans sélection préalable des cellules CD34⁺. Dans l'ensemble des conditions, les cellules ont été cultivées pendant 7 jours en présence de GM-CSF et d'IL-4. Contrairement à l'article précédent, nous n'avons pas séparé les cellules adhérentes et les cellules non-adhérentes à la fin de la culture. Le phénotype des différentes CD générées est décrit dans la figure 1. Les CD issues de la moelle et sélectionnées ou non par l'expression du CD34 ont un phénotype très similaire, avec environ 60% de cellules HLA-DR⁺, 50% de cellules CD86⁺ et 30% de cellules CD11c⁺. Cependant, la quantité de CD obtenues à partir de la moelle osseuse sans tri est 25 fois supérieure à celle obtenue à partir des précurseurs CD34⁺. Ces cellules forment une population hétérogène qualifiée de **CD semi-matures**. A l'inverse, les CD issues des monocytes sont très homogènes exprimant le CMH (90%) et la molécule de costimulation CD86 (85%), leur phénotype apparaît plus mature que celui des CD issues de la moelle.

Nous avons isolé les Treg à partir des PBMC chez le macaque en les triant (cytomètre de flux trieur) selon leur expression du CD4, du CD25 et du CD127. Les Treg CD4⁺CD25⁺CD127⁻ obtenus par tri cellulaire expriment Foxp3 (Figure 2) et sont capables de supprimer la prolifération de LT allogéniques stimulés de façon polyclonale (anticorps anti-CD3/anti-CD28). La culture des Treg avec les différentes CD permet de constater que les CD issues de la moelle sont plus efficaces pour l'expansion des Treg que les CD issues des monocytes. Dans tous les cas, les cellules amplifiées conservent leur expression CD4⁺CD25⁺ (Figure 2). Les Treg amplifiés expriment plus fortement Foxp3 que les Treg fraîchement isolés (Figure 2) et conservent leur activité suppressive (Figure 3). En ce qui concerne les LT CD4⁺CD25⁻ (non-Treg), leur expansion par les CD est moins importante que celle des Treg. De plus, après expansion, ces cellules acquièrent l'expression de Foxp3 mais ne présentent pas d'activité suppressive (Figures 2 et 3).

Article III :

**Superiority of bone marrow-derived dendritic cells over monocyte-derived
ones for the expansion of regulatory T cells in the macaque**

Aurélie Moreau¹, Elise Chiffolleau², Gaëlle Beriou³, Jack-Yves Deschamps⁴, Michèle Heslan², Joanna Ashton-Chess², Fabienne Rolling¹, Régis Josien², Philippe Moullier¹, Brigitte Alliot-Licht² † and Maria-Cristina Cuturi² *†.

¹ INSERM U649, CHU Hôtel-dieu, Nantes Cedex, F44000 France ; ² INSERM, U643, Nantes, F44000 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, F44000 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France ; ³Center for Neurologic Diseases Brigham and Women's Hospital 77 Ave Louis Pasteur, NRB 641 Boston, MA 02115 ; ⁴ Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Service d'urgence, Nantes, F44000 France

† Authors contributed similarly as senior investigators.

* Corresponding author

Publié dans Transplantation, en 2008

Superiority of Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Over Monocyte-Derived Ones for the Expansion of Regulatory T Cells in the Macaque

Aurélien Moreau,¹ Elise Chiffolleau,² Gaëlle Beriou,³ Jack-Yves Deschamps,⁴ Michèle Heslan,² Joanna Ashton-Chess,² Fabienne Rolling,¹ Régis Josien,² Philippe Moullier,¹ Maria-Cristina Cuturi,^{2,5} and Brigitte Alliot-Licht²

Regulatory T cells (Treg) have been identified as playing a pivotal role in the control of tolerance and in the suppression of pathologic immune responses in autoimmune diseases, transplantation, and graft-versus-host disease. Treg expanded ex vivo by dendritic cells could be potential reagents to promote antigen-specific tolerance in vivo. However, in vivo studies have been carried out mostly in rodents and will need validation in primates before clinical application. We characterized macaque dendritic cell derived either from bone marrow with and without prior CD34⁺ cell selection (BMDC), or from CD14⁺ peripheral blood mononuclear cells (Mo-DC). We demonstrate that with a semi-mature phenotype, BMDC are superior to Mo-DC in their capacity to expand freshly isolated allogeneic macaque CD4⁺CD25⁺CD127⁺ Foxp3⁺ Treg in vitro in the presence of interleukin-2. Moreover, the expanded Treg maintain their phenotype and suppressive activity. These data provide a step toward the use of macaque dendritic cell to expand Treg for future preclinical testing.

Keywords: Dendritic cells, T regulatory cells, Nonhuman primate.

(*Transplantation* 2008;85: 000–000)

There is an increased interest in in vivo applications of Treg in cell based-therapy for the restoration of tolerance in autoimmunity or for the induction of tolerance to foreign antigens in the context of transplantation or gene therapy. In rodents and humans, Treg are anergic in vitro and suppress T-cell receptor (TCR)-induced proliferation of CD4⁺CD25⁺ cells. In experimental models, ex vivo-expanded Treg have been shown to mediate transplantation tolerance (1, 2). If preclinical studies are to be performed successfully, greater knowledge and understanding of Treg biology in nonhuman primates is necessary. Although, in vitro, murine and human Treg can be efficiently expanded by polyclonal stimulation (α CD3, α CD28), their stimulation by dendritic cells (DC) can lead to the expansion of antigen-specific Treg that are more useful for controlling an immune response (3–8). The expansion of Treg by murine DC has been shown to depend on DC origin (bone marrow-derived but not splenic DC expand Treg without interleukin [IL]-2) (9). There is also some evidence to show that maturation state may be important, al-

though the data are somewhat contradictory with some authors showing that mature but not immature DC are able to expand Treg (9, 10) and others showing that immature DC favor the proliferation of Treg (11–13). In nonhuman primates, naturally occurring Treg have been characterized (14–16) as have Treg expanded in vitro through polyclonal TCR activation (15). Because in mice both mature and immature DC can initiate the expansion of Treg, in this study, we generated and characterized DC with different states of maturation from macaque bone marrow and peripheral blood monocytes and compared their capacity with expand allogeneic CD4⁺CD25⁺CD127⁺ Foxp3⁺ Treg in vitro.

Five cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*; BioPrim, Baziège, France) were used for experimentation in accordance with institutional and national ethical guidelines. The protocols used for the generation of DC in the nonhuman primate have until now used prior selection of CD14 cells from peripheral blood (Mo-DC) (17) or CD34 precursors from bone marrow (BM) (18, 19). Here, we additionally tested in macaques, existing methods for rodent BMDC expansion without prior cell selection (20, 21). The generation of the three types of DC (Mo-DC and DC from BM with or without prior selection of CD34 positive cells) is described in the legend of Figure 1. The phenotype of the DC generated under these different conditions was analyzed after 7 days of culture. As shown in Figure 1, Mo-DC exhibited a more mature phenotype than BMDC, because the majority of the Mo-DC expressed human leukocyte antigen (HLA)-DR (92%), CD86 (87%), CD11b (81%), and CD11c (71%). Both BMDC culture conditions on the other hand generated heterogeneous populations displaying a similar semi-mature phenotype (Fig. 1), with nearly two thirds expressing HLA-DR and almost a half expressing CD86 (Fig. 1B). Between 30% and 50% of BMDC expressed CD11b and CD11c (Fig. 1B), suggesting that the HLA-DR/CD86-BMDC cells

This work was supported by Nantes Metropole, the Association Française contre les Myopathies, the Association Nantaise de Thérapie Génique (ANTG), the Fondation Progreffe, the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de la Loire, and the INSERM.

The last two authors contributed equally as senior investigators.

¹ INSERM U649, CHU Hôtel-dieu, Nantes Cedex, France.

² INSERM U643; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT; and Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France.

³ Center for Neurologic Diseases Brigham and Women's Hospital, Boston, MA.

⁴ Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Service d'urgence, Nantes, France.

⁵ Address correspondence to: Maria Cristina Cuturi, INSERM U643 CHU Hôtel-Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France.

E-mail: Maria-Cristina.Cuturi@univ-nantes.fr

Received 25 October 2007. Revision requested 20 November 2007.

Accepted 12 February 2008.

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

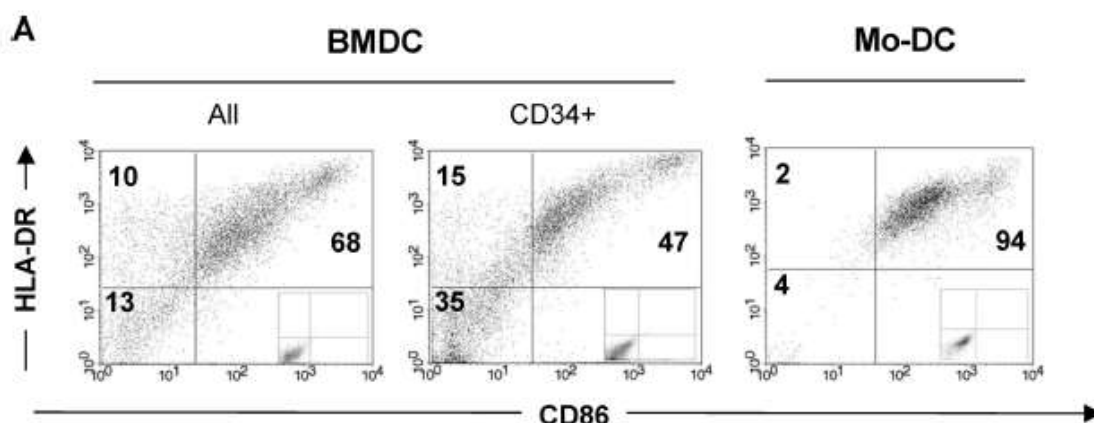
ISSN 0041-1337/08/8509-1

DOI: 10.1097/TP.0b013e31816f22d6

Transplantation • Volume 85, Number 9, May 15, 2008

1

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

**B**

Cluster of Differentiation	DC from total BM (BMDC)	CD34-derived DC	CD14-derived DC (Mo-DC)
CD45	71.8 ± 0.2	50.5 ± 2.5	67.0 ± 2.1
HLA-DR	61.9 ± 12.5	62.3 ± 0.8	92.0 ± 3.9
CD86	48.5 ± 12.3	45.0 ± 2.3	86.8 ± 4.9
CD83	11.0 ± 2.8	6.9 ± 0.3	6.5 ± 1.1
CD40	39.7 ± 10.2	33.0 ± 3.5	66.0 ± 0.7
CD11c	31.0 ± 6.5	31.0 ± 4.9	71.0 ± 4.6
CD11b	50.0 ± 12.8	41.5 ± 3.9	81.0 ± 3.5
CD16	8.1 ± 2.2	3.7 ± 1.5	28.2 ± 4.8
CD14	32.0 ± 8.3	33.2 ± 1.6	66.0 ± 1.4
CD20	0.4 ± 0.1	1.3 ± 0.5	0.4 ± 0.1

FIGURE 1. Phenotype of macaque DC generated in the presence of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and IL-4. The Mo-DC and CD34-derived BMDC (clone 564, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) were generated as previously described (19) in complete medium with 1,000 U/mL of recombinant human GM-CSF purchased as Leucomax (Novartis, Basel, Switzerland) and 500 U/mL of recombinant macaque IL-4 from the Department of Pathology (Emory University, Atlanta, GA). The protocol for the generation of DC from BM without precursor selection was similar to that described previously in rats (20). Briefly, after red blood cell lysis, cells were cultured with 1,000 U/mL of recombinant human GM-CSF and 500 U/mL of recombinant macaque IL-4. On day 3, the supernatant of the three different cultures was discarded and replaced by fresh medium containing cytokines. On day 7, the three different DC populations (Mo-DC, CD34-derived BMDC and BMDC) were mechanically harvested and stained using mouse antibodies (Abs) directed against human antigens but cross-reactive with the cynomolgus macaque: CD45 fluorescein isothiocyanate (FITC) (clone D058-1283), HLA-DR PE (clone L243), CD86 antigen presenting cell (APC) (clone 2331), purified CD83 (clone HB15e), purified CD40 (clone SC-3) (BD Biosciences), CD11c FITC (clone 3,9) (Clinisciences, Montrouge, France), CD11b PE (clone ICRF 44), CD16 PE (clone 3G8), CD14 FITC (clone MSE3), and CD20 FITC (clone L27) (BD Biosciences). A secondary Donkey anti-mouse IgG (H⁺L) FITC Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) was used with the two purified primary Abs. Staining was analyzed by a FACSCalibur with Cellquest software 3.1f (BD Biosciences). Matching mouse isotype antibodies IgG1 PE/FITC/APC (clone MOPC-21), IgG2a PE/FITC (clone G155-178), and IgG2b FITC (clone 27-35) from BD Biosciences were included as controls. (A) DC were stained using a combination of anti-HLA-DR PE and anti-CD86 APC Abs. The numbers within the quadrants indicate the percentage of cells expressing the relevant markers (a representative experiment of three is shown). (B) Table providing data representative of three independent experiments (results are expressed as mean ± SD).

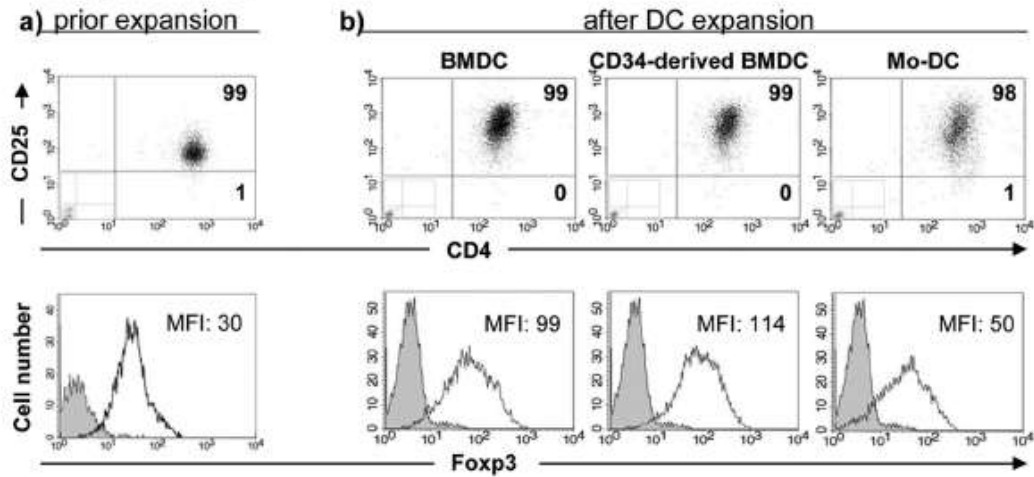
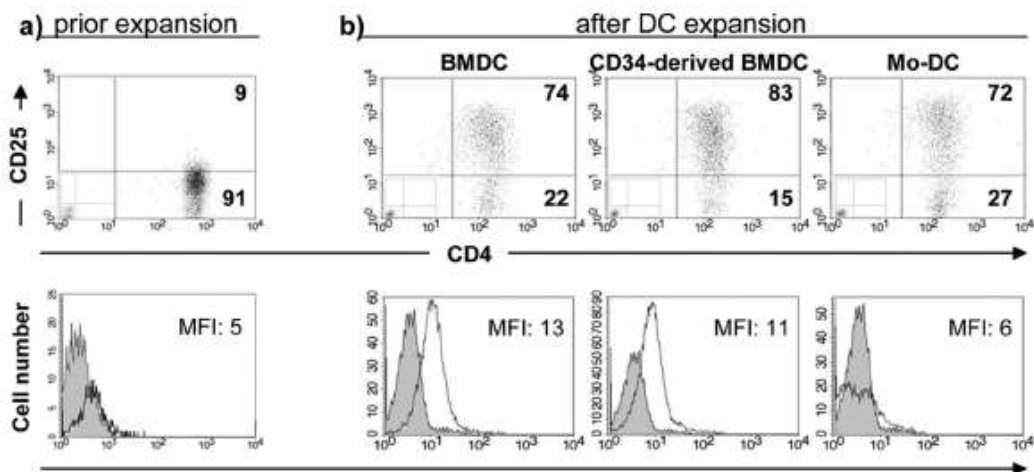
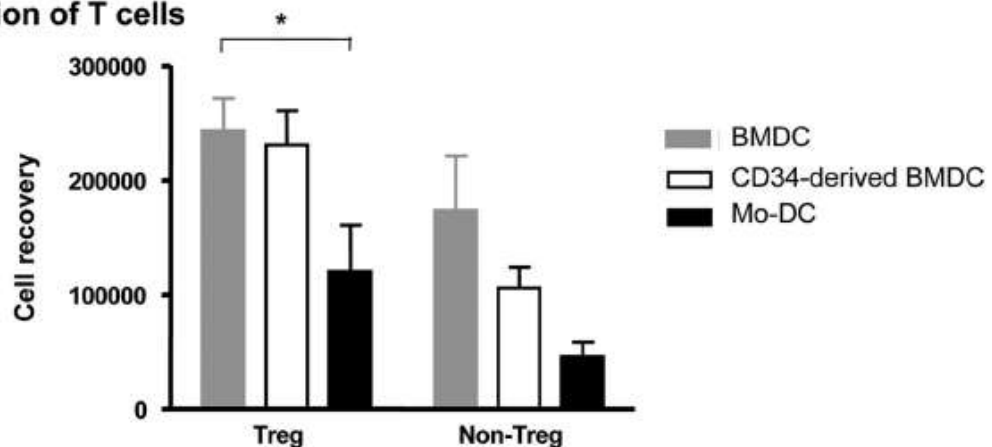
A Phenotype of Treg**B Phenotype of Non-Treg****C Expansion of T cells**

FIGURE 2. Expansion and phenotype of T cells upon culture with the different DC populations. Treg were purified from PBMC by flow cytometry cell sorting (FACSARIA, BD Biosciences) with anti-CD4 FITC (clone MT477) (BD Biosciences),

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

were semi-mature. Interestingly, 25-fold more DCs were obtained when using the total pool of precursors as opposed to prior CD34 selection.

To identify the more efficient DC (among the three types described) to expand macaque Treg in vitro, we compared the level of allogeneic Treg expansion induced by BMDC (with or without prior CD34⁺ cell selection) with that induced by Mo-DC (Fig. 2).

Macaque Treg (0.4% of PBMC) were selected by fluorescence-activated cell sorting (FACS) sorting. To exclude contaminating effector cells that express CD25 and the IL-7 α chain receptor CD127 (16, 22), Treg were purified as CD4⁺CD25⁺CD127⁻ cells. Purified CD4⁺CD25⁻ T cells (non-Treg) were used as controls. After purification, the phenotypic profiles of the Treg and non-Treg were analyzed (Fig. 2A-a and 2B-a). As described in humans and mice (16, 23, 24), more than 90% of macaque Treg expressed Foxp3 [mean fluorescence intensity (MFI)=30; Fig. 2A-a] whereas less than 5% of non-Treg expressed Foxp3 (MFI=5; Fig. 2B-a). When tested for suppressive activity, only freshly isolated Treg were suppressive (38% of inhibition). These results suggested that, as in humans (16), macaque regulatory T cells are the CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺ T cell population.

Purified Treg and non-Treg were then cocultured with the different irradiated DC in the presence of recombinant human IL-2. As shown in Figure 2(C), macaque Treg proliferated in the presence of allogeneic Mo-DC or BMDC. The same level of Treg expansion was observed with BMDC generated with or without prior CD34 selection. Even though BMDC displayed a less mature phenotype than Mo-DC (Fig.

1), they exhibited the highest capacity to induce Treg proliferation (25-fold compared with 12-fold expansion, $P<0.05$; Figure 2C). In accordance with previous report showing that murine immature BMDC treated by Rapamycin potently expanded Treg compared with non-Treg (12), in our study non-Treg also proliferated in culture with allogeneic DC and IL-2 but less than Treg in the same conditions. No significant difference in non-Treg proliferation was observed between BMDC and Mo-DC (Fig. 2C; $P=0.1$). Moreover, in our setting and as observed by others (3), IL-2 was required for the in vitro BMDC-induced expansion of CD4⁺CD25⁺ but not CD4⁺CD25⁻ T cells (data not shown). Interestingly, our data thus demonstrate that allogeneic BMDC with a semi-mature phenotype are able to expand macaque Treg. Moreover, the capacity to induce Treg proliferation in our conditions was dependent on DC origin (BMDC vs. Mo-DC), as previously reported in mice (9).

We next determined the phenotype and function of the expanded macaque Treg. As shown in Figure 2(A-b), expanded Treg increased their intensity of expression of CD25 and Foxp3 (MFI between 50 and 114 for Foxp3). These results are in accordance with a previous study (25) showing that IL-2 can up-regulate the expression of Foxp3 in human purified Treg. Having shown that macaque Treg maintain their phenotype upon expansion, we next investigated whether this held true for their suppressive activity. A suppression assay was thus performed on allogeneic PBMC labeled with carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) and stimulated with anti-CD3 Ab. As shown in Figure 3(A) (a representative experiment), the addition of Treg (at a ratio of 1-Treg to 3-PBMC) led to a decrease in proliferation from 34% to 19% (led to a 43% inhibition) whereas the addition of non-Treg increased proliferation. The results of four independent experiments (Fig. 3B) showed that the addition of Treg to stimulated PBMC led to a statistically significant inhibition of proliferation ($28.5\% \pm 7.9$ of inhibition, $P=0.01$). Similar suppressive activity was observed with Treg expanded by CD34-derived DC, whereas Mo-DC-expanded Treg displayed a lower suppressive activity (data not shown). Moreover, Treg cultured with IL-2 but without BMDC did not proliferate but preserved both their expression of Foxp3 and their suppressive activity (data not shown). Taken together, these results show that macaque Treg maintain their Foxp3 expression as well as their suppressive activity after 7 days of expansion by BMDC and IL-2.

As expected, upon BMDC-induced activation, macaque non-Treg expressed CD25 (Fig. 2B-b). Interestingly, low intracellular expression of Foxp3 (MFI around 10) was also detectable (Fig. 2B-b) but they nevertheless displayed no suppressive activity (Fig. 3). Given these results and the presence of three populations (CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{low}, and CD4⁺CD25⁻) in the expanded non-Treg population (Fig. 2B-b), we wished to determine whether regulatory cells were present in the expanded non-Treg population. For this purpose, CD25^{high} and CD25^{low} subsets were isolated from BMDC-expanded non-Treg by flow cytometry sorting and tested for their expression of Foxp3 and their suppressive activity. The CD25^{high} population expressed more Foxp3 than the CD25^{low} population but no suppressive activity was observed (data not shown). In mice, there is an excellent correlation between Foxp3 expression and regulatory activity, but

FIGURE 2. (Continued) anti-CD25 APC (clone BC96) (Clinisciences), and anti-CD127 PE (clone hIL-7R-M21) (BD Biosciences) Abs. Gating was performed on CD4⁺ cells (based on forward and side light scatter) and CD25 and CD127 expression analyzed. For T cell expansion, purified Treg (CD4⁺CD25⁺CD127⁻; purity >98%) or non-Treg (CD4⁺CD25⁻; purity >90%) were seeded in 96-well U-bottom plates at 1×10^4 cells per well and cultured with 1×10^4 allogeneic irradiated DC [DC from total BM (n=6), CD34-derived DC (n=3) and CD14-derived DC (n=3)]. Cultures were performed in 200 μ L medium supplemented with 300 U/mL of IL-2 (from Proleukin, Chiron Corp., Emeryville, CA) for 7 days. (A, B) Purified T cells before and after DC expansion were stained for cell surface expression of CD4⁺ and CD25⁺ (the numbers within the quadrants indicate the percentage of cells expressing the relevant markers) or were fixed, permeabilized, and stained for intracellular Foxp3 expression. Intracellular staining with Foxp3-PE (clone PCH101) was performed according to the manufacturer's instructions (Clinisciences) and analyzed by FACS. Overlapping histograms of Foxp3 staining (line) and control staining (solid) are shown. (C) T cell expansion was assessed after 7 days of culture by counting the number of viable cells (dead cells were excluded by eosin staining). A two-tailed unpaired *t* test with 95% confidence intervals was performed using GraphPad Prism version 4. Mean values were considered statistically different if the *P* value was below 0.05 ($P<0.05$). Little or no proliferation was observed for Treg cultured in the presence of IL-2 without DC or in the presence of DC without IL-2 (not shown).

F3

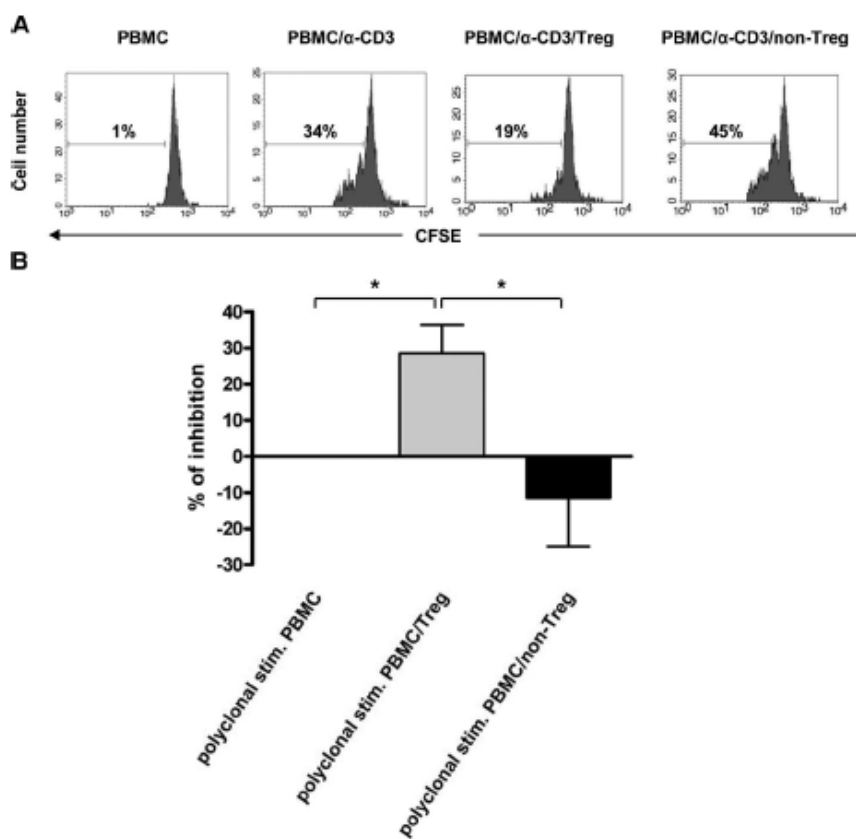


FIGURE 3. Suppressive activity of Treg expanded by DC derived from total BM. The ability of purified T cells (Treg or non-Treg) expanded by total BM-derived DC to exert suppression was tested. During all of the suppression assays, PBMC from BM donor or from third-party macaque were labeled with 5 μ M CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR) and used as responder cells. These PBMC (3×10^4 cells) were cultured alone (PBMC) or stimulated by 1 μ g/mL purified anti-CD3 ϵ (clone SP34, BD Biosciences) (PBMC/ α -CD3 in A) with or without 200 ng anti-CD28 (clone CD28.2, BD Biosciences) (polyclonal stimulated PBMC in B). Stimulated PBMC were co-cultured with 1×10^4 T cells (Treg expanded by BMDC or non-Treg expanded by BMDC). After 3 days of culture, T cells were stained with anti-CD3 APC (clone SP34-2; BD Biosciences) and proliferation was assessed by FACS according to the loss of CFSE staining in the live/CFSE⁺/CD3⁺ population to exclude allogeneic T cells (Treg or non-Treg). (A) A representative experiment is shown. (B) The percentage of inhibition of four independent experiments is represented. Statistical analysis was performed as described in the legend of Figure 2. Similar data were obtained when using PBMC from the same donor as the BM or from a third-party macaque (data not shown).

in humans the situation is considerably more complex (26). In fact, Gavin et al. (27) have shown that after TCR stimulation, human CD25⁺ T cells can express Foxp3 but are not suppressive in vitro.

In this study, we have been able to generate and characterize DC from macaque bone marrow and monocytes. In addition, in this particular nonhuman primate, we have isolated CD4⁺CD25⁺CD127⁻ cells that express Foxp3 and display suppressive activity. The ability of BMDC to expand these Treg and thereby preserve their regulatory function provides new insight into the future preclinical testing of alloantigen-specific Treg in the macaque. In rodents, most protocols to expand alloantigen-specific Treg use dendritic cells (donor or recipient-type DC). DC-expanded Treg may prove advantageous in the context of tolerance given the potential necessity for achieving antigen-specific suppression.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank NIH/NCRR-funded Resource for Nonhuman Primate Immune Reagents for providing the rhesus macaque IL-4. They also thank Knut Stieger for English editing.

REFERENCES

1. Masteller EL, Tang Q, Bluestone JA. Antigen-specific regulatory T cells—ex vivo expansion and therapeutic potential. *Semin Immunol* 2006; 18: 103.
2. Golshayan D, Jiang S, Tsang J, et al. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood* 2007; 109: 827.
3. Yamazaki S, Inaba K, Tarbell KV, et al. Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells including suppressors of alloreactivity. *Immunol Rev* 2006; 212: 314.
4. Yamazaki S, Patel M, Harper A, et al. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2758.
5. Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, et al. Expansion of FOXP3 high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after

- injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood* 2006; 108: 2655.
6. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, et al. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004; 199: 1467.
 7. Coenen JJ, Koenen HJ, Emmer PM, et al. Allogeneic stimulation of naturally occurring CD4+CD25+ T cells induces strong regulatory capacity with increased donor-reactivity. *Transpl Immunol* 2007; 17: 237.
 8. Trenado A, Sudres M, Tang Q, et al. Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells. *J Immunol* 2006; 176: 1266.
 9. Brinster C, Shevach EM. Bone marrow-derived dendritic cells reverse the anergic state of CD4+CD25+ T cells without reversing their suppressive function. *J Immunol* 2005; 175: 7332.
 10. Hill M, Tanguy-Royer S, Royer P, et al. IDO expands human CD4+CD25 high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur J Immunol* 2007; 37: 3054.
 11. Rutella S, Lemoli RM. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol Lett* 2004; 94: 11.
 12. Turnquist HR, Raimondi G, Zahorchak AF, et al. Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol* 2007; 178: 7018.
 13. Matsumura Y, Kobayashi T, Ichiyama K, et al. Selective expansion of foxp3-positive regulatory T cells and immunosuppression by suppressors of cytokine signaling 3-deficient dendritic cells. *J Immunol* 2007; 179: 2170.
 14. Porter CM, Horvath-Arcidiacono JA, Singh AK, et al. Characterization and expansion of baboon CD4(+)CD25(+) Treg cells for potential use in a non-human primate xenotransplantation model. *Xenotransplantation* 2007; 14: 298.
 15. Gansuud B, Asiedu CK, Goodwin J, et al. Expansion of CD4+CD25+ suppressive regulatory T cells from rhesus macaque peripheral blood by FN18/antihuman CD28-coated Dynal beads. *Hum Immunol* 2007; 68: 478.
 16. Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, et al. Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods* 2007; 319: 41.
 17. O'Doherty U, Ignatius R, Bhardwaj N, et al. Generation of monocyte-derived dendritic cells from precursors in rhesus macaque blood. *J Immunol Methods* 1997; 207: 185.
 18. Pinchuk LM, Grouard-Vogel G, Magaletti DM, et al. Isolation and characterization of macaque dendritic cells from CD34(+) bone marrow progenitors. *Cell Immunol* 1999; 196: 34.
 19. Ashton-Chess J, Blanche G. An in vitro evaluation of the potential suitability of peripheral blood CD14(+) and bone marrow CD34(+) derived dendritic cells for a tolerance inducing regimen in the primate. *J Immunol Methods* 2005; 297: 237.
 20. Peche H, Trinite B, Martinet B, et al. Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors. *Am J Transplant* 2005; 5: 255.
 21. Lutz MB, Suri RM, Niimi M, et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1813.
 22. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1701.
 23. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, et al. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J Clin Invest* 2005; 115: 3276.
 24. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330.
 25. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 2006; 108: 1571.
 26. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: Multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006; 25: 195.
 27. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 6659.

III.C- Injection des iBMDC10 dans notre modèle de transfert de gènes chez le primate (résultats supplémentaires)

III.C.1. Génération et caractérisation de CD en présence d' IL-10 (iBMDC10)

La littérature indique que les BMDC cultivées en présence d'IL-10 sont plus efficaces que les CD cultivées sans IL-10 pour induire une tolérance (Muller et al., 2002; Sato et al., 2003). Dans l'optique d'obtenir des CD possédant des caractéristiques les plus tolérogènes possibles, nous avons comparé la génération de CD décrites dans l'Article II (iBMDC) avec ou sans ajout d'IL-10 humaine recombinante dans le milieu de culture. Le phénotype des CD adhérentes obtenues ainsi que leur capacité à stimuler la prolifération de LT allogéniques ont été analysés (Figure 21A).

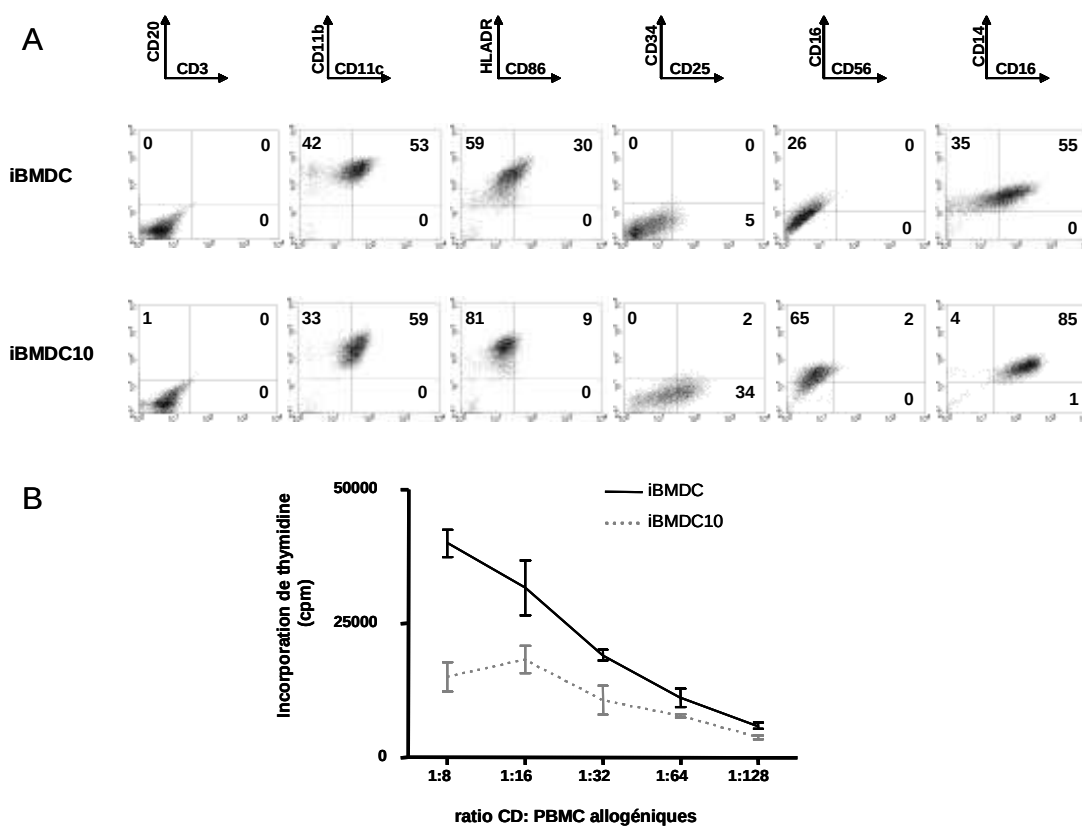


Figure 21 : Comparaison du phénotype et de la fonction des iBMDC cultivés avec ou sans IL-10. (A) Les iBMDC cultivées avec ou sans IL-10 (20 ng/ml) ont été incubées avec différents anticorps humains (réagissant chez le macaque) puis le phénotype de ces cellules a été analysé par cytométrie de flux. (B) Les iBMDC (avec ou sans IL-10) ont été irradiées puis mises en culture en présence de PBMC allogéniques à différents ratios. La prolifération des PBMC est analysée à 3 jours plus tard par mesure de la quantité de thymidine incorporée dans ces cellules.

Ces résultats montrent que l'ajout d'IL-10 dans la culture des CD permet d'obtenir une population plus homogène exprimant les marqueurs myéloïdes CD11b/CD11c et également le CMH de classe II avec pas ou peu d'expression des molécules de costimulation CD86 (Figure 21A). En ce qui concerne la fonction de ces cellules, nous observons une faible capacité des iBMDC10 à entraîner la prolifération de PBMC allogéniques (mesurée par incorporation de thymidine tritiée) (Figure 21B). **Ces résultats sont en accord avec un phénotype et une fonction de CD tolérogènes.**

Par la suite, nous avons comparé la résistance à la maturation des iBMDC et des iBMDC10 en présence de LPS. Pour cela, à la fin de la culture, les cellules ont été stimulées pendant 24 heures avec ou sans LPS puis analysées. Nous constatons que d'un point de vue phénotypique, le LPS n'entraîne pas la maturation des CD (pas d'augmentation de l'expression du CD86), aussi bien pour les CD cultivées avec ou sans IL-10 (Figure 22A).

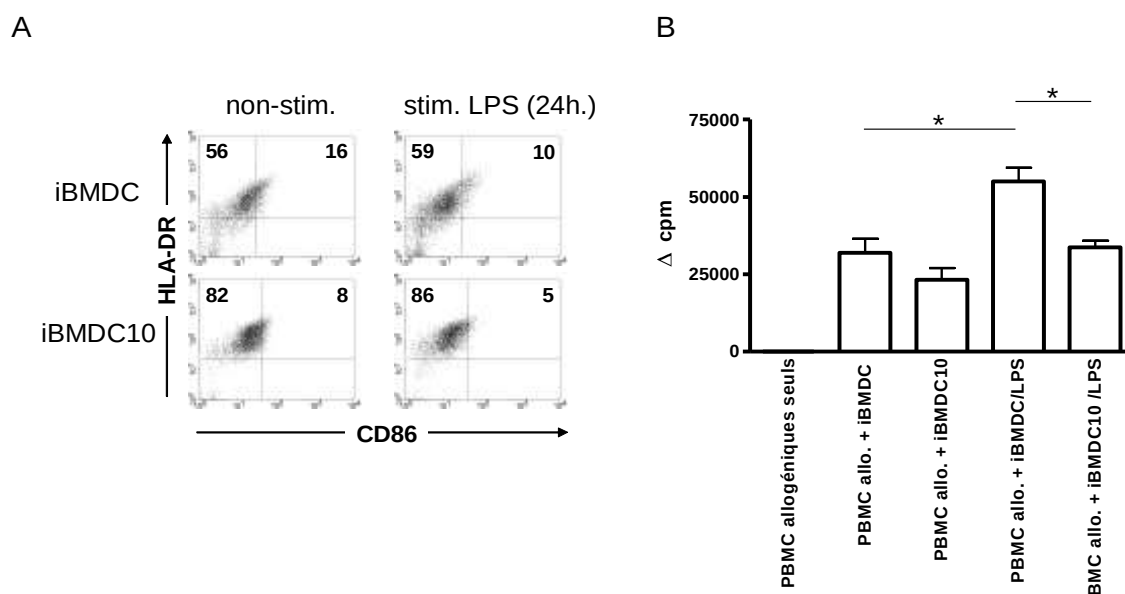


Figure 22 : Résistance des iBMDC à la maturation

Les iBMDC et iBMDC10 stimulées ou non pendant 24H en présence de LPS (1 μ g/ml) ont été analysées (A) pour leur expression des marqueurs HLA-DR et CD86 par cytométrie de flux et (B) pour leur capacité à faire proliférer des LT allogéniques (comme décrit Fig. 21). Seul le ratio 1 CD:8 PBMC est montré sur cette figure. Les statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Student avec un indice de confiance de 95 % ($p < 0.05$).

D'un point de vue fonctionnel, une augmentation significative ($p < 0,05$) de la prolifération de PBMC allogéniques a été observée lorsque les iBMDC sont stimulées avec le LPS, suggérant une maturation de ces cellules. A l'inverse, la stimulation LPS des iBMDC10 ne modifie pas

significativement la capacité de ces cellules à stimuler une prolifération allogénique. De plus, la prolifération des PBMC incubés avec les iBMDC stimulés au LPS est plus importante (différence significative) que celle des PBMC incubés avec les iBMDC10/LPS (Figure 22B).

Ces résultats montrent la supériorité des iBMDC10 (par rapport aux iBMDC) à résister à une maturation provoquée par le LPS.

III.C.2. Présentation de l'antigène rtTA à la surface des iBMDC10

Dans des modèles de pathologies auto-immunes comme l'EAE, l'utilisation des CD présentant l'antigène d'intérêt à leur surface est plus efficace pour contrer le développement de la maladie que les CD ne présentant pas cet antigène (Menges et al., 2002). Afin de nous placer dans les meilleures conditions pour induire une tolérance au rtTA dans notre modèle de transfert de gènes, nous avons voulu générer des CD présentant le rtTA à leur surface. Pour cela, deux principales techniques ont été utilisées, soit l'incubation des CD avec la protéine rtTA, soit l'infection des CD à l'aide de vecteurs viraux. Nous avons ainsi testé différents vecteurs pour transduire les CD: les 5 scAAVr-GFP décrits dans la partie « Etude de l'induction d'une tolérance centrale » (Article I), le vecteur LV-rtTA/GFP décrit également précédemment et un vecteur adénoviral rtTA élaboré au laboratoire. Les résultats obtenus ont montré une faible efficacité de transduction des CD avec l'ensemble de ces vecteurs (inférieure à 30% des cellules). De plus, l'utilisation de ces vecteurs viraux a entraîné une maturation des CD (visibles par l'augmentation de l'expression du CD86).

En parallèle, nous avons testé les propriétés naturelles des CD de capture et de présentation d'un peptide au niveau du CMH de classe II. L'analyse immunohistologique des iBMDC10 incubées avec le rtTA montre la présence intracytoplasmique du rtTA (utilisation d'un anticorps anti-rtTA) après perméabilisation (Figure 23A). Ce marquage montre l'efficacité des iBMDC10 à phagocyter le rtTA mais non leur capacité à présenter le rtTA à leur surface. Pour savoir si les CD étaient capables de présenter efficacement le rtTA à leur surface, nous avons généré des iBMDC à partir de la moelle osseuse d'un animal immunisé avec le rtTA. Les CD ont ensuite été incubées une nuit soit en présence de rtTA, soit en présence d'OVA (contrôle négatif) puis les cellules ont été lavées, irradiées puis mises en présence des LT autologues (triés par déplétion des cellules CD20⁺CD86⁺CD11b⁺) et la prolifération des LT a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée. Nos résultats montrent que les iBMDC incubées avec le rtTA entraînent une prolifération des LT supérieure à celle observée avec les iBMDC incubées avec l'OVA (différence significative) (Figure 23B). Les LT effecteurs spécifiques du rtTA présents chez l'animal immunisé reconnaissent donc le rtTA associé aux

molécules du CMH de la CD. Ces résultats suggèrent que les CD incubées avec le rtTA présentent le rtTA à leur surface.

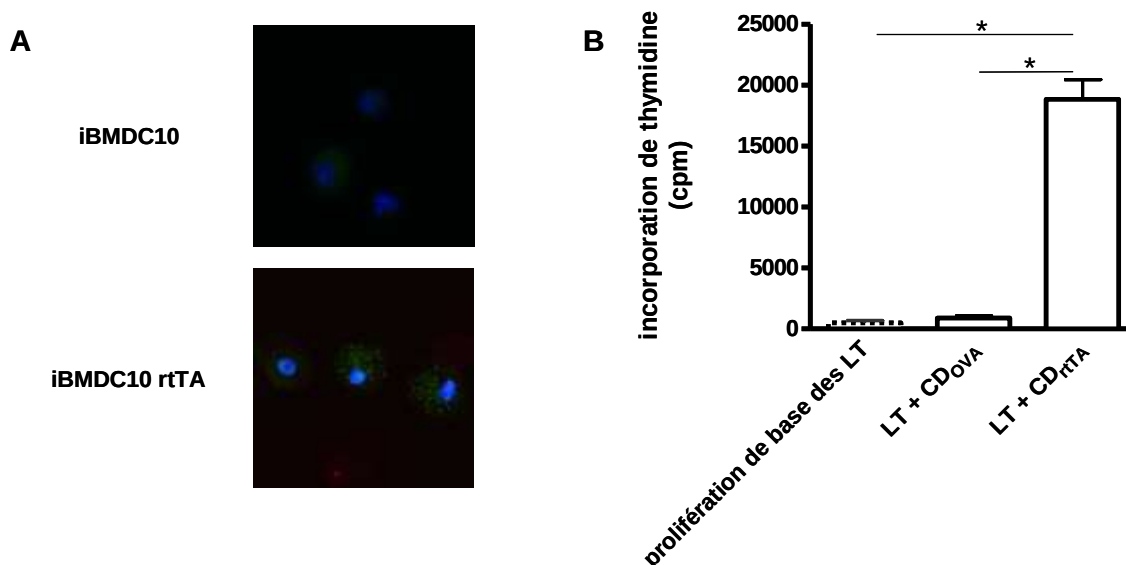


Figure 23 : Capacité des iBMDC à présenter le rtTA à leur surface.

A. Des iBMDC10 ont été incubées ou non une nuit avec la protéine rtTA (10µg/ml) puis marqués à l'aide d'un anticorps anti-rtTA révélé par un second anticorps couplé au FITC. B. Des iBMDC provenant de l'animal immunisé avec le rtTA ont été stimulés une nuit avec la protéine rtTA ou la protéine OVA. Ces CD stimulées ont ensuite été mises en présence de LT autologues (triés par déplétion des CD CD86+CD20+CD11b+). La prolifération des LT a été mesurée comme précédemment (Fig .21). La figure représente le ratio 1DC :4 LT. Les statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Student avec un indice de confiance de 95 % ($p < 0.05$).

Ces tests d'efficacité ont été réalisés à partir d'iBMDC, cependant, la capacité de présenter le rtTA à leur surface et d'induire la stimulation de LT effecteurs sont souvent caractéristiques de CD immunogènes matures. Bien que les iBMDC (cultivées avec ou sans IL-10) semblent relativement résistantes à la maturation par le LPS, nous avons voulu vérifier que l'incubation avec le rtTA n'entraînait pas de maturation des CD. Ainsi, des iBMDC et des iBMDC10 ont été incubées une nuit avec ou sans le rtTA et avec ou sans l'IL-10. Nous observons que d'un point de vue phénotypique, la stimulation des iBMDC avec le rtTA entraîne une augmentation de l'expression du CD86 (passage de 19% de cellules positives à 37%) (Figure 24A). A l'inverse, le pourcentage d'expression du CD86 n'est pas modifié dans les iBMDC10 suite à la stimulation rtTA. Pour les iBMDC et les iBMDC10, l'ajout d'IL-10 dans la culture en même temps que la stimulation rtTA entraîne une forte diminution du marqueur CD86 (Figure 24A). L'observation de la production d'ARNm codant pour l'IL-10 indique que les iBMDC10 produisent plus d'IL-10 que les iBMDC. Ceci reflète la différence entre les 2

populations de CD immatures. De plus, le rtTA n'induit pas de production d'IL-10 par les iBMDC (différence non significative) alors que la stimulation rtTA induit fortement la production d'IL-10 par les iBMDC10 (résultat significatif) (Figure 24B). **Nos résultats indiquent que suite à une stimulation, comme celle provoquée par l'incubation des CD avec le rtTA, l'addition d'IL-10 exogène dans le milieu diminue la maturation des iBMDC. De plus, les iBMDC10 résistent à la maturation et synthétisent de l'IL-10.**

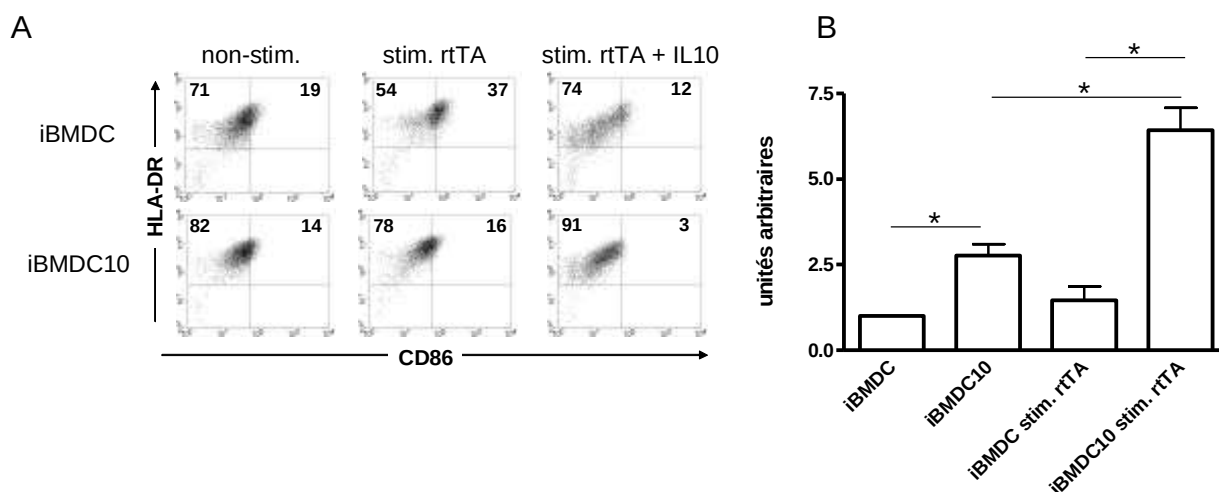


Figure 24 : Caractérisation des iBMDC et iBMDC10 stimulées avec le rtTA.

Les iBMDC (cultivées avec ou sans IL-10) sont stimulées une nuit avec ou sans rtTA (10 µg/ml) et avec ou sans IL-10 (20 ng/ml). Les cellules ont ensuite été analysées (A) pour leur expression des marqueurs HLA-DR et CD86 par cytométrie de flux. (B) La production d'ARNm IL-10 par les CD a été mesurée par RT-PCR quantitative à l'aide d'amorces spécifiques de l'IL-10 de macaque. Les statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Student avec un indice de confiance de 95 % ($p < 0.05$).

A l'analyse de ces résultats, les iBMDC10 apparaissent comme les meilleures candidates pour l'induction d'une tolérance dans notre modèle de transfert de gènes.

III.C.3. Injection des CD chez le macaque

Lors de l'étude de la réponse immunitaire développée contre le transgène suite au transfert de gènes à l'aide d'AAVr dans le muscle observée au laboratoire, le développement d'une réponse cytotoxique a été mise en évidence en utilisant des cellules mononucléées issues des ganglions alors que cette réponse immune n'est pas visible à partir de PBMC (Favre et al., 2002). Ces résultats confortent l'idée que la réponse immunitaire a certainement lieu au niveau du ganglion drainant le muscle injecté. C'est pour cette raison que nous avons choisi d'apporter les CD tolérogènes au niveau du ganglion drainant. Les injections intramusculaires d'AAVr sont réalisées dans le muscle tibial cranial, le principal ganglion drainant

ce muscle est le ganglion poplité. Il est possible que le ganglion inguinal, qui draine également les muscles de la jambe soit également impliqué lors du développement de la réponse immunitaire. Dans le cadre de ce projet, nous avons donc cherché à apporter des CD tolérogènes dans ces 2 chaînes ganglionnaires.

Dans cette optique, nous nous sommes demandés quelle était la meilleure voie d'administration des CD pour qu'elles migrent dans le ganglion drainant le muscle injecté par le vecteur AAVr. Comme décrit ultérieurement dans la discussion, l'étude de la littérature indique deux principales voies d'injection possibles pour apporter des CD dans le ganglion, soit une injection sous-cutanée (SC) au niveau de la zone du ganglion, soit une injection intradermique (ID). Nous avons voulu tester le mode d'administration le plus adéquat dans notre contexte. Pour cela, des iBMDC ont été générées à partir de la moelle osseuse d'un primate puis marquées avec un fluorochrome, la PKH26. Ce fluorochrome marque la membrane des cellules en s'incorporant au niveau des régions lipidiques et permet ainsi de les suivre suite à une injection *in vivo*. Le signal a un spectre d'émission de 567 nm et est visible en microscopie à fluorescence (marquage rouge). Des injections sous cutanées et intradermiques de 5 millions de iBMDC marquées à la PKH26 ont été réalisées au niveau des zones ganglionnaires axillaires droite (SC) et gauche (ID) du même animal dans des conditions autologues (animal donneur de la moelle osseuse). La biopsie des ganglions à 3 jours post-injection montre une forte quantité de cellules PKH positives suite à l'injection ID et quelques rares cellules PKH positives suite à l'injection SC (Figure 25).

L'administration des CD par injection ID a donc été choisie pour la suite de l'étude.



Figure 25 : Observation des iBMDC 3 jours après leur injection en sous-cutanée ou intra-dermique dans la région du ganglion

Les iBMDC ont été marquées par la PKH26 (marquage rouge) puis injectées soit en sous-cutanée, soit en intra-dermique dans la région des ganglions axillaires chez un macaque. Des biopsies de ganglions réalisées 3 jours plus tard ont été observées par un microscope confocal (grossissement x20). Les noyaux sont marqués au topro3 (marquage bleu).

III.C.4. Test d'induction de tolérance périphérique par les iBMDC10 chez le macaque

Trois macaques pilotes ont été injectés en intra-dermique au niveau du ganglion inguinal avec des iBMDC10 présentant le rtTA. Le but de cette expérimentation préliminaire était de vérifier que l'injection des CD n'entraînait pas le développement d'une réponse immune humorale ou cellulaire contre le rtTA.

L'analyse des sérums par Western blot a permis de détecter la présence transitoire d'anticorps anti-rtTA chez un des trois animaux. Ces anticorps sont présents du 19^{ème} au 25^{ème} jour post-injection et sont détectés avec un anticorps secondaire anti-IgG totaux (Figure 26A).

En ce qui concerne la réponse cellulaire, à partir d'un prélèvement de sang réalisé à une semaine post-injection, nous avons stimulé les PBMC des trois animaux pilotes avec la protéine rtTA ou la protéine OVA. En parallèle, ce test a été réalisé avec les PBMC d'un animal immunisé avec le rtTA. L'observation de la prolifération des PBMC (provenant des macaques ayant reçu les iBMDC10-rtTA) montre que la protéine rtTA n'entraîne pas plus de prolifération de ces PBMC que la protéine OVA. A l'inverse, la stimulation des PBMC de l'animal immunisé par le rtTA entraîne une forte prolifération des PBMC, suggérant la présence de LT effecteurs spécifiques du rtTA uniquement chez l'animal immunisé (Figure 26B). De plus, une sécrétion d'IFN γ dans le milieu de culture et dosée par ELISA a été détectée uniquement dans le cas de la stimulation à l'aide du rtTA des PBMC de l'animal immunisé. Une expérience similaire a été réalisée à partir des cellules issues des ganglions (et non des PBMC) des animaux injectés avec les CD. Aucune différence de prolifération n'a été observée entre la stimulation OVA et rtTA.

Ces résultats montrent l'absence d'une réponse immunitaire cellulaire contre le rtTA chez les animaux injectés avec les iBMDC10 stimulées avec le rtTA.

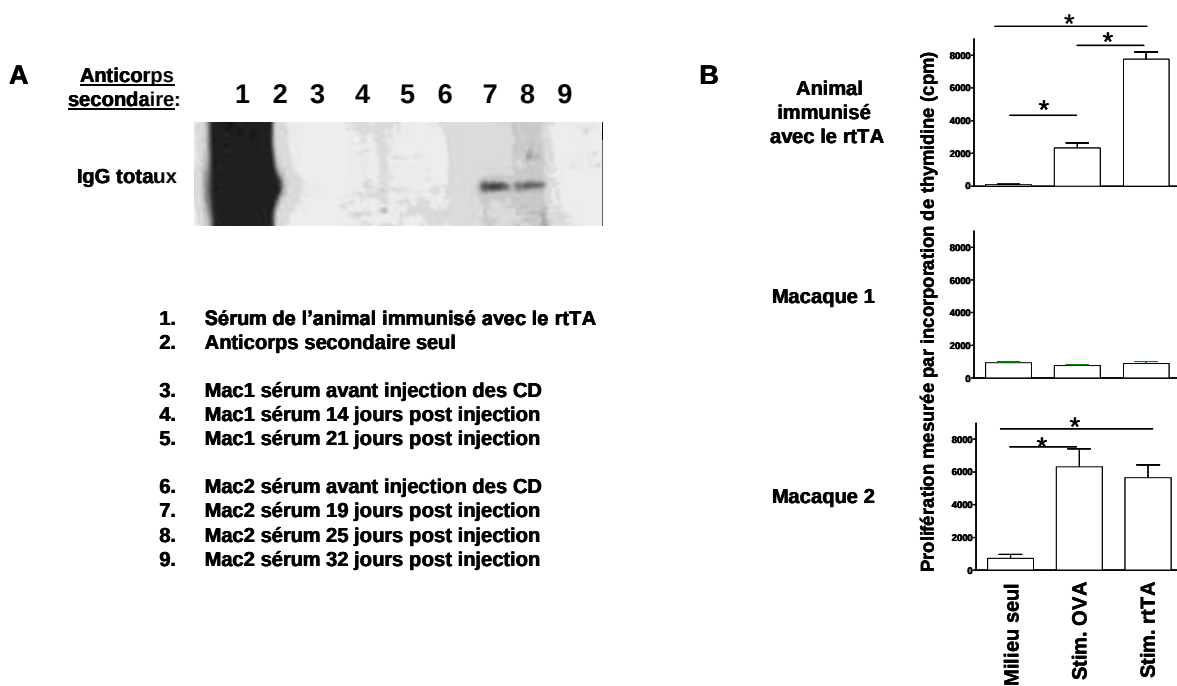


Figure 26 : Observation de la réponse immunitaire chez les animaux injectés avec les iBMDC10-rtTA

A. La présence d'anticorps anti-rtTA a été recherché par Western blot dans le sérum des animaux injectés à différents temps. La technique est similaire à celle décrite dans la Figure 13 en utilisant un anticorps anti-rtTA. B. Les PBMC des animaux ont été isolés à une semaine post-injection des iBMDC10-rtTA et mis en présence de la protéine rtTA ou de la protéine OVA pendant une nuit. La prolifération a ensuite été analysée comme précédemment (Fig.21). Pour ces deux expériences, le témoin positif correspond au sérum ou aux PBMC de l'animal immunisé avec le rtTA. Les résultats obtenus avec le 3^{ème} animal injecté avec les iBMDC10-rtTA sont similaires à ceux obtenus avec Mac1. Les statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Student avec un indice de confiance de 95 % ($p < 0.05$).

IV. Discussion

IV.A- Génération de CD simiennes ex vivo

IV.A.1. 1. A la recherche de CD tolérogènes chez le singe

i) Mo-DC versus les BMDC

La génération de CD chez l'homme est réalisée principalement à partir des monocytes du sang périphérique. A l'inverse, chez les rongeurs, les CD sont généralement générées à partir de la moelle osseuse. Le prélèvement à partir de la moelle est plus riche en précurseurs de CD que celui réalisé à partir du sang mais il est également plus complexe. L'utilisation de CD de la moelle osseuse dans des protocoles d'induction de tolérance chez l'animal montre l'efficacité de ces cellules (paragraphe IV.C.3 de l'introduction générale). Dans ces conditions, nous avons décidé de comparer l'efficacité des CD provenant du sang et de la moelle osseuse chez le macaque. La différenciation des CD à partir des monocytes ou de la moelle osseuse a été réalisée dans les mêmes conditions de culture. Nos résultats montrent un phénotype plus mature pour les CD obtenues à partir du sang périphérique (expression plus forte du CMH de classe II, du CD86 et du CD40) (Article III – Figure 1). De plus, la quantité de CD obtenu par cette technique est beaucoup plus faible. **Le but étant d'obtenir des CD tolérogènes ayant un phénotype immature, notre intérêt s'est porté sur les CD dérivées de la moelle osseuse.**

ii) BMDC avec ou sans sélection

Dans la littérature, les protocoles d'obtention de CD à partir de la moelle osseuse chez le primate (babouin ou macaque) débutent par une sélection des précurseurs CD34⁺ (Ashton-Chess and Blancho, 2005; Pinchuk et al., 1999). A l'inverse, le protocole de génération de CD chez le rat (utilisé à l'unité INSERM U643 et décrit précédemment) ne nécessite pas de sélection. La comparaison de ces deux protocoles chez le macaque montre que les CD obtenues ont un profil phénotypique et fonctionnel très similaire (Article III- Figures 1 et 2). Cependant, nous obtenons beaucoup moins de CD si nous réalisons un tri des précurseurs CD34⁺. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : **i)** La technique de tri par billes nécessitant de nombreux lavages, il est possible qu'une partie des précurseurs CD34⁺ soit perdue lors du tri. **ii)** Dans la culture réalisée à partir de la moelle totale, la sélection des cellules se réalise lors du changement de milieu ; seules les cellules adhérentes sont

conservées. Il est alors possible que la présence des autres types cellulaires (hors cellules précurseurs) favorise la division cellulaire des précurseurs et par conséquent le nombre de cellules pouvant se différencier en CD. **iii)** Les cellules CD34⁺ ne sont pas les seuls précurseurs des CD et à partir de la moelle osseuse totale, tous les précurseurs présents dans la moelle sont conservés. La présence d'une plus grande quantité de précurseurs au début de la culture de la moelle osseuse totale permettrait alors d'obtenir une plus grande quantité de CD à la fin de la culture.

iii) BMDC générés avec ou sans IL-4

Dans la plupart des études, les CD sont générées en présence de GM-CSF et d'IL-4. Une étude menée par Lutz et ses collaborateurs a montré que la génération de CD en absence d'IL-4 permettait d'obtenir des CD possédant un phénotype plus immature et efficaces *in vivo* pour induire une prolongation de survie du greffon dans un modèle murin de transplantation (Lutz et al., 2000). Face à ces résultats, nous avons étudié des CD isolées à partir de la moelle osseuse totale de macaque et cultivées en présence de GM-CSF avec ou sans IL-4. Les CD cultivées sans IL-4 (iBMDC) sont caractérisées dans l'article II (Figure 1) alors que le phénotype des CD générées en présence de GM-CSF et d'IL-4 est décrit dans l'article III (Figure 1). L'observation du phénotype des BMDC montre que les CD cultivées en présence d'IL-4 expriment plus fortement (environ 3 fois) le marqueur de costimulation CD86 suggérant que ces cellules sont plus matures. De plus, nous avons comparé la morphologie, la capacité d'induire une prolifération de LT allogéniques et la résistance à la maturation des CD obtenues dans ces deux conditions de culture (résultats non montrés dans ce manuscrit). Ainsi, l'observation de la morphologie des CD cultivées en présence d'IL-4 montre la présence de dendrites nombreuses et de grande taille contrairement aux CD cultivées sans IL-4. L'observation de la capacité des CD à faire proliférer des PBMC allogéniques montre que les CD générées en présence d'IL-4 entraîne une plus forte prolifération des PBMC allogéniques que les iBMDC. Enfin, l'observation de la résistance des CD à une maturation induite par du LPS ou par un mélange de cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6 et PGE₂) indique que les cellules dendritiques cultivées sans IL-4 sont plus résistantes à la maturation que les CD cultivées avec l'IL-4. L'ensemble de ces observations confirme dans un modèle de gros animal les résultats obtenus par Lutz et al. chez la souris (Lutz et al., 2000). Dans ce travail, les BMDC obtenus sans IL-4 appelées iBMDC ont un profil très similaire à celui des iBMDC de rat utilisés à l'unité INSERM U643 et dont l'activité toléroène a été montrée *in vivo* (Pêche et al., 2005).

L'utilisation des iBMDC *in vivo* chez le macaque est complexe car nous ne possédons pas un modèle simple et défini de réponse immunitaire. La réponse immunitaire obtenue après transfert de gènes est bien caractérisée mais elle n'est pas présente chez tous les animaux et apparaît au bout de 6 à 8 mois après l'injection du vecteur. A défaut de pouvoir vérifier l'activité tolérogène des CD *in vivo*, nous avons testé leur effet *in vitro* dans une culture cellulaire de PBMC allogéniques (Figure 2- Article II). Dans ce test de prolifération, nous montrons que l'ajout d'iBMDC provenant d'un animal tiers empêche la prolifération des PBMC. Les iBMDC ont donc la capacité d'inhiber la prolifération des LT *in vitro*. De plus, cette inhibition est dose dépendante de la quantité d'iBMDC ajoutées à la culture (Article II- Figure 2). A l'inverse, l'ajout de BMDC cultivées en présence d'IL-4 augmente la prolifération des PBMC (résultat non montré dans ce manuscrit). Ce système a été transposé chez le rat. De la même façon, les iBMDC de rat inhibent une prolifération allogénique (Article III-Figure 2). **Cette étude renforce l'idée que les iBMDC de macaque ont des caractéristiques similaires à celles obtenues chez le rat et qu'elles possèdent une activité tolérogène.**

IV.A.2. Rôle d'HO-1

L'implication d'HO-1 dans le phénotype et la fonction des CD a été étudiée par Chauveau et ses collaborateurs (Chauveau et al., 2005). Cette étude menée à l'unité INSERM U643 a montré qu'HO-1 était fortement exprimé dans les CD immatures et que cette expression était inhibée suite à la maturation des CD par du LPS. De plus, la surexpression de HO-1 (par du CoPP) diminue la capacité des CD à induire une prolifération de LT allogéniques, entraîne une diminution de la sécrétion d'IFN γ et augmente la sécrétion d'IL-10 (Chauveau et al., 2005). Ces résultats indiquent qu'HO-1 serait impliqué dans l'activité tolérogène des CD immatures chez le rat et l'homme.

Nous avons donc observé l'expression d'HO-1 par immunohistologie dans la population de CD immatures de macaque. La moitié des CD environ expriment très fortement HO-1 ; à l'inverse, les BMDC cultivées en présence d'IL-4 expriment faiblement HO-1. Une quantification précise est difficile car l'anticorps anti-HO-1 ne fonctionne pas en cytométrie de flux. La réalisation d'un Western blot spécifique d'HO-1 est en cours de réalisation. Nos résultats confirment cependant les résultats de Chauveau et al. obtenus chez l'homme et le rat et montrent que les CD immatures de macaque expriment HO-1 (Chauveau et al., 2005).

Afin de savoir si HO-1 joue également un rôle dans la fonction d'inhibition d'une prolifération allogénique décrite dans le paragraphe précédent, nous avons traité les iBMDC avec un inhibiteur de l'activité HO-1. Cette expérience montre que l'ajout d'un inhibiteur de l'activité HO-1 (SnPP) lève l'activité inhibitrice de prolifération des LT médiée des iBMDC. (Article II- Figure 2). Dans cette expérience, les iBMDC sont incubées avec le SnPP puis lavées avant d'être mises en contact avec les PBMC. Il est important de ne pas ajouter directement le SnPP dans le milieu de culture car dans ces conditions, il serait difficile de savoir si l'inhibiteur d'HO-1 agit via les CD ou directement sur les PBMC allogéniques. En traitant les iBMDC avant la culture, nous savons que l'inhibiteur de l'activité HO-1 modifie la fonction des iBMDC. Cependant, le mécanisme précis par lequel l'expression d'HO-1 par les iBMDC permet d'inhiber la prolifération des PBMC est inconnue, deux hypothèses sont proposées : **i)** les iBMDC bloquent la prolifération des LT ou **ii)** les iBMDC bloquent l'activité stimulatrice des CPA présents dans la culture. A l'inverse, l'inhibition de l'expression d'autres molécules par les iBMDC tels que le TGF β , l'IL-10, IDO ou encore iNOS n'a pas ou peu d'effet sur l'activité inhibitrice de prolifération des iBMDC chez le macaque. Des résultats similaires en présence d'inhibiteur de l'activité d'HO-1, de TGF β ou d'IDO ont été obtenus à partir d'iBMDC de rat (Article II- Figure 2). Contrairement aux cellules de macaque, l'inhibition de la prolifération des LT médiée par les iBMDC de rat est bloquée en présence d'inhibiteur d'iNOS. L'implication de cette protéine dans l'activité des iBMDC de rat a déjà été mise en évidence antérieurement à l'unité INSERM U643 (Pêche et al., 2005).

Pour aller plus loin dans l'étude du rôle d'HO-1 sur les iBMDC, nous avons utilisé l'inhibiteur d'HO-1 dans le modèle de transplantation cardiaque chez le rat développé à l'unité INSERM U643. Dans ce modèle, l'injection d'iBMDC syngéniques la veille de la transplantation cardiaque permet la prolongation de la survie du greffon (modèle décrit dans l'introduction générale). De façon intéressante, nous montrons dans l'article II (Figure 2) que l'injection d'un inhibiteur de l'activité HO-1 à ces souris (SnPP) empêche la prolongation de la survie du greffon médiée par les iBMDC. L'injection de SnPP sans iBMDC n'entraîne pas un rejet plus précoce du greffon, suggérant que le snPP bloque la production d'HO-1 par les iBMDC et ainsi inhibe leur activité *in vivo*. **De façon claire dans cette étude, HO-1 semble impliqué dans la prolongation de la survie de greffe induite par les iBMDC *in vivo*.**

Il aurait pu être intéressant de comparer l'expérimentation décrite ci-dessus avec une injection d'iBMDC traitées avec le SnPP sans réaliser d'injections de SnPP. Comme pour les tests *in*

vitro, ceci nous aurait permis de s'assurer que le snPP agit bien directement sur les CD. Cependant, nous ignorons le temps d'activité du snPP et il est tout à fait probable qu'au bout de trois jours, le SnPP ne soit plus capable de bloquer l'activité HO-1 des iBMDC. Pour cette raison, nous avons préféré injecter tous les 4 jours du SnPP à l'animal pour s'assurer que l'inhibiteur de l'activité HO-1 était toujours actif.

IV.A.3. Difficultés rencontrées lors de la génération des CD simiennes

i) Utilisation du Flt3 ligand pour augmenter le nombre de CD

Dans l'étude d'Ashton-Chess et al. menée à l'unité INSERM U643, la différenciation des CD chez le babouin est réalisée en présence de Flt3 ligand (FMS like tyrosine kinase 3 ligand) (Ashton-Chess and Blanco, 2005). L'utilisation de cette protéine était fondée sur les études montrant que l'injection de Flt3 ligand *in vivo* permettait d'accroître la quantité de CD notamment chez le singe (Coates et al., 2003; Morelli et al., 2007; Teleshova et al., 2004). De même, l'ajout de Flt3 ligand dans la culture de précurseurs CD34⁺ (isolés à partir du sang périphérique) chez l'homme permettrait d'augmenter le nombre de CD générées *ex vivo* (Min et al., 1998). Dans notre modèle, nous avons testé cette protéine mais nous n'avons pas observé d'augmentation du nombre de CD générées lors d'ajout de Flt3 ligand dans le milieu de culture.

ii) Caractérisation des CD

Dans ce manuscrit, nous parlons de CD mais en réalité, il s'agit plutôt d'une population de cellules hétérogènes contenant des CD et ayant une activité de CD tolérogènes. Il est difficile de caractériser de façon claire les CD car il n'y a pas à notre connaissance de marqueur spécifique des CD.

IV.B- Amplification de Treg à l'aide de CD

IV.B.1. Isolement des Treg

Des études menées chez l'homme ont montré qu'il est possible de dissocier les Treg CD4⁺CD25⁺ des LT effecteurs activés CD4⁺CD25⁺ présents dans le sang périphérique en utilisant le marqueur CD127 (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006). Les Treg sont ainsi des LT CD4⁺CD25⁺CD127^{-low}. Une étude menée récemment par Hartigan O'Connor et ses collaborateurs a montré que la sélection des LT CD4⁺CD25⁺CD127⁻ chez le macaque permettait également de sélectionner les Treg en excluant les LT activés (Hartigan-O'Connor

et al., 2007). Nous confirmons ces résultats dans notre étude. Les Treg $CD4^+CD25^+CD127^-$ fraîchement isolés représentent environ 0,4% des PBMC totaux. Ces Treg purifiés expriment Foxp3 et sont suppressifs alors que les LT $CD4^+CD25^-$ n'expriment pas Foxp3 et n'ont pas d'activité suppressive. Cette caractérisation suggère que les Treg de macaque sont très similaires aux Treg humains.

Pour réaliser la sélection des Treg chez le macaque, nous avons trié les cellules à l'aide des 3 anticorps (CD4, CD25 et CD127) par cytométrie de flux. Il existe également des billes magnétiques pour réaliser ces tris. Cependant, elles sélectionnent uniquement les cellules $CD4^+CD25^+$ sans prendre en compte le marqueur CD127. De plus, par cytométrie de flux, la pureté est supérieure à 98 %.

IV.B.2. Expansion de Treg à l'aide de CD et d'IL-2

L'étude de Gansuud et al. a mis en évidence la possibilité d'expandre des Treg chez le macaque à l'aide de billes anti-CD3, anti-CD28 (Gansuud et al., 2007). Dans cette étude, nous avons amplifié les Treg à l'aide de CD. L'intérêt majeur des CD par rapport aux billes anti-CD3/anti-CD28 est d'apporter une spécificité d'antigène aux Treg. De façon générale, l'amplification polyclonale permet d'obtenir un nombre plus important de Treg. Ainsi, Gansuud et al. ont amplifié jusqu'à 2000 fois les Treg sur un mois avec une amplification entre 7 à 25 fois la première semaine. Dans notre étude, nous avons réalisé une seule semaine d'amplification et nous observons une amplification des Treg d'environ 25 fois à l'aide de CD dérivées de la moelle osseuse. Il est difficile de savoir si la prolongation de la culture de Treg à l'aide de CD aurait permis d'obtenir une amplification aussi forte que l'expansion polyclonale. Cependant selon l'étude de Jiang et al. chez l'homme, il est possible d'amplifier de façon polyclonale des Treg rendus spécifiques d'antigène après une première expansion à l'aide de CD (apportant la spécificité d'antigène) (Jiang et al., 2006b)

L'IL-2 semble jouer un rôle primordial dans l'expansion des Treg. Il existe cependant quelques études indiquant que l'expansion des Treg pourrait se faire sans IL-2 (Brinster and Shevach, 2005; Ouabed et al., 2008). Dans notre étude, nous avons confirmé la nécessité de l'IL-2 dans l'expansion des Treg. Ainsi, l'expansion des Treg n'est possible en présence de CD qu'avec de l'IL-2 et la présence d'IL-2 mais en absence de CD ne permet pas non plus d'expandre les Treg. Il faut donc la présence des 2 partenaires pour expandre les Treg.

Le niveau d'expression de Foxp3 est plus important dans les Treg amplifiés (MFI de 50 à

114) que dans les Treg « fraîchement » isolés (MFI de 30). Ceci a été montré chez l'homme et peut s'expliquer par la présence de l'IL-2. Cette cytokine aurait la capacité d'augmenter l'expression de Foxp3 en favorisant la fixation des facteurs de transcription STAT3 et STAT5 sur le site de fixation des STAT présents dans le gène de Foxp3 (Zorn et al., 2006).

Les travaux de Turnquist et al. ont montré que l'expansion des Treg à l'aide de CD chez la souris était plus efficace que l'expansion des LT non régulateurs (Turnquist et al., 2007). Nous aboutissons à la même conclusion dans notre étude (Figure 2-Article III). Cependant contrairement aux Treg, l'expansion des LT CD4⁺CD25⁻ peut être réalisée sans IL-2 reflétant la capacité des CD à stimuler la prolifération de LT allogéniques.

IV.B.3. Efficacité de l'expansion des Treg selon l'origine des CD

Comme évoqué précédemment, l'origine des CD ainsi que leur état de maturation modifient leur capacité à expandre les Treg. Ainsi, les CD issues de la moelle osseuse entraîneraient une meilleure expansion des Treg que les autres CPA (LB, macrophages et CD spléniques ou ganglionnaires) (Brinster and Shevach, 2005; Yamazaki et al., 2003; Yamazaki et al., 2006). En ce qui concerne l'état de maturation, les résultats des différentes études divergent, certains affirmant la supériorité des CD matures pour expandre les Treg, et d'autres celle des CD immatures (Banerjee et al., 2006; Brinster and Shevach, 2005; Hill et al., 2007 ; Jiang et al., 2003; Matsumura et al., 2007; Turnquist et al., 2007).

Dans l'Article III, nous montrons de façon claire que les CD issues de la moelle osseuse sont plus efficaces (2 fois plus efficaces) pour expandre les Treg que les CD issues du sang périphérique. La comparaison des CD issues de la moelle osseuse avec ou sans tri du précurseur CD34⁺ ne met pas en évidence de différence dans le phénotype et la fonction d'expansion de Treg de ces deux populations. En ce qui concerne l'état de maturation des CD, nos résultats indiquent que les CD dérivées des monocytes sont plus matures que les BMDC suggérant que des CD matures sont moins efficaces pour expandre les Treg. A l'inverse, ceci n'est pas montré dans l'article mais les iBMDC, décrites dans l'article II et dont le phénotype est le plus immature de toutes les CD générées au cours de cette thèse ne permettent pas d'expandre les Treg. Nos résultats montrent que ce sont les CD issues de la moelle osseuse ayant un état de maturation qualifiée de « semi-mature » qui entraînent la meilleure amplification des Treg. De plus, l'expression de Foxp3 et l'activité inhibitrice des Treg amplifiés sont plus fortes dans les CD dérivées de la moelle osseuse que dans les CD dérivées

du sang. Ces résultats montrent que le type de CD utilisé est un élément clé pour l'expansion et la fonction des Treg.

IV.B.4. Génération de Treg *de novo*

Les résultats de l'article III montrent que les LT CD4⁺CD25⁻ amplifiés acquièrent l'expression du CD25 et de Foxp3. Cependant, ces cellules ne sont pas suppressives. Ces résultats ont déjà été documentés chez l'homme par Gavin et al. (Gavin et al., 2006). A l'inverse, chez la souris, les LT CD4⁺CD25⁻ amplifiés expriment le marqueur CD25 mais non le marqueur Foxp3. Il est cependant possible chez la souris d'induire des Treg à partir de LT naïfs (Curotto de Lafaille et al., 2004; Wang et al., 2006).

Dans cette optique, il est envisageable qu'une petite population de Treg soit induite chez le macaque suite à l'expansion des LT CD4⁺CD25⁻. Cependant, l'activité suppressive de prolifération de cette petite population de Treg pourrait être masquée par l'activité stimulatrice des LT activés. Pour répondre à cette question, nous avons isolé par cytométrie de flux les LT CD4⁺CD25^{high} et les LT CD4⁺CD25^{low}. Dans cette expérience, nous ne pouvons pas purifier les Treg à l'aide du CD127 comme cela a été réalisé sur les cellules « fraîches ». En effet, le CD127 est régulé négativement en présence d'IL-2 (Xue et al., 2002) et l'expansion des CD4⁺CD25⁻ a été réalisée en présence d'IL-2 pour se placer dans les mêmes conditions que l'expansion des Treg. Suite à la purification des CD25^{low} et des CD25^{high}, nous avons étudié l'expression de Foxp3 et l'activité suppressive de ces cellules. L'expression de Foxp3 est plus forte dans les CD25^{high} que dans les CD25^{low}, cependant dans les conditions testées, nous n'avons pas observé de différences dans l'activité suppressive de ces 2 populations.

IV.B.5. Spécificité de l'antigène

L'intérêt d'utiliser des CD pour expandre les Treg est d'induire des Treg spécifiques d'antigène. Dans l'article III, nous n'avons pas mis en évidence de différence d'activité suppressive des Treg sur une prolifération de PBMC d'un animal 1, que les Treg soient amplifiés/spécifiques ou non de cet animal (expansion des Treg d'un animal 2 avec les CD de l'animal 1 ou d'un autre animal). Ces résultats peuvent s'interpréter de deux façons : **i)** les Treg générés ne sont pas spécifiques d'antigène ou **ii)** le modèle utilisé ne permet pas de voir une suppression spécifique d'antigène. En effet, il est connu que la mise en évidence de spécificité d'antigène *in vitro* est souvent difficile (Tang et al., 2004).

De plus, nous nous plaçons dans un contexte de spécificité du donneur et non de spécificité d'un antigène précis. Comme décrit dans le paragraphe IV.C.3 de l'introduction générale, les Treg spécifiques d'un antigène précis utilisés dans des modèles de maladies auto-immunes (comme le diabète) sont capables d'induire une tolérance alors que les Treg spécifiques du donneur utilisés dans des modèles de transplantation permettent de prolonger la survie du greffon mais non d'induire une tolérance (Golshayan et al., 2007; Joffre et al., 2008; Pu et al., 2007; Tang et al., 2004).

Pour tester la capacité des CD à induire des Treg spécifiques d'un antigène, il aurait été intéressant d'utiliser un modèle de primate similaire au modèle de souris transgéniques HA contenant des LT spécifiques d'un peptide comme dans l'étude de Marodon décrite précédemment (Marodon and Klatzmann, 2004). Nous aurions alors pu observer si l'injection de Treg spécifiques de HA (amplifiées avec des CD autologues présentant HA) permettait de diminuer la quantité de LT HA circulants. Nous ne possédons malheureusement pas un tel modèle chez le primate.

IV.C- Application des CD dans notre modèle de transfert de gènes

IV.C.1. Choix des iBMDC10

Le problème majeur des injections de CD immatures *in vivo* est le risque que ces CD murent une fois injectées à l'animal. Les CD immatures tolérogènes deviendraient alors des CD matures immunogènes (Barratt-Boyes et al., 2000) capables d'entraîner une réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène au lieu d'une tolérance. Il existe des molécules comme la rapamycine ou la déoxysperguanine qui permettent d'empêcher la maturation des CD et la sécrétion d'IL-12. Il est alors nécessaire d'injecter régulièrement ces immunosuppresseurs. Dans le cadre de ce projet, nous avons souhaité développer un système permettant de contrôler la réponse immune mais sans les effets secondaires des immunosuppresseurs. Une alternative est de générer des iBMDC produisant de l'IL-10, ces cellules ont ainsi la capacité de se protéger contre la maturation et de sécréter de l'IL-10 qui permet d'augmenter leur activité tolérogène notamment chez le macaque (Zahorchak et al., 2007). Ces cellules sont également très efficaces pour produire des LT régulateurs inductibles, les Tr1 (Roncarolo et al., 2006). Afin d'obtenir des CD tolérogènes efficaces et résistantes à la maturation, nous avons décidé d'utiliser des iBMDC produisant de l'IL-10, appelées iBMDC10. Ces cellules ont été générées de la même façon que les iBMDC en ajoutant de la protéine IL-10 recombinante humaine lors du changement de milieu. Les iBMDC10 obtenues ont été

comparées aux iBMDC. Les iBMDC10 semblent une population plus homogène que les iBMDC et qui expriment plus faiblement les molécules de costimulation, CD86 (Figure 21A). D'un point de vue fonctionnel, les iBMDC10 ont une faible capacité à stimuler une prolifération des LT (Figure 21B) et sont résistantes à la maturation. Cette résistance à la maturation peut s'expliquer par leur synthèse d'IL-10 (Figure 22 et 24). **Ces cellules possèdent donc des caractéristiques tolérogènes supérieures aux autres CD générées lors de cette thèse et décrites précédemment, c'est pourquoi nous les avons choisi pour l'expérimentation *in vivo* chez le macaque.**

IV.C.2. Présentation de l'antigène

Afin de présenter le rtTA à la surface des CD, deux solutions sont envisageables. La première consiste à placer le peptide ou la protéine d'intérêt (dans notre cas, le rtTA) en contact avec les CD et d'utiliser les propriétés des CD de capture, d'apprêtement et de présentation de l'antigène associée au CMH de classe II. La deuxième solution consiste à transduire les CD en utilisant des vecteurs viraux contenant le gène codant pour la protéine d'intérêt. L'avantage des vecteurs viraux est que nous pouvons insérer dans ces vecteurs une cassette d'expression contenant à la fois le gène d'intérêt et un gène rapporteur comme la GFP. Dans ce cas, l'efficacité de transduction est facilement quantifiable par cytométrie de flux et il est possible de trier les cellules transduites permettant ainsi d'obtenir une population pure de CD exprimant la protéine d'intérêt.

i) Utilisation de vecteurs viraux

Nous avons essayé de transduire les CD avec différents virus. Comme évoqué dans le paragraphe II.A.6 de l'introduction générale, la faible efficacité des AAVr pour transduire les CD *ex vivo* est remise en question ces dernières années par l'utilisation de divers sérotypes et de vecteurs scAAVr. Ainsi, Xin et al. ont montré que l'AAV5r avait un fort tropisme pour les CD murines et humaines *ex vivo*. La transduction des CD chez la souris à l'aide d'AAV5r montre une transduction supérieure à 90% des cellules (Xin et al., 2006). De plus, Veron et ses collaborateurs ont comparé l'efficacité de vecteurs AAVr de type ss et sc pour transduire des CD humaines de différents types *in vitro* (MoDC, BMDC, pDC, cellules de Langerhans). Leurs résultats ont montré une efficacité supérieure des scAAVr pour transduire les CD. Dans cette étude, les sérotypes AAV1r et AAV2r ont été utilisés, ces 2 sérotypes semblent avoir une efficacité similaire. De plus, les auteurs précisent que la transduction des CD par les

vecteurs scAAVr n'entraînent pas de maturation des CD contrairement à l'utilisation de vecteurs ssAAVr (Veron et al., 2007). En ce qui concerne les vecteurs adénoviraux, ceux-ci sont connus pour transduire efficacement les CD, notamment *in vivo*, menant ainsi au développement d'une réponse immunitaire suite à l'injection de vecteurs adénoviraux (Jooss et al., 1998; Zaiss et al., 2002). La forte transduction des CD par les vecteurs adénoviraux s'accompagne de la maturation de ces cellules (Rea et al., 1999; Tan et al., 2005). Dans notre étude, nous souhaitons conserver des CD sous forme immature, l'utilisation de vecteurs adénoviraux semble donc peu recommandée. Les vecteurs lentiviraux sont moins efficaces que les vecteurs adénoviraux mais ils sont utilisés *ex vivo* pour infecter les CD car ils induisent peu ou pas de maturation des CD lorsqu'ils sont utilisés à un faible taux d'infection (MOI pour multiplicity of infection) (Breckpot et al., 2007).

Comme nous possédons les différents types de vecteurs au laboratoire, nous les avons testé et nous avons évalué leur capacité à transduire les CD. L'étude de Veron et al. ayant montré la supériorité des scAAVr pour transduire les CD, nous avons testé uniquement les scAAVr (et non les ssAAVr) pour transduire nos CD. Dans notre test, les deux sérotypes d'AAVr les plus efficaces pour transduire les CD sont les scAAV2r et scAAV5r, ces résultats sont en accord avec les travaux de Xin, cependant, nous obtenons une efficacité de transduction beaucoup plus faible (moins de 15%). De plus, contrairement aux résultats décrits par Veron, cette transduction s'accompagne d'une maturation (augmentation de l'expression de CD86) des cellules, comparable à celle obtenue avec l'Adéno-rtTA. Les vecteurs lentiviraux LV-GFP transduisent les CD de façon un peu plus importante (30%) mais induisent également leur maturation. De plus, l'inconvénient de cette technique est que la transduction d'une CD ne signifie pas que le peptide soit présenté à la surface de la cellule. Dans le cas d'une présentation du peptide à la surface des CD transduites, ce peptide est alors présenté sur le CMH de classe I pouvant ainsi entraîner l'activation de LT CD8⁺ régulateurs. **L'obtention d'un faible taux de transduction des CPA par les vecteurs viraux et d'une maturation des CD ne nous ont pas satisfaits, nous n'avons donc pas utilisé cette technique pour présenter le rtTA à la surface des CD.**

ii) Incubation du peptide avec les CD

Nous avons testé en parallèle les propriétés naturelles des CD à réaliser la capture et la présentation d'un peptide étranger sur le CMH. Comme indiqué sur la figure 23A, la présence du rtTA est détectée dans toutes les cellules de la culture. Cette technique d'incubation de

peptide est donc très efficace pour exprimer le peptide dans les iBMDC10. Cependant, comme pour l'utilisation des vecteurs viraux, l'expression du peptide ne signifie pas que celui-ci est présenté sur les molécules du CMH de classe II. La présentation du peptide à la surface des CD associée au CMH a été testée sur un animal immunisé avec le rtTA. Nos résultats (Figure 23B) indiquent que les iBMDC autologues incubées avec le rtTA sont capables d'entraîner la prolifération des LT de cet animal (LT effecteurs spécifiques du rtTA), ce qui n'est pas le cas à la suite d'une incubation des CD avec l'OVA. L'incubation des iBMDC avec le peptide rtTA permet donc de présenter ce peptide associé au CMH de classe II à la surface de la CD. Ces résultats ont été obtenus avec les iBMDC, cependant, il n'est plus possible d'utiliser l'animal immunisé pour des ponctions de moelle, nous n'avons donc pas pu vérifier l'efficacité fonctionnelle des iBMDC10 incubées avec le rtTA. L'immunisation d'un nouvel animal nécessite plus de protéines rtTA que ce que nous possédons au laboratoire et il est difficile de nous en procurer un nouveau lot. Nous savons cependant que le rtTA est fortement exprimé dans les iBMDC10 (Figure 23A)

iii) Maturation des CD suite à l'incubation avec le rtTA

Comme décrit précédemment, les iBMDC10 ont été choisis notamment car leur capacité de résistance à la maturation est supérieure à celle des iBMDC (Figure 24). En présence de rtTA, nous observons une augmentation de l'expression du marqueur de maturation CD86 dans les iBMDC alors que nous n'observons pas de différence pour les iBMDC10. De plus, la stimulation avec le rtTA s'accompagne d'une augmentation de la synthèse d'IL-10 dans les iBMDC10 **suggérant qu'en cas de stress, les iBMDC10 produisant de l'IL-10 permettant ainsi de conserver leur phénotype immature et leur fonction tolérogène.** Dans ces expériences, nous avons également constaté que l'incubation des iBMDC sur la nuit avec le rtTA et de l'IL-10 permettait d'éviter la maturation des CD. Le phénotype des iBMDC10 incubées avec le rtTA et l'IL-10 est le plus immature. C'est donc ce protocole que nous avons choisi dans l'optique d'injecter des CD les plus immatures possibles à nos animaux.

IV.C.3. Mode d'injection des CD

Une fois que nous avons identifié le type de CD à injecter à nos primates, nous nous sommes demandés quelle était la voie la plus favorable pour apporter les CD au ganglion drainant le muscle injecté (principalement le ganglion poplité mais peut être également le ganglion inguinal). Dans les modèles de tolérance réalisés chez les rongeurs, les CD sont généralement

injectées en intraveineuse mais dans notre cas, le transfert de gènes est réalisé dans le muscle et nous voulions focaliser l'apport des CD au niveau des ganglions drainant le muscle injecté et non dans le système immunitaire entier. Différentes voies sont possibles pour apporter les CD dans le ganglion drainant. L'injection intranodale dans le ganglion poplité semble difficilement réalisable car ce ganglion est très petit, une chirurgie serait nécessaire pour le localiser précisément. La réalisation d'une chirurgie aurait alors tendance à entraîner une immunogénicité de nos cellules plutôt qu'un effet tolérogène. Cette voie a donc également été éliminée. Dans la littérature, les voies d'injection sous-cutanée (SC) et intra dermique (ID) ont été mises en évidence comme permettant d'apporter de façon efficace des CD dans le ganglion. Ainsi, dans l'étude de Morse et al. réalisée chez des patients, les auteurs ont suivi des CD marquées radioactivement et injectées soit par voie veineuse (100 millions de CD), soit par voie sous-cutanée (4 millions de CD), soit par voie intradermique (4 millions de CD). Les injections SC et ID ont été réalisées au niveau de zones ganglionnaires. Leurs résultats montrent la présence d'un signal dans les ganglions uniquement suite à l'injection de CD par voie intradermique. L'absence totale de signal par voie SC et IV peut s'expliquer par un faible seuil de détection de la technique. Ces résultats indiquent que l'administration de CD par voie intradermique est la plus efficace pour apporter des CD au ganglion (Morse et al., 1999). Deux autres études réalisées chez le singe (chimpanzé et macaque) montrent la migration des CD dans les ganglions lymphatiques suite à l'injection des CD soit par voie sous-cutanée, soit par voie intra-dermique (Barratt-Boyes et al., 1997; Barratt-Boyes et al., 2000). Suite à ces différentes études, nous avons également comparé les 2 voies d'injections (SC et ID) des CD chez le macaque. Nos résultats montrent (figure 25) que la voie intradermique est la plus propice à la migration des CD dans le ganglion lymphatique. Ces résultats confirment les résultats obtenus chez l'homme par Morse et al. (Morse et al., 1999).

Dans l'étude réalisée chez le macaque par Barratt-boyes et al., les auteurs montrent que la migration des CD dans le ganglion suite à une administration intradermique est indépendante de l'état de maturation des CD, c'est-à-dire que le même nombre de CD est retrouvé dans le ganglion suite à l'injection de CD immatures ou matures. Cependant, dans le cas d'injection de CD immatures, la migration des CD dans le ganglion entraîne la maturation des CD (Barratt-Boyes et al., 2000). **Ces résultats confirment la nécessité d'injecter des cellules immatures et résistantes à la maturation, comme les iBMDC10.** En effet, la voie intradermique est connue pour être immunogène (utilisation pour les vaccins).

IV.C.4. Suivi des animaux

Les trois premiers animaux injectés avec des iBMDC10 stimulés avec le rtTA en présence d'IL-10 ont permis de mettre en évidence l'absence de développement d'une réponse à médiation cellulaire contre le rtTA chez ces individus. Seule l'expression transitoire d'anticorps anti-rtTA a été observée dans un des animaux injectés (Figure 26).

A la suite de cette étude pilote, nous avons établi le protocole d'expérimentation visant à induire une tolérance au transgène rtTA à l'aide d'iBMDC10 stimulés par la combinaison rtTA/IL-10 dans le modèle de transfert de gènes dans le muscle de primate décrit dans la partie « Contexte et objectifs de la thèse ».

Le calendrier d'expérimentation est le suivant :

- ✓ **J-1** : injection d'iBMDC10 rtTA/IL-10 autologues en ID au niveau des ganglions inguinaux et poplités de la jambe droite de 2 macaques (ganglions drainant le muscle injecté)
- ✓ **J0** : injection intramusculaire d'AAV1r-rtTA-EPO en 4 ou 5 points dans le muscle tibial cranial de la jambe droite des 2 primates
- ✓ **J60** : injection d'iBMDC10 rtTA/IL-10 en ID au niveau des ganglions drainants. Première induction du système rtTA par administration de doxycycline aux animaux
- ✓ **J90** : même protocole qu'à J60
- ✓ **J120 puis tous les mois** : Induction du système rtTA par administration de doxycycline, sans injection d'iBMDC10 rtTA.

Le suivi des animaux se fera principalement en mesurant l'hématocrite, la quantité de réticulocytes et par dosage ELISA EPO à la suite des inductions du système Tet-ON par la doxycycline. Ces techniques décrites dans la partie « Contexte et objectifs de l'étude », permettent de tester l'efficacité du transfert de gènes. L'absence de développement d'une réponse immunitaire sera vérifiée par la recherche d'anticorps anti-rtTA dans le sérum des animaux et la réalisation de tests *in vitro* de prolifération des PBMC décrits ci-dessus.

Nous sommes actuellement avant la première induction, les animaux n'ont pas développé de réponse immunitaire contre le rtTA pour l'instant.

Suivant les résultats obtenus, deux autres animaux entreront ou non dans le protocole. Si les animaux développent une réponse immunitaire contre le rtTA dans les 3 premiers mois suivant l'injection d'AAVr, il est alors fort probable que le développement de la réponse

immunitaire soit lié aux CD injectées. Deux possibilités sont envisagées pour réduire l'immunogénicité des CD : *i)* en modifiant les CD en présence de drogues, telle que la rapamycine qui permet de bloquer la maturation des CD tout en conservant l'induction possible de LT régulateurs ; *ii)* en apportant les CD par une voie moins immunogène que l'injection ID, la perfusion de membre semble une technique particulièrement efficace pour apporter un transgène dans le muscle (comme évoqué dans l'introduction générale) sans induire une immunogénicité. Nous pourrions alors tester si cette voie permet également d'apporter des CD dans les ganglions drainants du muscle.

Conclusion générale et perspectives

Cette thèse apporte de nouveaux éléments dans la mise au point de l'induction d'une tolérance qu'elle soit centrale ou périphérique et dans la compréhension des mécanismes intervenant dans cette tolérance.

En ce qui concerne l'induction de la tolérance centrale, nous avons montré que l'injection de vecteurs AAVr en intra-thymique permet de transduire efficacement le thymus de souris et également le thymus de primate (ce qui n'est pas le cas des vecteurs lentiviraux). De plus, des études réalisées sur les AAVr ont montré la capacité de ces vecteurs à générer des Treg suite à l'injection de ce vecteur en périphérie (Cao et al., 2007a; Dobrzynski et al., 2006). Ils apparaissent donc comme des vecteurs de choix pour induire une tolérance. Cependant, dans notre étude, la fuite du vecteur en périphérie a entraîné le développement d'une réponse immune contre le produit du transgène chez les animaux injectés. Nous ignorons si en absence de fuite du vecteur en périphérie, la transduction des CPA du thymus aurait permis l'induction d'une tolérance contre le produit du transgène.

Pour éviter cette réponse immune, il est envisageable d'utiliser des promoteurs spécifiques de certains tissus ou certaines cellules mais dans la plupart des cas, même en présence de ces promoteurs spécifiques, les AAVr transduisent d'autres organes (Adjali et al., 2005a; Chenuaud et al., 2004). Une solution peut-être plus efficace serait d'administrer un court traitement immunosuppresseur aux animaux (7 jours) lors de l'injection des AAVr. Ainsi, l'efficacité du cotraitement immunosuppresseur rapamycine et MMF chez le primate a permis d'induire une tolérance au produit du transgène, associée à la génération de Treg dans un modèle de transfert de gène hépatique (Mingozzi et al., 2007a).

En ce qui concerne la tolérance périphérique, lors de cette thèse, nous avons mis au point des protocoles de génération de CD possédant des caractéristiques tolérogènes chez le macaque. Nous avons ainsi montré que les CD immatures générées à partir de la moelle osseuse possédaient des propriétés de CD tolérogènes. De plus, nous avons mis en évidence le rôle d'HO-1 dans l'activité tolérogène de CD aussi bien *in vitro* (chez le macaque et le rat) qu'*in vivo* (expérience réalisée chez le rat). Nous avons également montré la supériorité des CD semi-matures issues de la moelle osseuse dans l'expansion des Treg. De plus, chez le macaque, nous avons développé récemment la génération de CD tolérogènes en présence d'IL-10. Un protocole d'induction de tolérance périphérique par injection de ces CD sécrétant de l'IL-10 (appelées iBMDC10) dans le modèle de transfert de gènes développé au laboratoire

est actuellement en cours. Nous avons choisi d'injecter des CD sécrétant de l'IL-10 car ces cellules sont connues pour générer efficacement des cellules régulatrices Tr1 (Roncarolo et al., 2006). De plus, nous sommes en contact avec le laboratoire de Maria-Gracia Roncarolo dans lequel des cellules Tr1 sont générées à partir de CD sécrétant de l'IL-10 pour une application chez l'homme. Les caractéristiques de nos iBMDC10 sont très similaires aux leurs.

Dans le protocole d'injection des iBMDC10 chez le primate, la question clé a été de savoir quel sera le comportement de ces cellules suite à leur injection *in vivo*. Le premier risque est que les CD murent et deviennent immunogènes suite à leur injection (Barratt-Boyes et al., 2000). C'est pourquoi, nous avons choisi des CD ayant un phénotype très immature, résistantes à la maturation et capables de produire de l'IL-10 suite à une stimulation. Le deuxième risque est que les cellules ne murent pas mais que le peptide antigénique qu'elles présentent soit présenté de façon croisée par des CD immunogènes présentes *in vivo*. Dans ce cas, la question est de savoir quelles CD, entre les iBMDC10 tolérogènes injectées et les CD immunogènes présentes sur le site de l'injection, seront les plus efficaces. Il est souhaitable qu'une génération rapide de LT régulateurs par les iBMDC10 permette une induction de tolérance.

Dans la situation indésirable où l'injection des iBMDC10 entraîne leur maturation, il est alors possible d'administrer un court traitement (10 jours) à la rapamycine chez les macaques lors de l'injection des CD. Ce traitement permettrait de conserver les CD injectées sous forme immature sans empêcher la génération de LT régulateurs (Hackstein et al., 2003).

Une autre solution serait de modifier le mode d'administration des iBMDC10. Actuellement, ces cellules sont injectées en intra-dermique car parmi les voies d'administration testées, cette voie permet d'apporter de façon efficace les CD au ganglion drainant le muscle. Cependant, cette voie d'administration est connue pour être immunogène et est notamment utilisée dans les protocoles de vaccination. Les injections de CD chez le rongeur dans les modèles de prolongation de survie du greffon sont réalisées par voie intra-veineuse (IV) (Pêche et al., 2005). Nous n'avons pas choisi la voie IV car nous injectons les AAVr dans le muscle et nous souhaitons que les iBMDC10 et les LT interagissent au niveau du site de présentation du rTA au système immunitaire, c'est-à-dire dans le ganglion drainant le muscle injecté. Un autre mode d'administration des CD, peut être moins immunogène que l'injection intra-dermique, serait d'injecter les CD par voie IV mais dans un contexte de perfusion de membre isolé. Cette technique décrite récemment chez le chien et le primate non humain dans des modèles

de transfert de gènes dans le muscle a été développé pour permettre de transduire efficacement l'ensemble des muscles de la patte (Arruda et al., 2005; Rodino-Klapac et al., 2007). Cette technique permettrait d'apporter des iBMDC10 en IV mais de façon ciblée dans le muscle.

Une autre possibilité pour induire une tolérance est d'injecter non pas des CD tolérogènes mais des LT régulateurs. Dans cette optique, il faudrait alors réaliser des expansions de Treg sur plusieurs semaines et non sur une semaine comme nous l'avons fait dans ce travail afin d'obtenir des quantités importantes de Treg. De plus, la spécificité d'antigène de ces Treg devra être mise au point. Les iBMDC10 utilisées dans le protocole d'induction de tolérance pourraient également permettre de générer des Tr1 *ex vivo*.

Si le protocole d'induction de tolérance à l'aide des iBMDC10 est efficace pour contrer le développement d'une réponse immunitaire suite au transfert de gènes dans le muscle, nous pourrions alors appliquer cette technique à d'autres produits du transgène dans le muscle, mais également au transfert de gènes dans d'autres organes et dans des modèles de transplantation chez le singe. Un modèle de transplantation rénale chez le macaque a notamment été mis au point récemment à l'unité INSERM U643.

En conclusion, cette thèse a permis la mise au point d'outils indispensables à l'étude de l'induction d'une tolérance chez le macaque, que ce soit au niveau central, par l'utilisation de vecteurs viraux transduisant le thymus de singe qu'au niveau périphérique par le développement de CD tolérogènes et de Treg. Les résultats du protocole d'induction de tolérance à l'aide des iBMDC10 seront déterminants pour la suite de ce projet.

Nos résultats montrent la nécessité de travailler sur des modèles pré-cliniques. Il existe en effet de nombreuses études sur la réponse anti-virale et sur l'induction de tolérance chez les rongeurs, mais peu d'études ont été réalisées dans des modèles pré-humains. Or, la comparaison des résultats obtenus chez les rongeurs et chez le primate divergent souvent. Dans cette thèse, nous confirmons ces divergences aussi bien par le développement d'une réponse immune contre le produit du transgène après injection intra-thymique ou intra-musculaire de vecteurs chez le macaque (non visible chez la souris), que par l'efficacité de transduction et le tropisme différents des vecteurs selon les espèces. Un investissement important de la recherche dans les modèles pré-cliniques apparaît donc aujourd'hui indispensable pour appliquer chez l'homme des modèles de transfert de gènes ou d'induction de tolérance développés chez les rongeurs.

Références bibliographiques

Adjali, O., Marodon, G., Steinberg, M., Mongellaz, C., Thomas-Vaslin, V., Jacquet, C., Taylor, N. and Klatzmann, D. (2005a). In vivo correction of ZAP-70 immunodeficiency by intrathymic gene transfer. *J Clin Invest* **115**, 2287-95.

Adjali, O., Vicente, R. R., Ferrand, C., Jacquet, C., Mongellaz, C., Tiberghien, P., Chebli, K., Zimmermann, V. S. and Taylor, N. (2005b). Intrathymic administration of hematopoietic progenitor cells enhances T cell reconstitution in ZAP-70 severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13586-91.

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.

Alexander, I. E., Russell, D. W. and Miller, A. D. (1994). DNA-damaging agents greatly increase the transduction of nondividing cells by adeno-associated virus vectors. *J Virol* **68**, 8282-7.

Alexander, I. E., Russell, D. W., Spence, A. M. and Miller, A. D. (1996). Effects of gamma irradiation on the transduction of dividing and nondividing cells in brain and muscle of rats by adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther* **7**, 841-50.

Aljamali, M. N., Margaritis, P., Schlachterman, A., Tai, S. J., Roy, E., Bunte, R., Camire, R. M. and High, K. A. (2008). Long-term expression of murine activated factor VII is safe, but elevated levels cause premature mortality. *J Clin Invest* **8**, 8.

Al-Khatti, A., Veith, R. W., Papayannopoulou, T., Fritsch, E. F., Goldwasser, E. and Stamatoyannopoulos, G. (1987). Stimulation of fetal hemoglobin synthesis by erythropoietin in baboons. *N Engl J Med* **317**, 415-20.

Allan, S. E., Passerini, L., Bacchetta, R., Crellin, N., Dai, M., Orban, P. C., Ziegler, S. F., Roncarolo, M. G. and Levings, M. K. (2005). The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *J Clin Invest* **115**, 3276-84.

Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Chen, Z., Berzins, S. P., Benoist, C. and Mathis, D. (2005). The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* **23**, 227-39.

Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C. et al. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**, 1395-401.

Andino, L. M., Conlon, T. J., Porvasnik, S. L., Boye, S. L., Hauswirth, W. W. and Lewin, A. S. (2007). Rapid, widespread transduction of the murine myocardium using self-complementary Adeno-associated virus. *Genet Vaccines Ther* **5**, 13.

Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L. and von Boehmer, H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* **3**, 756-63.

Araujo, J. A., Meng, L., Tward, A. D., Hancock, W. W., Zhai, Y., Lee, A., Ishikawa, K., Iyer, S., Buelow, R., Busuttil, R. W. et al. (2003). Systemic rather than local heme oxygenase-1 overexpression improves cardiac allograft outcomes in a new transgenic mouse. *J Immunol* **171**, 1572-80.

Arruda, V. R., Hagstrom, J. N., Deitch, J., Heiman-Patterson, T., Camire, R. M., Chu, K., Fields, P. A., Herzog, R. W., Couto, L. B., Larson, P. J. et al. (2001). Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood* **97**, 130-8.

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**, 3458-64.

Aschenbrenner, K., D'Cruz, L. M., Vollmann, E. H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L. K., Rolink, A. and Klein, L. (2007). Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* **8**, 351-8.

Ashton-Chess, J. and Blango, G. (2005). An in vitro evaluation of the potential suitability of peripheral blood CD14(+) and bone marrow CD34(+)-derived dendritic cells for a tolerance inducing regimen in the primate. *J Immunol Methods* **297**, 237-52.

Asiedu, C., Dong, S. S., Pereboev, A., Wang, W., Navarro, J., Curiel, D. T. and Thomas, J. M. (2002). Rhesus monocyte-derived dendritic cells modified to over-express TGF-beta1 exhibit potent veto activity. *Transplantation* **74**, 629-37.

Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* **190**, 995-1004.

Atchison, R. W., Casto, B. C. and Hammon, W. M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* **149**, 754-6.

- B -

Bach, F. H. (2005). Heme oxygenase-1: a therapeutic amplification funnel. *Faseb J* **19**, 1216-9.

Baecher-Allan, C. and Hafler, D. A. (2006). Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* **212**, 203-16.

Banerjee, D. K., Dhodapkar, M. V., Matayeva, E., Steinman, R. M. and Dhodapkar, K. M. (2006). Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood* **108**, 2655-61.

Barker, C. F. and Billingham, R. E. (1977). Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* **25**, 1-54.

Barratt-Boyes, S. M., Watkins, S. C. and Finn, O. J. (1997). In vivo migration of dendritic cells differentiated in vitro: a chimpanzee model. *J Immunol* **158**, 4543-7.

Barratt-Boyes, S. M., Zimmer, M. I., Harshyne, L. A., Meyer, E. M., Watkins, S. C., Capuano, S., 3rd, Murphey-Corb, M., Falo, L. D., Jr. and Donnenberg, A. D. (2000). Maturation and trafficking of monocyte-derived dendritic cells in monkeys: implications for dendritic cell-based vaccines. *J Immunol* **164**, 2487-95.

Battaglia, M., Stabilini, A. and Roncarolo, M. G. (2005). Rapamycin selectively expands CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Blood* **105**, 4743-8.

Beall, C. J., Phipps, A. J., Mathes, L. E., Stromberg, P. and Johnson, P. R. (2000). Transfer of the feline erythropoietin gene to cats using a recombinant adeno-associated virus vector. *Gene Ther* **7**, 534-9.

Behara, A. M., Westcott, A. J. and Chang, P. L. (1992). Intrathymic implants of genetically modified fibroblasts. *Faseb J* **6**, 2853-8.

Bendelac, A., Matzinger, P., Seder, R. A., Paul, W. E. and Schwartz, R. H. (1992). Activation events during thymic selection. *J Exp Med* **175**, 731-42.

Bensinger, S. J., Bandeira, A., Jordan, M. S., Caton, A. J. and Laufer, T. M. (2001). Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells. *J Exp Med* **194**, 427-38.

Benz, C., Heinzl, K. and Bleul, C. C. (2004). Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. *Eur J Immunol* **34**, 3652-63.

- Berg, L. J.** (2007). Signalling through TEC kinases regulates conventional versus innate CD8(+) T-cell development. *Nat Rev Immunol* **7**, 479-85.
- Beriou, G., Peche, H., Guillonnet, C., Merieau, E. and Cuturi, M. C.** (2005). Donor-specific allograft tolerance by administration of recipient-derived immature dendritic cells and suboptimal immunosuppression. *Transplantation* **79**, 969-72.
- Berns, K. I. and Adler, S.** (1972). Separation of two types of adeno-associated virus particles containing complementary polynucleotide chains. *J Virol* **9**, 394-6.
- 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**, 556-60.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. and Salazar-Mather, T. P.** (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* **17**, 189-220.
- Birsan, T., Hausen, B., Higgins, J. P., Hubble, R. W., Klupp, J., Stalder, M., Celniker, A., Friedrich, S., O'Hara, R. M. and Morris, R. E.** (2003). Treatment with humanized monoclonal antibodies against CD80 and CD86 combined with sirolimus prolongs renal allograft survival in cynomolgus monkeys. *Transplantation* **75**, 2106-13.
- Blankinship, M. J., Gregorevic, P., Allen, J. M., Harper, S. Q., Harper, H., Halbert, C. L., Miller, D. A. and Chamberlain, J. S.** (2004). Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther* **10**, 671-8.
- Blehschmidt, K., Schweiger, M., Wertz, K., Poulson, R., Christensen, H. M., Rosenthal, A., Lehrach, H. and Yaspo, M. L.** (1999). The mouse Aire gene: comparative genomic sequencing, gene organization, and expression. *Genome Res* **9**, 158-66.
- Blom, B. and Spits, H.** (2006). Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* **24**, 287-320.
- Bohl, D., Salvetti, A., Moullier, P. and Heard, J. M.** (1998). Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector. *Blood* **92**, 1512-7.
- Bowlus, C. L., Ahn, J., Chu, T. and Gruen, J. R.** (1999). Cloning of a novel MHC-encoded serine peptidase highly expressed by cortical epithelial cells of the thymus. *Cell Immunol* **196**, 80-6.
- Braudeau, C., Bouchet, D., Tesson, L., Iyer, S., Remy, S., Buelow, R., Anegon, I. and Chauveau, C.** (2004). Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther* **11**, 701-10.
- Breckpot, K., Emeagi, P., Dullaers, M., Michiels, A., Heirman, C. and Thielemans, K.** (2007). Activation of immature monocyte-derived dendritic cells after transduction with high doses of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* **18**, 536-46.
- Brinster, C. and Shevach, E. M.** (2005). Bone marrow-derived dendritic cells reverse the anergic state of CD4+CD25+ T cells without reversing their suppressive function. *J Immunol* **175**, 7332-40.
- Brouard, S., Otterbein, L. E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F. H., Choi, A. M. and Soares, M. P.** (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* **192**, 1015-26.
- Brunner, T., Mogil, R. J., LaFace, D., Yoo, N. J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S. J., Force, W. R., Lynch, D. H., Ware, C. F. et al.** (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* **373**, 441-4.
- Buelens, C., Verhasselt, V., De Groote, D., Thielemans, K., Goldman, M. and Willems, F.** (1997). Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur J Immunol* **27**, 1848-52.

Buelens, C., Willems, F., Delvaux, A., Pierard, G., Delville, J. P., Velu, T. and Goldman, M. (1995). Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur J Immunol* **25**, 2668-72.

Buhlmann, J. E., Elkin, S. K. and Sharpe, A. H. (2003). A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection. *J Immunol* **170**, 5421-8.

- C -

Campos, L., Posselt, A. M., Deli, B. C., Mayo, G. L., Pete, K., Barker, C. F. and Naji, A. (1994). The failure of intrathymic transplantation of nonimmunogenic islet allografts to promote induction of donor-specific unresponsiveness. *Transplantation* **57**, 950-3.

Cao, O., Dobrzynski, E., Wang, L., Nayak, S., Mingle, B., Terhorst, C. and Herzog, R. W. (2007a). Induction and role of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in tolerance to the transgene product following hepatic in vivo gene transfer. *Blood* **110**, 1132-40.

Cao, Z., Zheng, P. and Lin, Y. (2007b). A comparative study of hFIX expression mediated by rAAV8 and rAAV1 administered intramuscularly. *Cytherapy* **9**, 593-9.

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L. et al. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669-72.

Cavazzana-Calvo, M., Lagresle, C., Hacein-Bey-Abina, S. and Fischer, A. (2005). Gene therapy for severe combined immunodeficiency. *Annu Rev Med* **56**, 585-602.

Cayabyab, M., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. (1994). CD40 preferentially costimulates activation of CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* **152**, 1523-31.

Cederbom, L., Hall, H. and Ivars, F. (2000). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* **30**, 1538-43.

Chao, H., Liu, Y., Rabinowitz, J., Li, C., Samulski, R. J. and Walsh, C. E. (2000). Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther* **2**, 619-23.

Charlton, B., Taylor-Edwards, C., Tisch, R. and Fathman, C. G. (1994). Prevention of diabetes and insulinitis by neonatal intrathymic islet administration in NOD mice. *J Autoimmun* **7**, 549-60.

Chauveau, C., Remy, S., Royer, P. J., Hill, M., Tanguy-Royer, S., Hubert, F. X., Tesson, L., Brion, R., Beriou, G., Gregoire, M. et al. (2005). Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* **106**, 1694-702.

Chen, C. L., Jensen, R. L., Schnepf, B. C., Connell, M. J., Shell, R., Sferri, T. J., Bartlett, J. S., Clark, K. R. and Johnson, P. R. (2005). Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J Virol* **79**, 14781-92.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. and Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* **198**, 1875-86.

Chenuaud, P., Larcher, T., Rabinowitz, J. E., Provost, N., Joussemet, B., Bujard, H., Samulski, R. J., Favre, D. and Moullier, P. (2004). Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther* **9**, 410-8.

Chiffolleau, E., Beriou, G., Dutartre, P., Usal, C., Souillou, J. P. and Cuturi, M. C. (2002). Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J*

Transplant 2, 745-57.

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, 1574-83.

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, 2420-5.

Chowdhury, N. C., Murphy, B., Sayegh, M. H., Jin, M. X., Roy, D. K., Hardy, M. A. and Oluwole, S. F. (1996). Acquired systemic tolerance to rat cardiac allografts induced by intrathymic inoculation of synthetic polymorphic MHC class I allopeptides. *Transplantation* 62, 1878-82.

Chowdhury, N. C., Saborio, D. V., Garrovillo, M., Chandraker, A., Magee, C. C., Waaga, A. M., Sayegh, M. H., Jin, M. X. and Oluwole, S. F. (1998). Comparative studies of specific acquired systemic tolerance induced by intrathymic inoculation of a single synthetic Wistar-Furth (RT1U) allo-MHC class I (RT1.AU) peptide or WAG (RT1U)-derived class I peptide. *Transplantation* 66, 1059-66.

Clark, K. R., Voulgaropoulou, F., Fraley, D. M. and Johnson, P. R. (1995). Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* 6, 1329-41.

Coates, P. T., Barratt-Boyes, S. M., Zhang, L., Donnenberg, V. S., O'Connell, P. J., Logar, A. J., Duncan, F. J., Murphey-Corb, M., Donnenberg, A. D., Morelli, A. E. et al. (2003). Dendritic cell subsets in blood and lymphoid tissue of rhesus monkeys and their mobilization with Flt3 ligand. *Blood* 102, 2513-21.

Coates, P. T., Krishnan, R., Kireta, S., Johnston, J. and Russ, G. R. (2001). Human myeloid dendritic cells transduced with an adenoviral interleukin-10 gene construct inhibit human skin graft rejection in humanized NOD-scid chimeric mice. *Gene Ther* 8, 1224-33.

Cohen, J. L., Trenado, A., Vasey, D., Klatzmann, D. and Salomon, B. L. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 196, 401-6.

Conrad, C. K., Allen, S. S., Afione, S. A., Reynolds, T. C., Beck, S. E., Fee-Maki, M., Barraza-Ortiz, X., Adams, R., Askin, F. B., Carter, B. J. et al. (1996). Safety of single-dose administration of an adeno-associated virus (AAV)-CFTR vector in the primate lung. *Gene Ther* 3, 658-68.

Conway, J. E., Rhys, C. M., Zolotukhin, I., Zolotukhin, S., Muzyczka, N., Hayward, G. S. and Byrne, B. J. (1999). High-titer recombinant adeno-associated virus production utilizing a recombinant herpes simplex virus type I vector expressing AAV-2 Rep and Cap. *Gene Ther* 6, 986-93.

Conway, J. E., Zolotukhin, S., Muzyczka, N., Hayward, G. S. and Byrne, B. J. (1997). Recombinant adeno-associated virus type 2 replication and packaging is entirely supported by a herpes simplex virus type 1 amplicon expressing Rep and Cap. *J Virol* 71, 8780-9.

Cordier, L., Gao, G. P., Hack, A. A., McNally, E. M., Wilson, J. M., Chirmule, N. and Sweeney, H. L. (2001). Muscle-specific promoters may be necessary for adeno-associated virus-mediated gene transfer in the treatment of muscular dystrophies. *Hum Gene Ther* 12, 205-15.

Corinti, S., Albanesi, C., la Sala, A., Pastore, S. and Girolomoni, G. (2001). Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* 166, 4312-8.

Cronin, J., Zhang, X. Y. and Reiser, J. (2005). Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther* 5, 387-98.

Curotto de Lafaille, M. A., Lino, A. C., Kutchukhidze, N. and Lafaille, J. J. (2004). CD25⁻ T cells generate CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol*

- D -

Dall'Era, M. and Davis, J. (2004). CTLA4Ig: a novel inhibitor of costimulation. *Lupus* **13**, 372-6.

Daniels, M. A., Teixeira, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., Werlen, G., Hollander, G. A., Gascoigne, N. R. and Palmer, E. (2006). Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* **444**, 724-9.

Davidoff, A. M., Gray, J. T., Ng, C. Y., Zhang, Y., Zhou, J., Spence, Y., Bakar, Y. and Nathwani, A. C. (2005). Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5, and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models. *Mol Ther* **11**, 875-88.

DeMatteo, R. P., Chu, G., Ahn, M., Chang, E., Barker, C. F. and Markmann, J. F. (1997). Long-lasting adenovirus transgene expression in mice through neonatal intrathymic tolerance induction without the use of immunosuppression. *J Virol* **71**, 5330-5.

DeMatteo, R. P., Raper, S. E., Ahn, M., Fisher, K. J., Burke, C., Radu, A., Widera, G., Claytor, B. R., Barker, C. F. and Markmann, J. F. (1995). Gene transfer to the thymus. A means of abrogating the immune response to recombinant adenovirus. *Ann Surg* **222**, 229-39; discussion 239-42.

Demirkiran, A., Hendrikx, T. K., Baan, C. C. and van der Laan, L. J. (2008). Impact of Immunosuppressive Drugs on CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells: Does In Vitro Evidence Translate to the Clinical Setting? *Transplantation* **85**, 783-9.

Derbinski, J., Gabler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenhausen, M., Peltonen, L., Walter, J. and Kyewski, B. (2005). Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med* **202**, 33-45.

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B. and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* **2**, 1032-9.

Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C. and Bhardwaj, N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* **193**, 233-8.

Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Sapp, M., Desai, H., Fossella, C., Krasovsky, J., Donahoe, S. M., Dunbar, P. R., Cerundolo, V., Nixon, D. F. et al. (1999). Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest* **104**, 173-80.

Dieckmann, D., Bruett, C. H., Ploettner, H., Lutz, M. B. and Schuler, G. (2002). Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J Exp Med* **196**, 247-53.

Dobrzynski, E., Fitzgerald, J. C., Cao, O., Mingozi, F., Wang, L. and Herzog, R. W. (2006). Prevention of cytotoxic T lymphocyte responses to factor IX-expressing hepatocytes by gene transfer-induced regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4592-7.

Dobrzynski, E., Mingozi, F., Liu, Y. L., Bendo, E., Cao, O., Wang, L. and Herzog, R. W. (2004). Induction of antigen-specific CD4+ T-cell anergy and deletion by in vivo viral gene transfer. *Blood* **104**, 969-77.

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**, 2101-12.

Dono, K., Maki, T., Wood, M. L. and Monaco, A. P. (1995). Induction of tolerance to skin allografts by intrathymic injection of donor splenocytes. Effect of donor-recipient strain combination and supplemental rapamycin. *Transplantation* **60**, 1268-73.

Donskoy, E. and Goldschneider, I. (1992). Thymocytopoiesis is maintained by blood-borne precursors throughout postnatal life. A study in parabiotic mice. *J Immunol* **148**, 1604-12.

Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H. J. and Bar-Or, A. (2007). Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* **178**, 6092-9.

- E -

Edinger, M., Hoffmann, P., Ermann, J., Drago, K., Fathman, C. G., Strober, S. and Negrin, R. S. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* **9**, 1144-50.

Egerton, M., Scollay, R. and Shortman, K. (1990). Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2579-82.

Erles, K., Sebkova, 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**, 406-11.

Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F. G., Higgins, J. P., Negrin, R. S., Fathman, C. G. and Strober, S. (2005). Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* **105**, 2220-6.

Essery, G., Feldmann, M. and Lamb, J. R. (1988). Interleukin-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes. *Immunology* **64**, 413-7.

- F -

Fantini, M. C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P. R. and Neurath, M. F. (2004). Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* **172**, 5149-53.

Favre, D., Blouin, V., Provost, N., Spisek, R., Porrot, F., Bohl, D., Marme, F., Cherel, Y., Salvetti, A., Hurtrel, B. et al. (2002). Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J Virol* **76**, 11605-11.

Feili-Hariri, M., Dong, X., Alber, S. M., Watkins, S. C., Salter, R. D. and Morel, P. A. (1999). Immunotherapy of NOD mice with bone marrow-derived dendritic cells. *Diabetes* **48**, 2300-8.

Feili-Hariri, M., Falkner, D. H. and Morel, P. A. (2002). Regulatory Th2 response induced following adoptive transfer of dendritic cells in prediabetic NOD mice. *Eur J Immunol* **32**, 2021-30.

Ferrari, F. K., Samulski, T., Shenk, T. and Samulski, R. J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* **70**, 3227-34.

Ferris, C. D., Jaffrey, S. R., Sawa, A., Takahashi, M., Brady, S. D., Barrow, R. K., Tysoe, S. A., Wolosker, H., Baranano, D. E., Dore, S. et al. (1999). Haem oxygenase-1

prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol* **1**, 152-7.

Fields, P. A., Arruda, V. R., Armstrong, E., Chu, K., Mingozi, F., Hagstrom, J. N., Herzog, R. W. and High, K. A. (2001). Risk and prevention of anti-factor IX formation in AAV-mediated gene transfer in the context of a large deletion of F9. *Mol Ther* **4**, 201-10.

Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. and Anderton, S. M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* **3**, 944-50.

Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. and O'Garra, A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* **147**, 3815-22.

Fischer, K., Voelkl, S., Heymann, J., Przybylski, G. K., Mondal, K., Laumer, M., Kunz-Schughart, L., Schmidt, C. A., Andreesen, R. and Mackensen, A. (2005). Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta⁺ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* **105**, 2828-35.

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**, 520-32.

Fontenot, J. D., Dooley, J. L., Farr, A. G. and Rudensky, A. Y. (2005a). Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* **202**, 901-6.

Fontenot, J. D., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330-6.

Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G. and Rudensky, A. Y. (2005b). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* **22**, 329-41.

Foss, D. L., Donskoy, E. and Goldschneider, I. (2001). The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J Exp Med* **193**, 365-74.

Foy, T. M., Page, D. M., Waldschmidt, T. J., Schoneveld, A., Laman, J. D., Masters, S. R., Tygrett, L., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., Claassen, E. et al. (1995). An essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection. *J Exp Med* **182**, 1377-88.

Fu, F., Li, Y., Qian, S., Lu, L., Chambers, F., Starzl, T. E., Fung, J. J. and Thomson, A. W. (1996). Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II⁺, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation* **62**, 659-65.

Fu, H., Muenzer, J., Samulski, R. J., Breese, G., Sifford, J., Zeng, X. and McCarty, D. M. (2003). Self-complementary adeno-associated virus serotype 2 vector: global distribution and broad dispersion of AAV-mediated transgene expression in mouse brain. *Mol Ther* **8**, 911-7.

Furtado, G. C., Curotto de Lafaille, M. A., Kutchukhidze, N. and Lafaille, J. J. (2002). Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* **196**, 851-7.

- G -

Gallegos, A. M. and Bevan, M. J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* **200**, 1039-49.

Gansuud, B., Asiedu, C. K., Goodwin, J., Jargal, U., Deckard, L. A., Andrades, P., Guarcello, V. and Thomas, J. M. (2007). Expansion of CD4⁺CD25⁺ suppressive regulatory T cells from rhesus macaque peripheral blood by FN18/antihuman CD28-coated Dynal beads. *Hum Immunol* **68**, 478-90.

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**, 6381-8.

Gao, G. P., Alvira, M. R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J. and Wilson, J. M. (2002a). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11854-9.

Gao, G. P., Lu, Y., Sun, X., Johnston, J., Calcedo, R., Grant, R. and Wilson, J. M. (2006). High-level transgene expression in nonhuman primate liver with novel adeno-associated virus serotypes containing self-complementary genomes. *J Virol* **80**, 6192-4.

Gao, J. X., Zhang, H., Bai, X. F., Wen, J., Zheng, X., Liu, J., Zheng, P. and Liu, Y. (2002b). Perinatal blockade of b7-1 and b7-2 inhibits clonal deletion of highly pathogenic autoreactive T cells. *J Exp Med* **195**, 959-71.

Gavin, M. A., Rasmussen, J. P., Fontenot, J. D., Vasta, V., Manganiello, V. C., Beavo, J. A. and Rudensky, A. Y. (2007). Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* **445**, 771-5.

Gavin, M. A., Torgerson, T. R., Houston, E., DeRoos, P., Ho, W. Y., Stray-Pedersen, A., Ocheltree, E. L., Greenberg, P. D., Ochs, H. D. and Rudensky, A. Y. (2006). Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6659-64.

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.

Gillanders, W. E., Arima, T., Tu, F., Hansen, T. H. and Flye, M. W. (1997). Evidence for clonal deletion and clonal anergy after intrathymic antigen injection in a transplantation model. *Transplantation* **64**, 1159-66.

Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T. and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* **150**, 4244-52.

Godfrey, W. R., Ge, Y. G., Spoden, D. J., Levine, B. L., June, C. H., Blazar, B. R. and Porter, S. B. (2004). In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood* **104**, 453-61.

Goldschneider, I., Komschlies, K. L. and Greiner, D. L. (1986). Studies of thymocytopoiesis in rats and mice. I. Kinetics of appearance of thymocytes using a direct intrathymic adoptive transfer assay for thymocyte precursors. *J Exp Med* **163**, 1-17.

Golshayan, D., Jiang, S., Tsang, J., Garin, M. I., Mottet, C. and Lechler, R. I. (2007). In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood* **109**, 827-35.

Gonin, P., Arandel, L., Van Wittenberghe, L., Marais, T., Perez, N. and Danos, O. (2005). Femoral intra-arterial injection: a tool to deliver and assess recombinant AAV constructs in rodents whole hind limb. *J Gene Med* **7**, 782-91.

Gorczynski, R. M., Bransom, J., Catral, M., Huang, X., Lei, J., Xiaorong, L., Min, W. P., Wan, Y. and Gauldie, J. (2000). Synergy in induction of increased renal allograft survival after portal vein infusion of dendritic cells transduced to express TGFbeta and IL-10, along with administration of CHO cells expressing the regulatory molecule OX-2. *Clin Immunol* **95**, 182-9.

Gossen, M. and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-51.

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. and Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-9.

Grewal, I. S. and Flavell, R. A. (1996). The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* **153**, 85-106.

Gross, D. A., Leboeuf, M., Gjata, B., Danos, O. and Davoust, J. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit immune-mediated transgene rejection. *Blood* **102**, 4326-8.

Guillot, C., Menoret, S., Guillonneau, C., Braudeau, C., Castro, M. G., Lowenstein, P. and Anegón, I. (2003). Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig. *Blood* **101**, 3325-33.

- H -

Haanstra, K. G., van der Maas, M. J., t Hart, B. A. and Jonker, M. (2008). Characterization of Naturally Occurring CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Rhesus Monkeys. *Transplantation* **85**, 1185-92.

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E. et al. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**, 415-9.

Hackstein, H., Taner, T., Zahorchak, A. F., Morelli, A. E., Logar, A. J., Gessner, A. and Thomson, A. W. (2003). Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood* **101**, 4457-63.

Hackstein, H. and Thomson, A. W. (2004). Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* **4**, 24-34.

Halbert, C. L., Standaert, T. A., Wilson, C. B. and Miller, A. D. (1998). Successful readministration of adeno-associated virus vectors to the mouse lung requires transient immunosuppression during the initial exposure. *J Virol* **72**, 9795-805.

Han, Z., Zhong, L., Maina, N., Hu, Z., Li, X., Chouthai, N. S., Bischof, D., Weigel-Van Aken, K. A., Slayton, W. B., Yoder, M. C. et al. (2008). Stable Integration of Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Genomes After Transduction of Murine Hematopoietic Stem Cells. *Hum Gene Ther* **27**, 27.

Hara, M., Kingsley, C. I., Niimi, M., Read, S., Turvey, S. E., Bushell, A. R., Morris, P. J., Powrie, F. and Wood, K. J. (2001). IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* **166**, 3789-96.

Hartigan-O'Connor, D. J., Poon, C., Sinclair, E. and McCune, J. M. (2007). Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods* **319**, 41-52.

Heino, M., Peterson, P., Sillanpaa, N., Guerin, S., Wu, L., Anderson, G., Scott, H. S., Antonarakis, S. E., Kudoh, J., Shimizu, N. et al. (2000). RNA and protein expression of the murine autoimmune regulator gene (Aire) in normal, RelB-deficient and in NOD mouse. *Eur J Immunol* **30**, 1884-93.

Herzog, R. W., Fields, P. A., Arruda, V. R., Brubaker, J. O., Armstrong, E., McClintock, D., Bellinger, D. A., Couto, L. B., Nichols, T. C. and High, K. A. (2002). Influence of vector dose on factor IX-specific T and B cell responses in muscle-directed gene therapy. *Hum Gene Ther* **13**, 1281-91.

Herzog, R. W., Mount, J. D., Arruda, V. R., High, K. A. and Lothrop, C. D., Jr. (2001). Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol Ther* **4**, 192-200.

Herzog, R. W., Yang, E. Y., Couto, L. B., Hagstrom, J. N., Elwell, D., Fields, P. A., Burton, M., Bellinger, D. A., Read, M. S., Brinkhous, K. M. et al. (1999). Long-term

correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med* 5, 56-63.

Hill, M., Tanguy-Royer, S., Royer, P., Chauveau, C., Asghar, K., Tesson, L., Lavainne, F., Remy, S., Brion, R., Hubert, F. X. et al. (2007). IDO expands human CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur J Immunol* 37, 3054-62.

Hoffmann, P., Eder, R., Kunz-Schughart, L. A., Andreesen, R. and Edinger, M. (2004). Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells. *Blood* 104, 895-903.

Hoffmann, P., Ermann, J., Edinger, M., Fathman, C. G. and Strober, S. (2002). Donor-type CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 196, 389-99.

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, 1467-74.

Hollis, E. R., 2nd, Kadoya, K., Hirsch, M., Samulski, R. J. and Tuszynski, M. H. (2008). Efficient retrograde neuronal transduction utilizing self-complementary AAV1. *Mol Ther* 16, 296-301.

Horak, I., Lohler, J., Ma, A. and Smith, K. A. (1995). Interleukin-2 deficient mice: a new model to study autoimmunity and self-tolerance. *Immunol Rev* 148, 35-44.

Hori, S., Haury, M., Coutinho, A. and Demengeot, J. (2002). Specificity requirements for selection and effector functions of CD25⁺ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8213-8.

Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-61.

Hsieh, C. S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J. D. and Rudensky, A. Y. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* 7, 401-10.

Hu, C. M., Lin, H. H., Chiang, M. T., Chang, P. F. and Chau, L. Y. (2007). Systemic expression of heme oxygenase-1 ameliorates type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 56, 1240-7.

Huesmann, M., Scott, B., Kisielow, P. and von Boehmer, H. (1991). Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell* 66, 533-40.

- I -

Ilan, Y., Attavar, P., Takahashi, M., Davidson, A., Horwitz, M. S., Guida, J., Chowdhury, N. R. and Chowdhury, J. R. (1996). Induction of central tolerance by intrathymic inoculation of adenoviral antigens into the host thymus permits long-term gene therapy in Gunn rats. *J Clin Invest* 98, 2640-7.

Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F. and Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162, 5317-26.

- J -

Jackson, D. A., Juranek, S. and Lipps, H. J. (2006). Designing nonviral vectors for

efficient gene transfer and long-term gene expression. *Mol Ther* **14**, 613-26.

James, T., Jin, M. X., Chowdhury, N. C. and Oluwale, S. F. (1993). Tolerance induction to rat islet allografts by intrathymic inoculation of donor spleen cells. *Transplantation* **56**, 1148-52.

Janeway, C. A., Jr. and Bottomly, K. (1994). Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* **76**, 275-85.

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. (2006a). Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy. *Blood* **108**, 3321-8.

Jiang, S., Camara, N., Lombardi, G. and Lechler, R. I. (2003). Induction of allopeptide-specific human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells ex vivo. *Blood* **102**, 2180-6.

Jiang, S., Tsang, J., Game, D. S., Stevenson, S., Lombardi, G. and Lechler, R. I. (2006b). Generation and expansion of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells with indirect allospecificity: Potential reagents to promote donor-specific transplantation tolerance. *Transplantation* **82**, 1738-43.

Jiang, S., Tsang, J. and Lechler, R. I. (2006c). Adoptive cell therapy using in vitro generated human CD4⁺ CD25⁺ regulatory t cells with indirect allospecificity to promote donor-specific transplantation tolerance. *Transplant Proc* **38**, 3199-201.

Joffre, O., Santolaria, T., Calise, D., Al Saati, T., Hudrisier, D., Romagnoli, P. and van Meerwijk, J. P. (2008). Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes. *Nat Med* **14**, 88-92.

Jones, N. D., Fluck, N. C., Roelen, D. L., Mellor, A. L., Morris, P. J. and Wood, K. J. (1997). Deletion of alloantigen-reactive thymocytes as a mechanism of adult tolerance induction following intrathymic antigen administration. *Eur J Immunol* **27**, 1591-600.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Steinbrink, K. and Enk, A. H. (2001). Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* **22**, 394-400.

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**, 4212-23.

Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Hohenbeck, A. E., Lerman, M. A., Naji, A. and Caton, A. J. (2001). Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* **2**, 301-6.

- K -

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**, 6884-93.

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**, 14082-7.

Khoury, S. J., Sayegh, M. H., Hancock, W. W., Gallon, L., Carpenter, C. B. and Weiner, H. L. (1993). Acquired tolerance to experimental autoimmune encephalomyelitis by intrathymic injection of myelin basic protein or its major encephalitogenic peptide. *J Exp Med* **178**, 559-66.

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**, 3282-91.

Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H. and Bujard, H. (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10933-8.

Kocot, 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**, 215-9.

Konig, R., Huang, L. Y. and Germain, R. N. (1992). MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* **356**, 796-8.

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**, 5071-8.

Kotsch, K., Martins, P. N., Klemz, R., Janssen, U., Gerstmayer, B., Dernier, A., Reutzel-Selke, A., Kuckelkorn, U., Tullius, S. G. and Volk, H. D. (2007). Heme oxygenase-1 ameliorates ischemia/reperfusion injury by targeting dendritic cell maturation and migration. *Antioxid Redox Signal* **9**, 2049-63.

Kuroda, N., Mitani, T., Takeda, N., Ishimaru, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Bando, Y., Izumi, K., Takahashi, T., Nomura, T. et al. (2005). Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J Immunol* **174**, 1862-70.

Kurts, C., Sutherland, R. M., Davey, G., Li, M., Lew, A. M., Blanas, E., Carbone, F. R., Miller, J. F. and Heath, W. R. (1999). CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12703-7.

- L -

Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T. and Robey, E. A. (2006). Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol* **7**, 338-43.

Larosa, D. F. and Orange, J. S. (2008). 1. Lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* **121**, S364-9; quiz S412.

Laumonier, T., Yang, S., Konig, S., Chauveau, C., Anegon, I., Hoffmeyer, P. and Menetrey, J. (2008). Lentivirus mediated HO-1 gene transfer enhances myogenic precursor cell survival after autologous transplantation in pig. *Mol Ther* **16**, 404-10.

Le Guiner, C., Stieger, K., Snyder, R. O., Rolling, F. and Moullier, P. (2007). Immune responses to gene product of inducible promoters. *Curr Gene Ther* **7**, 334-46.

Lechler, R., Chai, J. G., Marelli-Berg, F. and Lombardi, G. (2001). The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance. *Immunology* **103**, 262-9.

Lee, K. M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D. K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L. E., Thompson, C. B. and Bluestone, J. A. (1998). Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* **282**, 2263-6.

Lee, T. S. and Chau, L. Y. (2002). Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* **8**, 240-6.

Levings, M. K., Sangregorio, R. and Roncarolo, M. G. (2001). Human cd25(+)cd4(+) regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* **193**, 1295-302.

Li, M., Peterson, S., Husney, D., Inaba, M., Guo, K., Kappas, A., Ikehara, S. and Abraham, N. G. (2007a). Long-lasting expression of HO-1 delays progression of type I

diabetes in NOD mice. *Cell Cycle* **6**, 567-71.

Li, M., Peterson, S., Husney, D., Inaba, M., Guo, K., Terada, E., Morita, T., Patil, K., Kappas, A., Ikehara, S. et al. (2007b). Interdiction of the diabetic state in NOD mice by sustained induction of heme oxygenase: possible role of carbon monoxide and bilirubin. *Antioxid Redox Signal* **9**, 855-63.

Lin, W., Haribhai, D., Relland, L. M., Truong, N., Carlson, M. R., Williams, C. B. and Chatila, T. A. (2007). Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol* **8**, 359-68.

Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E. and Petrie, H. T. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* **194**, 127-34.

Linden, R. M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E. and Berns, K. I. (1996a). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11288-94.

Linden, R. M., Winocour, E. and Berns, K. I. (1996b). The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7966-72.

Linsley, P. S. and Ledbetter, J. A. (1993). The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* **11**, 191-212.

Lipshutz, G. S., Titre, D., Brindle, M., Bisconte, A. R., Contag, C. H. and Gaensler, K. M. (2003). Comparison of gene expression after intraperitoneal delivery of AAV2 or AAV5 in utero. *Mol Ther* **8**, 90-8.

Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L. and Goodnow, C. C. (2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* **4**, 350-4.

Listopad, J., Asadullah, K., Sievers, C., Ritter, T., Meisel, C., Sabat, R. and Docke, W. D. (2007). Heme oxygenase-1 inhibits T cell-dependent skin inflammation and differentiation and function of antigen-presenting cells. *Exp Dermatol* **16**, 661-70.

Liu, H., Hu, B., Xu, D. and Liew, F. Y. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. *J Immunol* **171**, 5012-7.

Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., Fazekas de St Groth, B. et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* **203**, 1701-11.

Liu, Y., Chiriva-Internati, M., Grizzi, F., Salati, E., Roman, J. J., Lim, S. and Hermonat, P. L. (2001). Rapid induction of cytotoxic T-cell response against cervical cancer cells by human papillomavirus type 16 E6 antigen gene delivery into human dendritic cells by an adeno-associated virus vector. *Cancer Gene Ther* **8**, 948-57.

Liu, Y. J., Soumelis, V., Watanabe, N., Ito, T., Wang, Y. H., Malefyt Rde, W., Omori, M., Zhou, B. and Ziegler, S. F. (2007). TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol* **25**, 193-219.

Llorente, L., Zou, W., Levy, Y., Richaud-Patin, Y., Wijdenes, J., Alcocer-Varela, J., Morel-Fourrier, B., Brouet, J. C., Alarcon-Segovia, D., Galanaud, P. et al. (1995). Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* **181**, 839-44.

Lorain, S., Gross, D. A., Goyenvalle, A., Danos, O., Davoust, J. and Garcia, L. (2008). Transient immunomodulation allows repeated injections of AAV1 and correction of muscular dystrophy in multiple muscles. *Mol Ther* **16**, 541-7.

Lu, L., Li, W., Fu, F., Chambers, F. G., Qian, S., Fung, J. J. and Thomson, A. W. (1997). Blockade of the CD40-CD40 ligand pathway potentiates the capacity of donor-derived dendritic cell progenitors to induce long-term cardiac allograft survival. *Transplantation* **64**, 1808-15.

Lutz, M. B. and Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* **23**, 445-9.

Lutz, M. B., Suri, R. M., Niimi, M., Ogilvie, A. L., Kukutsch, N. A., Rossner, S., Schuler, G. and Austyn, J. M. (2000). Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol* **30**, 1813-22.

- M -

Mahadevan, M., Liu, Y., You, C., Luo, R., You, H., Mehta, J. L. and Hermonat, P. L. (2007). Generation of robust cytotoxic T lymphocytes against prostate specific antigen by transduction of dendritic cells using protein and recombinant adeno-associated virus. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 1615-24.

Manning, W. C., Zhou, S., Bland, M. P., Escobedo, J. A. and Dwarki, V. (1998). Transient immunosuppression allows transgene expression following readministration of adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* **9**, 477-85.

Manno, C. S., Chew, A. J., Hutchison, S., Larson, P. J., Herzog, R. W., Arruda, V. R., Tai, S. J., Ragni, M. V., Thompson, A., Ozelo, M. et al. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* **101**, 2963-72.

Manno, C. S., Pierce, G. F., Arruda, V. R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J. J., Ozelo, M. C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B. et al. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **12**, 342-7.

Marodon, G., Fisson, S., Levacher, B., Fabre, M., Salomon, B. L. and Klatzmann, D. (2006). Induction of antigen-specific tolerance by intrathymic injection of lentiviral vectors. *Blood* **108**, 2972-8.

Marodon, G. and Klatzmann, D. (2004). In situ transduction of stromal cells and thymocytes upon intrathymic injection of lentiviral vectors. *BMC Immunol* **5**, 18.

Martinez-Naves, E., Barber, L. D., Madrigal, J. A., Vullo, C. M., Clayberger, C., Lyu, S. C., Williams, R. C., Gorodezky, C., Markow, T., Petzl-Erler, M. L. et al. (1997). Interactions of HLA-B*4801 with peptide and CD8. *Tissue Antigens* **50**, 258-64.

Martins, P. N., Kessler, H., Jurisch, A., Reutzel-Selke, A., Kramer, J., Pascher, A., Pratschke, J., Neuhaus, P., Volk, H. D. and Tullius, S. G. (2005). Induction of heme oxygenase-1 in the donor reduces graft immunogenicity. *Transplant Proc* **37**, 384-6.

Masteller, E. L., Warner, M. R., Tang, Q., Tarbell, K. V., McDevitt, H. and Bluestone, J. A. (2005). Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from nonobese diabetic mice. *J Immunol* **175**, 3053-9.

Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L. and Cyster, J. G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355-60.

Matsumura, Y., Kobayashi, T., Ichiyama, K., Yoshida, R., Hashimoto, M., Takimoto, T., Tanaka, K., Chinen, T., Shichita, T., Wyss-Coray, T. et al. (2007). Selective expansion of foxp3-positive regulatory T cells and immunosuppression by suppressors of cytokine signaling 3-deficient dendritic cells. *J Immunol* **179**, 2170-9.

Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N. and Londei, M. (2003). Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* **197**, 489-501.

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**, 2112-8.

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**, 1248-54.

McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M. and Byrne, M. C. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* **16**, 311-23.

McPherson, R. A., Rosenthal, L. J. and Rose, J. A. (1985). Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* **147**, 217-22.

Menges, M., Rossner, S., Voigtlander, C., Schindler, H., Kukutsch, N. A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G. and Lutz, M. B. (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* **195**, 15-21.

Meylan, E. and Tschopp, J. (2006). Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell* **22**, 561-9.

Miller, J., Daitch, L., Rath, S. and Selsing, E. (1990). Tissue-specific expression of allogeneic class II MHC molecules induces neither tissue rejection nor clonal inactivation of alloreactive T cells. *J Immunol* **144**, 334-41.

Min, W. P., Zhou, D., Ichim, T. E., Strejan, G. H., Xia, X., Yang, J., Huang, X., Garcia, B., White, D., Dutartre, P. et al. (2003). Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance. *J Immunol* **170**, 1304-12.

Min, Y. H., Lee, S. T., Choi, K. M., Chong, S. Y., Kim, H. O., Hahn, J. S. and Ko, Y. W. (1998). Ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ hematopoietic stem cells. *Yonsei Med J* **39**, 328-38.

Mingozi, 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. (2007a). Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood* **110**, 2334-41.

Mingozi, F., Maus, M. V., Hui, D. J., Sabatino, D. E., Murphy, S. L., Rasko, J. E., Ragni, M. V., Manno, C. S., Sommer, J., Jiang, H. et al. (2007b). CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* **13**, 419-22.

Misslitz, A., Pabst, O., Hintzen, G., Ohl, L., Kremmer, E., Petrie, H. T. and Forster, R. (2004). Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med* **200**, 481-91.

Monteiro, J. M., Harvey, C. and Trinchieri, G. (1998). Role of interleukin-12 in primary influenza virus infection. *J Virol* **72**, 4825-31.

Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765.

Morelli, A. E., Coates, P. T., Shufesky, W. J., Barratt-Boyes, S. M., Fung, J. J., Demetris, A. J. and Thomson, A. W. (2007). Growth factor-induced mobilization of dendritic cells in kidney and liver of rhesus macaques: implications for transplantation. *Transplantation* **83**, 656-62.

Morelli, A. E. and Thomson, A. W. (2003). Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. *Immunol Rev* **196**, 125-46.

Mori, S., Takeuchi, T., Enomoto, Y., Kondo, K., Sato, K., Ono, F., Iwata, N., Sata, T. and Kanda, T. (2006). Biodistribution of a low dose of intravenously administered AAV-2, 10, and 11 vectors to cynomolgus monkeys. *Jpn J Infect Dis* **59**, 285-93.

Mori, S., Wang, L., Takeuchi, T. and Kanda, T. (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology*

330, 375-83.

Morse, M. A., Coleman, R. E., Akabani, G., Niehaus, N., Coleman, D. and Lyster, H. K. (1999). Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* **59**, 56-8.

Mortara, L., Ploquin, M. J., Faye, A., Scott-Algara, D., Vaslin, B., Butor, C., Hosmalin, A., Barre-Sinoussi, F., Diop, O. M. and Muller-Trutwin, M. C. (2006). Phenotype and function of myeloid dendritic cells derived from African green monkey blood monocytes. *J Immunol Methods* **308**, 138-55.

Muller, G., Muller, A., Tuting, T., Steinbrink, K., Saloga, J., Szalma, C., Knop, J. and Enk, A. H. (2002). Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naive and sensitized T cells in vivo. *J Invest Dermatol* **119**, 836-41.

Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y. and Tanaka, K. (2007). Regulation of CD8⁺ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* **316**, 1349-53.

- N -

Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H. S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K. J., Lalioti, M. D., Mullis, P. E., Antonarakis, S. E. et al. (1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* **17**, 393-8.

Naik, S. H., Sathe, P., Park, H. Y., Metcalf, D., Proietto, A. I., Dakic, A., Carotta, S., O'Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A. et al. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* **8**, 1217-26.

Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J. A., Ploegh, H., Peters, C. and Rudensky, A. Y. (1998). Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**, 450-3.

Nakai, H., Fuess, S., Storm, T. A., Muramatsu, S., Nara, Y. and Kay, M. A. (2005). Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol* **79**, 214-24.

Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I., Pedersen, A., Harada, N., Nawata, H. and Strober, W. (2004). TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* **172**, 834-42.

Nakamura, K., Kitani, A. and Strober, W. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* **194**, 629-44.

Naquet, P., Naspetti, M. and Boyd, R. (1999). Development, organization and function of the thymic medulla in normal, immunodeficient or autoimmune mice. *Semin Immunol* **11**, 47-55.

Nathwani, A. C., Davidoff, A. M., Hanawa, H., Hu, Y., Hoffer, F. A., Nikanorov, A., Slaughter, C., Ng, C. Y., Zhou, J., Lozier, J. N. et al. (2002). Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques. *Blood* **100**, 1662-9.

Nathwani, A. C., Gray, J. T., McIntosh, J., Ng, C. Y., Zhou, J., Spence, Y., Cochrane, M., Gray, E., Tuddenham, E. G. 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**, 1414-21.

Nathwani, A. C., Gray, J. T., Ng, C. Y., Zhou, J., Spence, Y., Waddington, S. N.,

Tuddenham, E. G., Kemball-Cook, G., McIntosh, J., Boon-Spijker, M. et al. (2006). Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* **107**, 2653-61.

Natkunarah, M., Trittibach, P., McIntosh, J., Duran, Y., Barker, S. E., Smith, A. J., Nathwani, A. C. and Ali, R. R. (2008). Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8. *Gene Ther* **15**, 463-7.

Niimi, M., Shirasugi, N., Ikeda, Y., Kan, S., Takami, H. and Hamano, K. (2001). Operational tolerance induced by pretreatment with donor dendritic cells under blockade of CD40 pathway. *Transplantation* **72**, 1556-62.

Nobori, S., Samelson-Jones, E., Shimizu, A., Hisashi, Y., Yamamoto, S., Kamano, C., Teranishi, K., Vagefi, P. A., Nuhn, M., Okumi, M. et al. (2006). Long-term acceptance of fully allogeneic cardiac grafts by cotransplantation of vascularized thymus in miniature swine. *Transplantation* **81**, 26-35.

- O -

O'Doherty, U., Ignatius, R., Bhardwaj, N. and Pope, M. (1997). Generation of monocyte-derived dendritic cells from precursors in rhesus macaque blood. *J Immunol Methods* **207**, 185-94.

Odorico, J. S., Posselt, A. M., Naji, A., Markmann, J. F. and Barker, C. F. (1993). Promotion of rat cardiac allograft survival by intrathymic inoculation of donor splenocytes. *Transplantation* **55**, 1104-7.

Oluwole, S. F., Chowdhury, N. C. and Fawwaz, R. A. (1993a). Induction of donor-specific unresponsiveness to rat cardiac allografts by intrathymic injection of UV-B-irradiated donor spleen cells. *Transplantation* **55**, 1389-95.

Oluwole, S. F., Chowdhury, N. C. and Fawwaz, R. A. (1993b). Induction of donor-specific unresponsiveness to rat cardiac allografts by pretreatment with intrathymic donor MHC class I antigens. *Transplantation* **55**, 1396-402.

Oluwole, S. F., Chowdhury, N. C., Ingram, M., Garrovillo, M., Jin, M. X. and Agrawal, S. (1999). Mechanism of acquired thymic tolerance induced by a single major histocompatibility complex class I peptide with the dominant epitope: differential analysis of regulatory cytokines in the lymphoid and intragraft compartments. *Transplantation* **68**, 418-29.

Oluwole, S. F., Chowdhury, N. C., Jin, M. X. and Hardy, M. A. (1993c). Induction of transplantation tolerance to rat cardiac allografts by intrathymic inoculation of allogeneic soluble peptides. *Transplantation* **56**, 1523-7.

Oluwole, S. F., Jin, M. X., Chowdhury, N. C., James, T. and Fawwaz, R. A. (1993d). Induction of specific unresponsiveness to rat islet allografts by intrathymic UVB donor spleen cells. *Transplantation* **56**, 1142-7.

Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M. A., Ohteki, T., Jarrossay, D. and Manz, M. G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* **8**, 1207-16.

O'Rourke, R. W., Kang, S. M., Lower, J. A., Feng, S., Ascher, N. L., Baekkeskov, S. and Stock, P. G. (2000). A dendritic cell line genetically modified to express CTLA4-IG as a means to prolong islet allograft survival. *Transplantation* **69**, 1440-6.

Otterbein, L. E., Bach, F. H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R. J., Flavell, R. A. and Choi, A. M. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects

involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* **6**, 422-8.

Otterbein, L. E., Soares, M. P., Yamashita, K. and Bach, F. H. (2003). Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* **24**, 449-55.

Ouabed, A., Hubert, F. X., Chabannes, D., Gautreau, L., Heslan, M. and Josien, R. (2008). Differential Control of T Regulatory Cell Proliferation and Suppressive Activity by Mature Plasmacytoid versus Conventional Spleen Dendritic Cells. *J Immunol* **180**, 5862-70.

- P -

Pae, H. O., Oh, G. S., Choi, B. M., Chae, S. C., Kim, Y. M., Chung, K. R. and Chung, H. T. (2004). Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol* **172**, 4744-51.

Palomeque, J., Chemaly, E. R., Colosi, P., Wellman, J. A., Zhou, S., Del Monte, F. and Hajjar, R. J. (2007). Efficiency of eight different AAV serotypes in transducing rat myocardium in vivo. *Gene Ther* **14**, 989-97.

Parker, D. C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* **11**, 331-60.

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.

Peche, H., Trinite, B., Martinet, B. and Cuturi, M. C. (2005). Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors. *Am J Transplant* **5**, 255-67.

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**, 1079-88.

Perheentupa, J. (2002). APS-I/APECED: the clinical disease and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* **31**, 295-320, vi.

Petry, H., Brooks, A., Orme, A., Wang, P., Liu, P., Xie, J., Kretschmer, P., Qian, H. S., Hermiston, T. W. and Harkins, R. N. (2008). Effect of viral dose on neutralizing antibody response and transgene expression after AAV1 vector re-administration in mice. *Gene Ther* **15**, 54-60.

Philpott, N. J., Gomos, J., Berns, K. I. and Falck-Pedersen, E. (2002). A p5 integration efficiency element mediates Rep-dependent integration into AAVS1 at chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12381-5.

Piccirillo, C. A., Letterio, J. J., Thornton, A. M., McHugh, R. S., Mamura, M., Mizuhara, H. and Shevach, E. M. (2002). CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* **196**, 237-46.

Piccirillo, C. A. and Shevach, E. M. (2001). Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* **167**, 1137-40.

Pinchuk, L. M., Grouard-Vogel, G., Magaletti, D. M., Doty, R. T., Andrews, R. G. and Clark, E. A. (1999). Isolation and characterization of macaque dendritic cells from CD34(+) bone marrow progenitors. *Cell Immunol* **196**, 34-40.

Plotkin, J., Prockop, S. E., Lepique, A. and Petrie, H. T. (2003). Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol* **171**, 4521-7.

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**, 9493-501.

Porritt, H. E., Gordon, K. and Petrie, H. T. (2003). Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J Exp Med* **198**, 957-62.

Porter, C. M., Horvath-Arcidiacono, J. A., Singh, A. K., Horvath, K. A., Bloom, E. T. and Mohiuddin, M. M. (2007). Characterization and expansion of baboon CD4+CD25+ Treg cells for potential use in a non-human primate xenotransplantation model. *Xenotransplantation* **14**, 298-308.

Porteus, M. H., Connelly, J. P. and Pruett, S. M. (2006). A look to future directions in gene therapy research for monogenic diseases. *PLoS Genet* **2**, e133.

Posselt, A. M., Barker, C. F., Friedman, A. L. and Naji, A. (1992). Prevention of autoimmune diabetes in the BB rat by intrathymic islet transplantation at birth. *Science* **256**, 1321-4.

Posselt, A. M., Barker, C. F., Tomaszewski, J. E., Markmann, J. F., Choti, M. A. and Naji, A. (1990). Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation. *Science* **249**, 1293-5.

Powrie, F., Carlino, J., Leach, M. W., Mauze, S. and Coffman, R. L. (1996). A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med* **183**, 2669-74.

Pu, L. Y., Wang, X. H., Zhang, F., Li, X. C., Yao, A. H., Yu, Y., Lv, L. and Li, G. Q. (2007). Adoptive transfusion of ex vivo donor alloantigen-stimulated CD4(+)CD25(+) regulatory T cells ameliorates rejection of DA-to-Lewis rat liver transplantation. *Surgery* **142**, 67-73.

Puppi, J., Guillonnet, C., Pichard, V., Bellodi-Privato, M., Cuturi, M. C., Anegón, I. and Ferry, N. (2004). Long term transgene expression by hepatocytes transduced with retroviral vectors requires induction of immune tolerance to the transgene. *J Hepatol* **41**, 222-8.

- Q/R -

Qian, C., An, H., Yu, Y., Liu, S. and Cao, X. (2007). TLR agonists induce regulatory dendritic cells to recruit Th1 cells via preferential IP-10 secretion and inhibit Th1 proliferation. *Blood* **109**, 3308-15.

Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G. P., Wilson, J. M. and Batshaw, M. L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* **80**, 148-58.

Raper, S. E., Yudkoff, M., Chirmule, N., Gao, G. P., Nunes, F., Haskal, Z. J., Furth, E. E., Probert, K. J., Robinson, M. B., Magosin, S. et al. (2002). A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Gene Ther* **13**, 163-75.

Rastellini, C., Lu, L., Ricordi, C., Starzl, T. E., Rao, A. S. and Thomson, A. W. (1995). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-stimulated hepatic dendritic cell progenitors prolong pancreatic islet allograft survival. *Transplantation* **60**, 1366-70.

Rea, D., Schagen, F. H., Hoebe, R. C., Mehtali, M., Havenga, M. J., Toes, R. E., Melief, C. J. and Offringa, R. (1999). Adenoviruses activate human dendritic cells without polarization toward a T-helper type 1-inducing subset. *J Virol* **73**, 10245-53.

Read, S., Malmstrom, V. and Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* **192**, 295-302.

Rehman, K. K., Wang, Z., Bottino, R., Balamurugan, A. N., Trucco, M., Li, J., Xiao, X. and Robbins, P. D. (2005). Efficient gene delivery to human and rodent islets with double-stranded (ds) AAV-based vectors. *Gene Ther* **12**, 1313-23.

Reichert, R. A., Weissman, I. L. and Butcher, E. C. (1986). Phenotypic analysis of thymocytes that express homing receptors for peripheral lymph nodes. *J Immunol* **136**, 3521-8.

Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* **6**, 476-83.

Ren, C., Kumar, S., Shaw, D. R. and Ponnazhagan, S. (2005). Genomic stability of self-complementary adeno-associated virus 2 during early stages of transduction in mouse muscle in vivo. *Hum Gene Ther* **16**, 1047-57.

Ribot, J., Enault, G., Pilipenko, S., Hucheng, A., Calise, M., Hudrisier, D., Romagnoli, P. and van Meerwijk, J. P. (2007). Shaping of the autoreactive regulatory T cell repertoire by thymic cortical positive selection. *J Immunol* **179**, 6741-8.

Risueno, R. M., van Santen, H. M. and Alarcon, B. (2006). A conformational change senses the strength of T cell receptor-ligand interaction during thymic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9625-30.

Rivera, V. M., Gao, G. P., Grant, R. L., Schnell, M. A., Zoltick, P. W., Rozamus, L. W., Clackson, T. and Wilson, J. M. (2005). Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* **105**, 1424-30.

Riviere, C., Danos, O. and Douar, A. M. (2006). Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. *Gene Ther* **13**, 1300-8.

Rodino-Klapac, L. R., Janssen, P. M., Montgomery, C. L., Coley, B. D., Chicoine, L. G., Clark, K. R. and Mendell, J. R. (2007). A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Transl Med* **5**, 45.

Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K. and Levings, M. K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* **212**, 28-50.

Rudich, S. M., Zhou, S., Srivastava, R., Escobedo, J. A., Perez, R. V. and Manning, W. C. (2000). Dose response to a single intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus-erythropoietin in monkeys. *J Surg Res* **90**, 102-8.

Ruggenti, P., Perico, N., Gotti, E., Cravedi, P., D'Agati, V., Gagliardini, E., Abbate, M., Gaspari, F., Cattaneo, D., Noris, M. et al. (2007). Sirolimus versus cyclosporine therapy increases circulating regulatory T cells, but does not protect renal transplant patients given alemtuzumab induction from chronic allograft injury. *Transplantation* **84**, 956-64.

Ryter, S. W., Alam, J. and Choi, A. M. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* **86**, 583-650.

- S -

Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* **6**, 345-52.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**, 1151-64.

Samakoglu, S., Bohl, D. and Heard, J. M. (2002). Mechanisms leading to sustained reversion of beta-thalassemia in mice by doxycycline-controlled Epo delivery from muscles. *Mol Ther* **6**, 793-803.

Samulski, R. J., Chang, L. S. and Shenk, T. (1987). A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J Virol* **61**, 3096-101.

Sarukhan, A., Camugli, S., Gjata, B., von Boehmer, H., Danos, O. and Jooss, K. (2001). Successful interference with cellular immune responses to immunogenic proteins encoded by recombinant viral vectors. *J Virol* **75**, 269-77.

Sato, K., Yamashita, N., Baba, M. and Matsuyama, T. (2003). Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood* **101**, 3581-9.

Sayegh, M. H., Perico, N., Imberti, O., Hancock, W. W., Carpenter, C. B. and Remuzzi, G. (1993). Thymic recognition of class II major histocompatibility complex alloptides induces donor-specific unresponsiveness to renal allografts. *Transplantation* **56**, 461-5.

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**, 110-7.

Schmidt, M., Grot, E., Cervenka, P., Wainer, S., Buck, C. and Chiorini, J. A. (2006). Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks. *J Virol* **80**, 5082-5.

Schmidt, M., Voutetakis, A., Afione, S., Zheng, C., Mandikian, D. and Chiorini, J. A. (2008). Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *J Virol* **82**, 1399-406.

Schnepp, 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**, 14793-803.

Schulz, O., Edwards, A. D., Schito, M., Aliberti, J., Manickasingham, S., Sher, A. and Reis e Sousa, C. (2000). CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* **13**, 453-62.

Schwartz, R. H. (1996). Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* **184**, 1-8.

Schwartz, R. H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol* **21**, 305-34.

Scollay, R., Smith, J. and Stauffer, V. (1986). Dynamics of early T cells: prothymocyte migration and proliferation in the adult mouse thymus. *Immunol Rev* **91**, 129-57.

Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S. I., Nanan, R. et al. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* **203**, 1693-700.

Shevach, E. M. (2002). CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* **2**, 389-400.

Shevach, E. M. (2006). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* **25**, 195-201.

Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y. and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* **3**, 135-42.

Shortman, K. and Naik, S. H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* **7**, 19-30.

Smyth, M. J., Kelly, J. M., Sutton, V. R., Davis, J. E., Browne, K. A., Sayers, T. J. and Trapani, J. A. (2001). Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins. *J Leukoc Biol* **70**, 18-29.

Snyder, R. O., Spratt, S. K., Lagarde, C., Bohl, D., Kaspar, B., Sloan, B., Cohen, L. K. and Danos, O. (1997). Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum Gene Ther* **8**, 1891-900.

Soares, M. P., Lin, Y., Anrather, J., Csizmadia, E., Takigami, K., Sato, K., Grey, S. T., Colvin, R. B., Choi, A. M., Poss, K. D. et al. (1998). Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* **4**, 1073-7.

Song, S., Embury, J., Laipis, P. J., Berns, K. I., Crawford, J. M. and Flotte, T. R. (2001). Stable therapeutic serum levels of human alpha-1 antitrypsin (AAT) after portal vein injection of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther* **8**, 1299-306.

Song, S., Morgan, M., Ellis, T., Poirier, A., Chesnut, K., Wang, J., Brantly, M., Muzyczka, N., Byrne, B. J., Atkinson, M. et al. (1998). Sustained secretion of human alpha-1-antitrypsin from murine muscle transduced with adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14384-8.

Srivastava, A., Lusby, E. W. and Berns, K. I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* **45**, 555-64.

Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J. and Enk, A. H. (2002). CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* **99**, 2468-76.

Steinbrink, K., Jonuleit, H., Muller, G., Schuler, G., Knop, J. and Enk, A. H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* **93**, 1634-42.

Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445-9.

Su, L. T., Gopal, K., Wang, Z., Yin, X., Nelson, A., Kozyak, B. W., Burkman, J. M., Mitchell, M. A., Low, D. W., Bridges, C. R. et al. (2005). Uniform scale-independent gene transfer to striated muscle after transvenular extravasation of vector. *Circulation* **112**, 1780-8.

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**, 1438-45.

Suzuki, H., Kundig, T. M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schmits, R., Simard, J. J., Ohashi, P. S., Griesser, H. et al. (1995). Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* **268**, 1472-6.

- T -

Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L. and Singer, A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* **6**, 152-62.

Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* **6**, 127-35.

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J. and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* **10**, 1969-80.

Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T. W. and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* **192**, 303-10.

Takayama, T., Nishioka, Y., Lu, L., Lotze, M. T., Tahara, H. and Thomson, A. W. (1998). Retroviral delivery of viral interleukin-10 into myeloid dendritic cells markedly inhibits their allostimulatory activity and promotes the induction of T-cell hyporesponsiveness. *Transplantation* **66**, 1567-74.

Tan, P. H., Beutelspacher, S. C., Xue, S. A., Wang, Y. H., Mitchell, P., McAlister, J. C., Larkin, D. F., McClure, M. O., Stauss, H. J., Ritter, M. A. et al. (2005). Modulation of human dendritic-cell function following transduction with viral vectors: implications for gene therapy. *Blood* **105**, 3824-32.

Taner, T., Hackstein, H., Wang, Z., Morelli, A. E. and Thomson, A. W. (2005). Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival. *Am J Transplant* **5**, 228-36.

Tang, Q., Henriksen, K. J., Bi, M., Finger, E. B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E. L., McDevitt, H., Bonyhadi, M. and Bluestone, J. A. (2004). In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* **199**, 1455-65.

Tarbell, K. V., Petit, L., Zuo, X., Toy, P., Luo, X., Mqadmi, A., Yang, H., Suthanthiran, M., Mojsov, S. and Steinman, R. M. (2007). Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4⁺ CD25⁺ CD62L⁺ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med* **204**, 191-201.

Tarbell, K. V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P. and Steinman, R. M. (2004). CD25⁺ CD4⁺ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* **199**, 1467-77.

Taylor, P. A., Lees, C. J. and Blazar, B. R. (2002). The infusion of ex vivo activated and expanded CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* **99**, 3493-9.

Teleshova, N., Jones, J., Kenney, J., Purcell, J., Bohm, R., Gettie, A. and Pope, M. (2004). Short-term Flt3L treatment effectively mobilizes functional macaque dendritic cells. *J Leukoc Biol* **75**, 1102-10.

Tenhunen, R., Marver, H. S. and Schmid, R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**, 748-55.

Thornton, A. M., Donovan, E. E., Piccirillo, C. A. and Shevach, E. M. (2004). Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. *J Immunol* **172**, 6519-23.

Thornton, A. M. and Shevach, E. M. (1998). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* **188**, 287-96.

Tian, L., Lu, L., Yuan, Z., Lamb, J. R. and Tam, P. K. (2004). Acceleration of apoptosis in CD4⁺CD8⁺ thymocytes by rapamycin accompanied by increased CD4⁺CD25⁺ T cells in the periphery. *Transplantation* **77**, 183-9.

Topham, D. J., Tripp, R. A. and Doherty, P. C. (1997). CD8⁺ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. *J Immunol* **159**, 5197-200.

Tracz, M. J., Juncos, J. P., Grande, J. P., Croatt, A. J., Ackerman, A. W., Rajagopalan, G., Knutson, K. L., Badley, A. D., Griffin, M. D., Alam, J. et al. (2007). Renal hemodynamic, inflammatory, and apoptotic responses to lipopolysaccharide in HO-1^{-/-} mice. *Am J Pathol* **170**, 1820-30.

Trani, J., Moore, D. J., Jarrett, B. P., Markmann, J. W., Lee, M. K., Singer, A., Lian, M. M., Tran, B., Caton, A. J. and Markmann, J. F. (2003). CD25⁺ immunoregulatory CD4 T cells mediate acquired central transplantation tolerance. *J Immunol* **170**, 279-86.

Trenado, A., Charlotte, F., Fisson, S., Yagello, M., Klatzmann, D., Salomon, B. L. and Cohen, J. L. (2003). Recipient-type specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells favor

immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest* **112**, 1688-96.

Trenado, A., Sudres, M., Tang, Q., Maury, S., Charlotte, F., Gregoire, S., Bonyhadi, M., Klatzmann, D., Salomon, B. L. and Cohen, J. L. (2006). Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells. *J Immunol* **176**, 1266-73.

Turnquist, H. R., Raimondi, G., Zahorchak, A. F., Fischer, R. T., Wang, Z. and Thomson, A. W. (2007). Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol* **178**, 7018-31.

- U/V -

Ueno, T., Saito, F., Gray, D. H., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R. L. and Takahama, Y. (2004). CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* **200**, 493-505.

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**, 1935-43.

Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H. and Hillen, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7963-8.

van Santen, H. M., Benoist, C. and Mathis, D. (2004). Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med* **200**, 1221-30.

Vandenberghe, L. H. and Wilson, J. M. (2007). AAV as an immunogen. *Curr Gene Ther* **7**, 325-33.

Verhasselt, V., Vosters, O., Beuneu, C., Nicaise, C., Stordeur, P. and Goldman, M. (2004). Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur J Immunol* **34**, 762-72.

Veron, P., Allo, V., Riviere, 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**, 5385-94.

Vieira, P., de Waal-Malefyt, R., Dang, M. N., Johnson, K. E., Kastelein, R., Fiorentino, D. F., deVries, J. E., Roncarolo, M. G., Mosmann, T. R. and Moore, K. W. (1991). Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1172-6.

Vieira, P. L., de Jong, E. C., Wierenga, E. A., Kapsenberg, M. L. and Kalinski, P. (2000). Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol* **164**, 4507-12.

Vincent-Lacaze, N., Snyder, R. O., Gluzman, R., Bohl, D., Lagarde, C. and Danos, O. (1999). Structure of adeno-associated virus vector DNA following transduction of the skeletal muscle. *J Virol* **73**, 1949-55.

- W -

Walker, M. R., Kasproicz, D. J., Gersuk, V. H., Benard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J. H. and Ziegler, S. F. (2003). Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory

activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. *J Clin Invest* **112**, 1437-43.

Walters, R. W., Yi, S. M., Keshavjee, S., Brown, K. E., Welsh, M. J., Chiorini, J. A. and Zabner, J. (2001). Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J Biol Chem* **276**, 20610-6.

Wang, L., Cao, O., Swalm, B., Dobrzynski, E., Mingozi, F. and Herzog, R. W. (2005a). Major role of local immune responses in antibody formation to factor IX in AAV gene transfer. *Gene Ther* **12**, 1453-64.

Wang, L., Dobrzynski, E., Schlachterman, A., Cao, O. and Herzog, R. W. (2005b). Systemic protein delivery by muscle-gene transfer is limited by a local immune response. *Blood* **105**, 4226-34.

Wang, Z., Allen, J. M., Riddell, S. R., Gregorevic, P., Storb, R., Tapscott, S. J., Chamberlain, J. S. and Kuhr, C. S. (2007a). Immunity to adeno-associated virus-mediated gene transfer in a random-bred canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* **18**, 18-26.

Wang, Z., Hong, J., Sun, W., Xu, G., Li, N., Chen, X., Liu, A., Xu, L., Sun, B. and Zhang, J. Z. (2006). Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4⁺CD25⁻ T cells to CD4⁺ Tregs. *J Clin Invest* **116**, 2434-41.

Wang, Z., Kuhr, C. S., Allen, J. M., Blankinship, M., Gregorevic, P., Chamberlain, J. S., Tapscott, S. J. and Storb, R. (2007b). Sustained AAV-mediated Dystrophin Expression in a Canine Model of Duchenne Muscular Dystrophy with a Brief Course of Immunosuppression. *Mol Ther* **15**, 1160-1166.

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**, 2105-11.

Wang, Z., Zhu, T., Qiao, C., Zhou, L., Wang, B., Zhang, J., Chen, C., Li, J. and Xiao, X. (2005c). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol* **23**, 321-8.

Warrington, K. H., Jr. and Herzog, R. W. (2006). Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Hum Genet* **119**, 571-603.

Watanabe, N., Wang, Y. H., Lee, H. K., Ito, T., Cao, W. and Liu, Y. J. (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature* **436**, 1181-5.

Weindler, F. W. and Heilbronn, R. (1991). A subset of herpes simplex virus replication genes provides helper functions for productive adeno-associated virus replication. *J Virol* **65**, 2476-83.

Wilson, N. S., El-Sukkari, D. and Villadangos, J. A. (2004). Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood* **103**, 2187-95.

Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D. and Kleinschmidt, J. A. (1997). Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol* **71**, 1341-52.

Woodle, E. S., Xu, D., Zivin, R. A., Auger, J., Charette, J., O'Laughlin, R., Peace, D., Jolliffe, L. K., Haverty, T., Bluestone, J. A. et al. (1999). Phase I trial of a humanized, Fc receptor nonbinding OKT3 antibody, huOKT3gamma1(Ala-Ala) in the treatment of acute renal allograft rejection. *Transplantation* **68**, 608-16.

Wu, J., Zhao, W., Zhong, L., Han, Z., Li, B., Ma, W., Weigel-Kelley, K. A., Warrington, K. H. and Srivastava, A. (2007). Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity. *Hum Gene Ther* **18**, 171-82.

Wu, Z., Sun, J., Zhang, T., Yin, C., Yin, F., Van Dyke, T., Samulski, R. J. and Monahan, P. E. (2008). Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of hemophilia B at low vector dose. *Mol Ther* **16**, 280-9.

Wyde, P. R., Wilson, M. R. and Cate, T. R. (1982). Interferon production by leukocytes infiltrating the lungs of mice during primary influenza virus infection. *Infect Immun* **38**, 1249-55.

- X -

Xiao, W., Chirmule, N., Berta, S. C., McCullough, B., Gao, G. and Wilson, J. M. (1999). Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* **73**, 3994-4003.

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**, 2224-32.

Xin, K. Q., Mizukami, H., Urabe, M., Toda, Y., Shinoda, K., Yoshida, A., Oomura, K., Kojima, Y., Ichino, M., Klinman, D. et al. (2006). Induction of robust immune responses against human immunodeficiency virus is supported by the inherent tropism of adeno-associated virus type 5 for dendritic cells. *J Virol* **80**, 11899-910.

Xue, H. H., Kovanen, P. E., Pise-Masison, C. A., Berg, M., Radovich, M. F., Brady, J. N. and Leonard, W. J. (2002). IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13759-64.

- Y -

Yalkinoglu, A. O., Heilbronn, R., Burkle, A., Schlehofer, J. R. and zur Hausen, H. (1988). DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res* **48**, 3123-9.

Yamashita, K., Ollinger, R., McDaid, J., Sakahama, H., Wang, H., Tyagi, S., Csizmadia, E., Smith, N. R., Soares, M. P. and Bach, F. H. (2006). Heme oxygenase-1 is essential for and promotes tolerance to transplanted organs. *Faseb J* **20**, 776-8.

Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K. and Steinman, R. M. (2003). Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* **198**, 235-47.

Yamazaki, S., Patel, M., Harper, A., Bonito, A., Fukuyama, H., Pack, M., Tarbell, K. V., Talmor, M., Ravetch, J. V., Inaba, K. et al. (2006). Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2758-63.

Yang, G. S., Schmidt, M., Yan, Z., Lindbloom, J. D., Harding, T. C., Donahue, B. A., Engelhardt, J. F., Kotin, R. and Davidson, B. L. (2002). Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol* **76**, 7651-60.

Yokoi, K., Kachi, S., Zhang, H. S., Gregory, P. D., Spratt, S. K., Samulski, R. J. and Campochiaro, P. A. (2007). Ocular gene transfer with self-complementary AAV vectors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 3324-8.

Yuasa, K., Sakamoto, M., Miyagoe-Suzuki, Y., Tanouchi, A., Yamamoto, H., Li, J., Chamberlain, J. S., Xiao, X. and Takeda, S. (2002). Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product. *Gene Ther* **9**, 1576-88.

Yuasa, K., Yoshimura, M., Urasawa, N., Ohshima, S., Howell, J. M., Nakamura, A., Hijikata, T., Miyagoe-Suzuki, Y. and Takeda, S. (2007). Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene Ther* **14**, 1249-60.

- Z -

Zahorchak, A. F., Kean, L. S., Tokita, D., Turnquist, H. R., Abe, M., Finke, J., Hamby, K., Rigby, M. R., Larsen, C. P. and Thomson, A. W. (2007). Infusion of stably immature monocyte-derived dendritic cells plus CTLA4Ig modulates alloimmune reactivity in rhesus macaques. *Transplantation* **84**, 196-206.

Zaiss, A. K., Cotter, M. J., White, L. R., Clark, S. A., Wong, N. C., 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**, 2727-40.

Zaiss, A. K., Liu, Q., Bowen, G. P., Wong, N. C., Bartlett, J. S. and Muruve, D. A. (2002). Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* **76**, 4580-90.

Zhang, G., Ludtke, J. J., Thioudellet, C., Kleinpeter, P., Antoniou, M., Herweijer, H., Braun, S. and Wolff, J. A. (2004a). Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* **15**, 770-82.

Zhang, M., Tang, H., Guo, Z., An, H., Zhu, X., Song, W., Guo, J., Huang, X., Chen, T., Wang, J. et al. (2004b). Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat Immunol* **5**, 1124-33.

Zhang, N., Clement, N., Chen, D., Fu, S., Zhang, H., Rebollo, P., Linden, R. M. and Bromberg, J. S. (2005). Transduction of pancreatic islets with pseudotyped adeno-associated virus: effect of viral capsid and genome conversion. *Transplantation* **80**, 683-90.

Zhang, T. P., Jin, D. Y., Wardrop, R. M., 3rd, Gui, T., Maile, R., Frelinger, J. A., Stafford, D. W. and Monahan, P. E. (2007). Transgene expression levels and kinetics determine risk of humoral immune response modeled in factor IX knockout and missense mutant mice. *Gene Ther* **14**, 429-40.

Zorn, E., Nelson, E. A., Mohseni, M., Porcheray, F., Kim, H., Litsa, D., Bellucci, R., Raderschall, E., Canning, C., Soiffer, R. J. et al. (2006). IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* **108**, 1571-9.

Zuklys, S., Balciunaite, G., Agarwal, A., Fasler-Kan, E., Palmer, E. and Hollander, G. A. (2000). Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *J Immunol* **165**, 1976-83.

Etudes préliminaires pour l'induction d'une tolérance centrale et périphérique dans un modèle de transfert de gènes chez le primate non humain

Les vecteurs AAVr (Adeno-Associated Virus recombinants) sont aujourd'hui des outils pertinents en thérapie génique. Cependant, l'efficacité du transfert de gènes chez les primates non-humains est atténuée par le développement d'une réponse immunitaire cytotoxique contre le produit du transgène. Cette thèse a eu pour objectif d'étudier l'induction d'une tolérance vis-à-vis du produit du transgène par deux approches différentes. Le premier projet consiste à induire une tolérance centrale en injectant des vecteurs viraux contenant le transgène par voie intra-thymique (IT). Contrairement aux souris, l'administration de vecteurs lentiviraux ne permet pas de transduire le thymus. A l'inverse, l'injection IT d'AAVr entraîne l'expression du transgène dans le thymus simien mais sans induire de tolérance. Dans le second projet, nous avons développé des protocoles visant à induire une tolérance périphérique chez le macaque à l'aide de cellules dendritiques (CD) tolérogènes et des cellules T régulatrices (Treg). Nous montrons que la protéine HO-1, exprimée par les CD immatures, est indispensable à l'activité tolérogène de ces CD *in vitro* (chez le singe et le rat) et *in vivo* (chez le rat). De plus, parmi plusieurs CD d'origines et de stades de maturation différents, nos résultats indiquent que les CD semi-matures dérivées de la moelle osseuse sont les plus efficaces pour l'expansion des Treg. Enfin, nous montrons que la génération de CD en présence d'IL-10 accroît leur activité tolérogène. La fonction de ces iBMDC10 *in vivo* est en cours d'étude dans notre modèle de réponse immunitaire suite à un transfert de gènes chez le macaque.

Mots clés : tolérance centrale et périphérique - transfert de gènes – thymus – cellules dendritiques tolérogènes – cellules Treg naturelles – vecteurs AAVr

Study of necessary elements for the induction of central and peripheral tolerance in a model of gene transfer in non-human primate

rAAV vectors (recombinant Adeno-Associated Virus) allow efficient gene transfer. However, as shown in our laboratory and by others, the efficacy of gene transfer in monkeys is inhibited by the development of a cytotoxic immune response towards the transgene product. In this topic, the aim of this thesis is to develop elements for the induction of a tolerance to the transgene product. Two systems were used. The aim of the first project is to induce central tolerance using viral vectors containing the transgene by intra-thymic route (IT). In contrast to mice results, administration of lentiviral vector in the monkey by IT route do not transduce the thymus. Injection of rAAV vectors by IT route lead to a transduction of the thymus but do not induce tolerance. In the second system, we wanted to induce peripheral tolerance using tolerogenic dendritic cells (DC) and natural regulatory T cells (Treg). Our results show that HO-1, which is a protein express by tolerogenic DC, allowed the tolerogénic activity of DC *in vitro* (in rats and monkeys) and *in vivo* (in rats). Furthermore, the comparison of the efficacy of DC population, different by their origins and their maturation state, showed that semi-mature derived Bone-Marrow DC is the most efficient DC population. Last, we show that IL-10 increased the tolerogenicity of DC. The tolerogenic activity of these iBMDC10 is now testing *in vivo* in our model of immune response after gene transfer in non-human primate.

Key words : central and peripheral tolerance – gene transfer – thymus – tolerogenic dendritic cells – natural Treg – rAAV vectors