



HAL
open science

Induction de réponses mémoires lymphocytaires T CD8 et protection vaccinale après transfert de gènes par le vecteur AAV recombinant

Alexandre Ghenassia

► **To cite this version:**

Alexandre Ghenassia. Induction de réponses mémoires lymphocytaires T CD8 et protection vaccinale après transfert de gènes par le vecteur AAV recombinant. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB028 . tel-01362956

HAL Id: tel-01362956

<https://theses.hal.science/tel-01362956>

Submitted on 9 Sep 2016

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

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



Université Paris Descartes

Ecole Doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC)

Laboratoire : Unité INSERM U1151-CNRS UMR 8253 – Institut Necker-Enfants Malades (INEM)

Equipe de recherche : Biologie des Lymphocytes T régulateurs et Applications en Biothérapie

Induction de réponses mémoires lymphocytaires T CD8 et protection vaccinale après transfert de gènes par le vecteur AAV recombinant

Par Alexandre Ghenassia

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par le Dr. Jean Davoust

Présentée et soutenue publiquement le vendredi 30 Octobre 2015

Devant un jury composé de :

Monsieur le Docteur Nicolas Bertho

Rapporteur

Monsieur le Docteur Sahil Adriouch

Rapporteur

Monsieur le Professeur Sylvain Fisson

Examineur

Madame le Docteur Anne-Marie Schmitt-Verhulst

Examineur

Monsieur le Docteur Pascal Chappert

Examineur

Monsieur le Docteur Jean Davoust

Directeur de thèse

Résumé

Induction de réponses mémoires lymphocytaires T CD8 et protection vaccinale après transfert de gènes par le vecteur AAV recombinant

La mémoire immunologique est le mécanisme biologique fondamental à la base du développement de la vaccination. La compréhension de ce mécanisme ainsi que de ses interactions avec les différents acteurs du système immunitaire a permis l'élaboration de vaccins qui sont aujourd'hui les garants d'une protection accrue face à l'émergence de maladies infectieuses potentiellement mortelles. La voie d'injection et le mode de transfert de ces vaccins sont des paramètres majeurs à prendre en considération car ils définissent une modulation des réponses immunitaires et de leurs spécificités d'action. De nos jours, seule la voie intramusculaire demeure la voie majoritaire d'administration de vaccins lors de la prophylaxie primaire en santé humaine.

Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés à comparer l'injection d'un antigène (l'ovalbumine) selon deux voies d'administration : la voie intramusculaire et la voie intradermique. Nous nous sommes également appuyés sur une technologie du laboratoire qui consiste à transférer des gènes par des vecteurs AAV2/1 recombinants. Nous disposions de deux constructions de ces vecteurs ayant une spécificité pour cibler les cellules musculaires et permettant l'apport d'un effet auxiliaire par les lymphocytes T CD4⁺ lors d'injections dans des souris femelles. De plus, une de ces constructions nous permettait d'éviter la voie de présentation directe de l'antigène par les DCs aux lymphocytes T CD8⁺. Les capacités modulatrices de ces vecteurs nous permirent de montrer pour la première fois que le vecteur AAV2/1 recombinant était capable de faire exprimer un transgène au sein de la peau et d'y générer une réponse cellulaire forte. Nous avons également montré qu'il existait une synergie d'action entre l'effet auxiliaire et la voie intradermique qui améliorait considérablement les réponses cellulaires issues de la présentation croisée d'antigène. Enfin, nous avons pu démontrer que les lymphocytes T CD8⁺ générés suite à cette synergie d'action présentaient un profil phénotypique de cellules mémoires polyfonctionnelles et capables de protéger l'hôte face à un challenge pathogénique.

Mots-clés : mémoire immunologique, vaccination, vecteur AAV recombinant, lymphocyte T CD8⁺ mémoire, voies de présentation d'antigène, voies d'administration, lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire.

Table des matières

Résumé	1
Table des matières	2
Liste des abréviations.....	5
Table des illustrations	8
INTRODUCTION.....	10
PREAMBULE : Le système immunitaire ou la quintessence dans les mécanismes assurant le maintien de l'intégrité cellulaire.....	11
A. Généralités.....	11
1. L'immunité innée	12
2. L'immunité adaptative	13
B. Initiation de la réponse primaire adaptative	13
CHAPITRE 1 : La mémoire immunologique : le lymphocyte T CD8⁺ mémoire, sa maintenance et ses interactions fonctionnelles.....	20
A. Considérations immunologiques	20
B. Les différentes populations de lymphocytes T CD8 ⁺ mémoires	21
1. Marqueurs phénotypiques et localisations.....	21
a. Caractérisation des deux grandes familles de cellules T CD8 ⁺ mémoires systémiques	21
i. CCR7 et CD62L.....	21
ii. IL-7R α (CD127)	22
iii. IL-15.....	24
iiii. CD44.....	25
v. KLRG1.....	26
b. Caractérisation de la famille de cellules T CD8 ⁺ mémoires résidentes des tissus périphériques	29
i. CD103	29
ii. CD69	31
c. Bilan	33
2. Modèles de différenciation	35
3. Evaluation du potentiel fonctionnel et de l'efficacité de protection.....	39
a. Les T _{EM} CD8 ⁺ et les T _{CM} CD8 ⁺	39
b. Les T _{RM} CD8 ⁺	44
C. Facteurs influençant l'établissement de la réponse mémoire T CD8 ⁺	47
1. Rôles du contexte inflammatoire.....	47

2. Rôles des lymphocytes T CD4 ⁺ auxiliaires	52
a. Impacts sur la mémoire T CD8 ⁺ systémique	52
b. Impacts sur la mémoire T CD8 ⁺ des tissus périphériques	54
CHAPITRE 2 : La vaccination et le développement de nouvelles approches immunologiques.....	58
A. Les différents types de vecteurs utilisés en vaccination	59
B. Les différentes voies d'administration en vaccination	63
1. La voie intramusculaire	64
a. Identification des cellules présentatrices d'antigène du muscle	64
b. Capacité d'induction de réponses immunitaires.....	65
2. La voie intradermique	66
a. Identification des cellules présentatrices d'antigène de la peau	67
b. Capacité d'induction de réponses immunitaires.....	70
C. Les vecteurs recombinants dérivés de l'AAV	72
1. Origine et caractéristiques de l'AAV sauvage	72
2. Caractéristiques des vecteurs AAV recombinants.....	78
a. Le vecteur	78
b. La capside.....	82
3. Induction de réponses immunitaires	85
a. L'immunité innée	86
b. L'immunité adaptative	87
i. Les réponses humorales contre la capside.....	87
ii. Les réponses cellulaires contre la capside.....	89
iii. Les réponses contre le produit du transgène	91
4. Utilisations en vaccination	96
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	100
RESULTATS	103
DISCUSSION	159
1. Potentialité de la voie intradermique pour l'utilisation des vecteurs AAV recombinants en vaccination	161
2. La peau, un site privilégié pour la présentation croisée de transgènes vaccinaux ?.....	163
3. Impact des réponses lymphocytaires T CD4 ⁺ dans la régulation des réponses primaires T CD8 ⁺ induites par un vecteur AAV recombinant vaccinal.....	164
4. Impact des réponses auxiliaires T CD4 ⁺ et du choix de la voie d'injection sur les réponses T CD8 ⁺ mémoires induites à l'aide d'un vecteur AAV recombinant vaccinal.....	166

5. Capacité des vecteurs AAV recombinants à induire des lymphocytes T résidents mémoires ?	168
6. Perspectives	170
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	173
ANNEXES.....	209

Liste des abréviations

AAV : Adeno-associated virus, virus adéno-associé

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2, lymphome à cellule B

CCRX : C-C chemokine receptor type X, récepteur aux chimiokines de type X de la famille CC (deux premières cystéines adjacentes)

CD : Cluster de différenciation

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CTL : Cytotoxic T lymphocyte, lymphocyte T CD8⁺ cytotoxique

DC : Dendritic cell, cellule dendritique

dDC : Dermal DC, DC dermique

F.IX : Facteur IX

Fc : Fragment cristallisable

GFP : Green fluorescent protein, protéine fluorescente verte

HA : Protéine de l'hémagglutinine du virus de la grippe

HLA : Human leukocyte antigen, antigène des leucocytes humains

HPV : Human papillomavirus, virus du papillome humain

HSV-1 or 2 : Herpes simplex virus type 1 or 2, virus de l'herpès de type 1 ou 2

IFN-X : Interféron X

IgX : Immunoglobuline de type X

IL-X : Interleukine X

IL-XR : Récepteur à l'interleukine X

ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

ITR : Inverted terminal repeat, répétition terminale inversée

kb : Kilobases

KLRG1 : Killer cell lectin-like receptor G1

LacZ : Gène de l'opéron lactose codant pour la β -galactosidase

LC : Epidermal Langerhans cell, cellule de Langerhans épidermique

LCMV : Lymphocytic choriomeningitis virus, virus de la chorioméningite lymphocytaire

Lm : *Listeria monocytogenes*

Lm-OVA : *Listeria monocytogenes* recombinante sécrétant l'OVA

LT : Lymphocyte T

LPS : Lipopolysaccharide

miR : MicroARN

MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88

Mo-DC : Monocyte-derived DC, DC dérivée de monocyte

NK : Natural killer, cellule tueuse naturelle

ORF : Open reading frame, cadre de lecture ouvert

OVA : Protéine du gène de l'ovalbumine

PAMP : Pathogen-associated molecular pattern, motif moléculaire associé au pathogène

Pgp-1 : Phagocytic glycoprotein-1

PRR : Pattern recognition receptor, récepteur de reconnaissance de motif

S1P : Sphingosine-1-phosphate

Th1 : Lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire de type 1

Th2 : Lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire de type 2

T_{CM} : Central memory T cell, cellule T mémoire centrale

T_{EM} : Effector memory T cell, cellule T mémoire effectrice

T_{RM} : Tissue-resident memory T cell, cellule T mémoire résidente du tissu

Treg : Regulatory T cell, cellule T régulatrice CD4⁺ CD25⁺

T-bet : T-box-expressed-in-T-cells

TCR : T-cell receptor, récepteur de la cellule T

TGF- β ₁ : Transforming growth factor beta 1, facteur de croissance transformant

TLR : Toll-like receptor, récepteur de type Toll

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha, facteur de nécrose tumorale

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VSV : Vesicular stomatitis virus, virus de la stomatite vésiculaire

VV : Vaccinia virus

Table des illustrations

<i>Figure 1 : Mécanismes intracellulaires de la présentation croisée d'antigène au sein des DCs.</i>	16
<i>Figure 2 : Activation d'un lymphocyte T CD8 par une DC.</i>	18
<i>Figure 3 : La réponse primaire adaptative conduit à l'édification de la mémoire immunologique.</i>	19
<i>Figure 4 : Mécanismes d'action de la signalisation par KLRG1 sur l'évolution phénotypique d'un lymphocyte T au cours de sa différenciation.</i>	28
<i>Figure 5 : Identification des familles de lymphocytes T CD8⁺ mémoires en fonction de leur phénotype et de leur localisation.</i>	33
<i>Figure 6 : Recirculation et sites de résidence des populations de lymphocytes T mémoires dans les tissus périphériques.</i>	34
<i>Figure 7 : Modèles décisionnels dans la destinée des cellules effectrices et mémoires au cours d'une infection virale aiguë.</i>	37
<i>Figure 8 : Corrélation entre la qualité des lymphocytes T CD8⁺ générés et la charge virale.</i>	41
<i>Figure 9 : L'inflammation parallèle à l'activation du lymphocyte T CD8⁺ régule le taux pour lequel les cellules T CD8⁺ induites acquièrent un potentiel prolifératif.</i>	50
<i>Figure 10 : Les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires participent à la formation des T_{RM} CD8⁺ du poumon.</i>	56
<i>Figure 11 : Exemples de vecteurs vaccinaux utilisés.</i>	61
<i>Figure 12 : Les différentes voies d'administration en vaccination.</i>	63
<i>Figure 13 : Phénotypes des cellules présentatrices d'antigène de la peau chez la souris en conditions physiologiques.</i>	69
<i>Figure 14 : Structure du génome de l'AAV sauvage.</i>	73
<i>Figure 15 : Arbre phylogénétique des différents sérotypes d'AAV.</i>	74
<i>Figure 16 : Représentation des organes préférentiellement ciblés par les différents sérotypes d'AAV.</i>	75
<i>Figure 17 : Homologies entre les séquences en acides aminés des capsides parmi les sérotypes d'AAV1 à AAV9.</i>	76
<i>Figure 18 : Cycle de vie du virus AAV.</i>	77

<i>Figure 19 : Modélisation de la structure du génome d'un vecteur AAV recombinant.</i>	78
<i>Figure 20 : Technique du trans-épissage.</i>	80
<i>Figure 21 : Mécanismes de transduction cellulaire opérés par un vecteur AAV recombinant classique et un vecteur AAV « self-complementary ».</i>	81
<i>Figure 22 : Modèles de modifications apportées aux capsides des vecteurs AAV recombinants.</i>	85
<i>Figure 23 : Mécanismes d'apprêtement et de présentation des antigènes dérivés d'un vecteur AAV recombinant au sein d'une CPA.</i>	93
<i>Figure 24 : Tableau récapitulatif des études basées sur l'utilisation des vecteurs AAV recombinants en vaccination.</i>	99
<i>Figure 25 : Un modèle unique d'étude des paramètres cellulaires et moléculaires régulant l'induction de lymphocytes T CD8⁺ mémoires à long terme suite à une vaccination par des vecteurs AAV recombinants.</i>	102
<i>Figure 26 : La réponse des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires contre l'antigène H-Y conditionne l'amplitude de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ contre le transgène OVA et son apparition précoce au cours de sa régulation par le miR-142-3p.</i>	106
<i>Tableau 1 : Evaluation des efficacités des sérotypes d'AAV dans la transduction de différents tissus.</i>	211

INTRODUCTION

PREAMBULE : Le système immunitaire ou la quintessence dans les mécanismes assurant le maintien de l'intégrité cellulaire

A. Généralités

Tout au long de notre vie, notre organisme est sans cesse assailli par des pathogènes ou agents infectieux plus ou moins virulents dont l'unique objectif est de déstabiliser et rompre notre intégrité cellulaire afin de favoriser leur survie au détriment de notre santé. De façon concomitante au développement de pathogènes de toute sorte, notre organisme s'est doté au cours de l'évolution de différentes stratégies de défense ayant chacune un rôle bien défini et participant au maintien global de notre santé.

Notre corps est totalement enveloppé de peau qui couvre une surface d'environ 2 m². Cet épithélium de revêtement est le premier à être en contact avec des organismes étrangers et représente une barrière de protection à la fois physique et mécanique. En effet, les cellules ou kératinocytes qui composent l'épiderme sont juxtaposées, riches en jonctions adhésives et jointives formant un maillage très resserré qui rend très difficile le passage depuis l'extérieur. Au sein de cet épithélium se trouvent également les glandes sébacées, basées dans le derme, spécialisées dans la sécrétion de sébum qui permet de recouvrir la peau d'un film protecteur. Enfin, la desquamation de l'épiderme représente également un moyen de renouveler sans cesse les kératinocytes et de former une couche de cellules mortes, le stratum corneum, qui représente un obstacle important résistant à l'infection par des corps étrangers qui pourraient tenter de s'introduire dans les couches plus profondes. Malgré cette première ligne de défense aérienne, certains pathogènes réussissent à la contourner et à se frayer un chemin atteignant le derme puis la circulation sanguine, et enfin les cellules qui composent les différents organes. Dès lors, une seconde ligne de défense minutieusement organisée entre en action pour parer à la propagation de l'infection : c'est **le système immunitaire**. Ce système repose sur la coopération très fine entre différents acteurs cellulaires appartenant à deux composantes, **l'immunité innée** et **l'immunité adaptative**, dont le rôle fondamental est de faire la distinction entre le soi et le non-soi.

1. L'immunité innée

L'immunité innée est la première composante du système immunitaire à s'engager dans la détection et l'éradication des agents infectieux. Cette immunité a pour caractéristiques d'être immédiate, peu spécifique et ubiquitaire. Au sein de cette immunité se trouvent différents acteurs cellulaires, les leucocytes encore appelés globules blancs, aux fonctions bien spécifiques. **Les polynucléaires neutrophiles** sont en général les premiers à entrer en action, participent aux mécanismes d'inactivation des agents infectieux par phagocytose et par projection de filets d'ADN (acide désoxyribonucléique). Ils sont recrutés sous l'influence de signaux inflammatoires au niveau des tissus et ils ont une action importante dans la régulation des réponses immunitaires car ils sécrètent de nombreuses cytokines qui vont moduler la nature de la réponse qui va intervenir. **Les polynucléaires éosinophiles** sont essentiellement impliqués dans l'élaboration des processus inflammatoires grâce à leurs sécrétions de cytokines pro-inflammatoires. **Les polynucléaires basophiles et les mastocytes** présents au niveau des muqueuses sont recrutés pour participer aux processus inflammatoires en alertant les autres composants du système immunitaire, causant parfois des désordres tels que l'hypersensibilité immédiate comme l'allergie. Leur capacité de dégranulation rapide leur permet de sécréter des molécules telles que l'histamine impliquée dans ces mécanismes. **Les macrophages**, qui dérivent de progéniteurs tissulaires d'origine embryonnaire mixte ainsi que de monocytes du sang, sont des cellules à haut potentiel phagocytaire qui happent toute cellule anormale sur leur passage. Ce sont également en quelque sorte les « charognards » de l'immunité innée car ils sont entre autre responsables de l'élimination des polynucléaires neutrophiles qui meurent par apoptose et dont l'ensemble se renouvelle totalement tous les deux jours, mais également de l'éradication de toute cellule apoptotique. Les macrophages sont essentiels dans le processus de l'hémolyse car ils interviennent dans la destruction des globules rouges au sein de la pulpe rouge de la rate. **Les monocytes** sont des cellules circulantes du sang qui participent fortement à la régulation des réponses immunitaires, tout comme les polynucléaires neutrophiles, puisqu'ils sécrètent de grosses quantités de cytokines et leur intervention au niveau du site de l'infection, sous la forme différenciée de macrophages, se fait quelques heures après celle des polynucléaires neutrophiles. **Les DCs (cellule dendritique)** sont des cellules spécialisées qui patrouillent au sein de l'organisme et qui sont à l'interface entre l'immunité innée et adaptative car ce sont elles qui sont responsables des mécanismes initiateurs de la réponse immunitaire adaptative. Je reviendrai

sur leur rôle dans la Partie B. de ce Préambule. **Les NKs (cellule tueuse naturelle)** sont des cellules qui scannent l'organisme à la recherche de toute cellule infectée ou tumorale qui a perdu la capacité d'expression des molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I, dans le but de la lyser spontanément par des processus de dégranulation libérant des protéines lytiques. Enfin, **le complément** est un complexe multiprotéique qui par un processus appelée opsonisation sécrète des opsonines qui vont venir recouvrir les parois des pathogènes pour en faciliter leur phagocytose par les cellules spécialisées telles que les macrophages.

2. L'immunité adaptative

L'immunité adaptative est la seconde composante du système immunitaire et elle est apparue au cours de l'évolution chez les vertébrés supérieurs il y a environ 500 millions d'années. Elle intervient en complément de l'immunité innée lorsque celle-ci n'est pas parvenue à endiguer l'infection qui prend de l'ampleur et menace de se propager au sein de tout l'organisme. En ce sens cette immunité n'est donc pas immédiate et nécessite de quatre à six jours pour être complètement opérationnelle. Contrairement à l'immunité innée, elle est spécifique et l'une de ses caractéristiques majeures est qu'elle est à l'origine de l'établissement de la mémoire immunologique, mécanisme fondamental qui sera largement discuté dans le Chapitre 1. La stabilité et le bon fonctionnement de cette immunité reposent principalement sur la communication entre trois principaux acteurs cellulaires : **les DCs, les lymphocytes T et les lymphocytes B.**

B. Initiation de la réponse primaire adaptative

Les DCs immatures sont des sentinelles qui résident dans les différents tissus de l'organisme qu'elles scannent en permanence à la recherche de corps étrangers ou fragments de cellule apoptotique pour les capturer par endocytose, phagocytose ou pinocytose. Dans le cas où ces particules sont solubles, les DCs initient leur capture par des mécanismes de micropinocytose ou macropinocytose. Dans certains cas, la capture participe au mécanisme d'induction de la maturation des DCs. Cette maturation peut aussi être déclenchée par la reconnaissance de signaux de « danger » ou PAMPs (motif moléculaire associé au pathogène) grâce aux PRRs

(récepteur de reconnaissance de motif) qu'arborent les DCs au niveau de leur surface comme les TLRs (récepteur de type Toll) et les CLRs (récepteur de lectine de type C), mais également au niveau de leurs endosomes pour certains TLRs, ou encore au niveau de leur cytosol comme les NLRs (récepteur de type NOD) et les RLRs (récepteur hélicoïdal à la protéine RIG-1). Ces interactions conduisent à une succession de cascades de signalisation au sein des DCs qui entreprennent alors des changements métaboliques et de morphologie qui résultent en une diminution de leur capacité phagocytaire et une augmentation d'expression à leur surface des molécules du CMH et de costimulation, afin de leur permettre d'assurer une nouvelle fonction, celle de CPAs (cellule présentatrice d'antigène) professionnelles. Elles vont alors migrer vers les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques proches du lieu de l'infection.

Les lymphocytes T matures sélectionnés dans le thymus se retrouvent également dans les ganglions lymphatiques. Leur particularité est d'arborer à leur surface de façon clonotypique un complexe appelé TCR (récepteur de la cellule T) dont les recombinaisons alléliques et mutations somatiques des fragments des chaînes moléculaires le constituant permettent de générer un répertoire très diversifié (10^{15} TCRs différents possibles dont 10^6 TCRs différents présents en périphérie chez la souris (Casrouge et al., 2000)). Ceci démontre le potentiel énorme de l'immunité adaptative pour la reconnaissance d'une très grande variété de pathogènes.

Les lymphocytes B matures, qui se développent eux directement dans la moelle osseuse, rejoignent également les ganglions lymphatiques. Ils expriment à leur surface de façon clonotypique un récepteur lui-même très diversifié appelé BCR (récepteur de la cellule B) qui est une Ig (immunoglobuline) de surface et qui a la particularité de pouvoir être sécrétée par la cellule sous forme d'anticorps.

Au cours de ma thèse, je me suis focalisé sur l'étude des lymphocytes T, et donc je n'aborderai les parties activation puis mémoire dans la suite de mon Introduction qu'en ce qui concerne uniquement cette population de l'immunité adaptative.

Au sein des ganglions lymphatiques, les DCs matures vont activer les lymphocytes T matures mais encore naïfs via des mécanismes de présentation antigénique. Pour initier l'activation des lymphocytes T, les DCs doivent présenter à leur surface un peptide antigénique sur des molécules du CMH de classe I ou de classe II. Si le peptide est d'origine endogène c'est-à-dire qu'il provient de la synthèse protéique effectuée au sein même des DCs puis du clivage par le protéasome de cette protéine, il sera alors apprêté (pas plus de 9 acides aminés) puis

chargé au sein du réticulum endoplasmique sur des molécules du CMH de classe I pour être présenté aux lymphocytes T CD (cluster de différenciation) 8 ; ce mécanisme est appelé **voie de présentation directe de l'antigène** par les molécules du CMH de classe I. Si le peptide est d'origine exogène c'est-à-dire issu de la lyse, au sein du phagosome/lysosome des DCs, d'une protéine provenant du milieu extracellulaire, il sera alors apprêté (entre 12 à 25 acides aminés) puis chargé sur des molécules du CMH de classe II pour être présenté aux lymphocytes T CD4 auxiliaires ; ce mécanisme est appelé voie de présentation de l'antigène par les molécules du CMH de classe II. Enfin, il a été montré qu'il existait une autre voie pour activer les lymphocytes T CD8. En effet, lorsqu'une protéine d'origine exogène est capturée par les DCs, elle peut également être adressée au protéasome et suivre le même cheminement qu'une protéine endogène conduisant à l'apprêtement et au chargement du peptide sur des molécules du CMH de classe I ; ce mécanisme est appelé **voie de présentation croisée de l'antigène** par les molécules du CMH de classe I. A noter que ce même mécanisme a été décrit comme pouvant également se dérouler au sein du compartiment endosome/lysosome des DCs sans nécessiter le passage de la protéine exogène par le protéasome et le réticulum endoplasmique (Pfeifer et al., 1993).

La figure ci-dessous récapitule les deux voies décrites de présentation croisée de l'antigène.

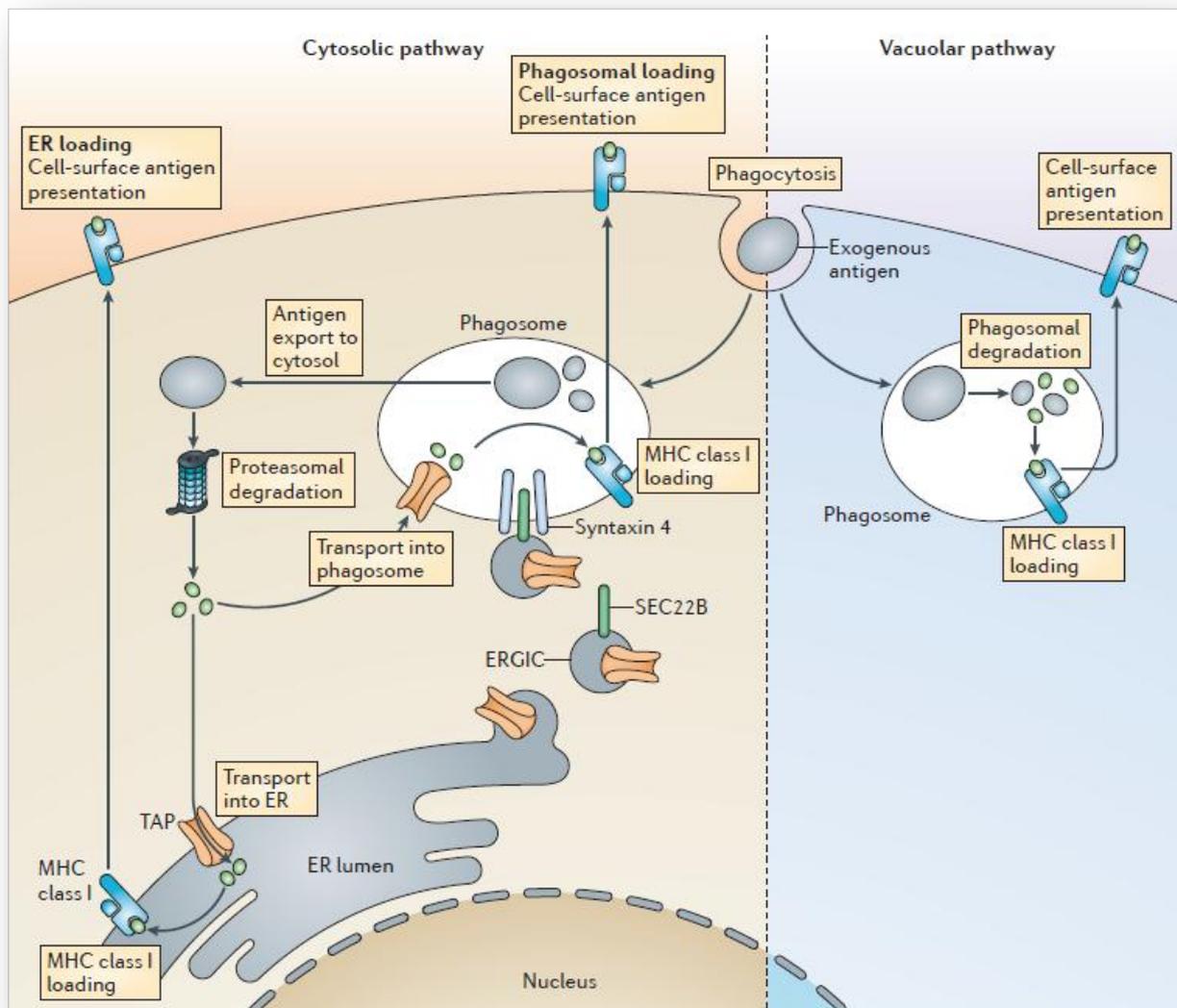


Figure 1 : Mécanismes intracellulaires de la présentation croisée d'antigène au sein des DCs.

A la suite de la phagocytose, les antigènes exogènes peuvent être exportés dans le cytosol, où ils vont être pris en charge par le protéasome. Une fois clivés, les antigènes peuvent être soit chargés sur les molécules du CMH de classe I à l'intérieur du réticulum endoplasmique (ER), c'est la voie cytosolique avec chargement dans l'ER ; soit réimportés au sein du phagosome pour être chargés sur les molécules du CMH de classe I, c'est la voie cytosolique avec chargement dans le phagosome. La protéine SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) SEC22B, qui se trouve au niveau du compartiment intermédiaire entre l'ER et le Golgi (ERGIC) et interagit avec la syntaxine 4 présente sur les phagosomes, permet le recrutement de composants de l'ER notamment de TAP (transporter associated with antigen processing) au sein des phagosomes. Une autre alternative consiste à ce que les antigènes exogènes soit dégradés en peptides directement dans le phagosome où ils sont ensuite chargés sur les molécules du CMH de classe I, c'est la voie vacuolaire. D'après *Joffre et al., Nature Reviews Immunology, 2012.*

Le lymphocyte T va commencer à s'activer en engageant son TCR avec un de ces complexes peptide/CMH (voir figure ci-dessous). Cette stimulation du TCR conduit au travers d'une cascade de signalisation à la formation d'une synapse immunologique entre le lymphocyte T CD8/CD4 et la DC (Dustin, 2004). Des expériences *in vivo* utilisant la microscopie à deux photons pour étudier la migration des lymphocytes T et leurs interactions avec les DCs au sein des ganglions lymphatiques ont montré que la synapse immunologique formée pouvait être maintenue entre 18 h et 24 h après la rencontre entre les deux types cellulaires (Mempel et al., 2004). L'équilibre quantitatif des signaux reçus par les lymphocytes T conditionne la nature de leur réponse au moment de leur activation et impacte à la fois le ratio et l'amplitude des futures populations de cellules mémoires (Mescher et al., 2006), points sur lesquels nous reviendrons plus en détails lors du Chapitre 1 de cette Introduction. A noter que l'activation des lymphocytes T CD4 auxiliaires conduit à générer une réponse primaire de type Th1 (lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires de type 1) à médiation cellulaire permettant la stimulation de la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺, et/ou une réponse primaire de type Th2 (lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires de type 2) à médiation humorale conduisant à la transformation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Il est cependant important de noter que si les DCs qui ont migré n'ont pas subi de modifications métaboliques et morphologiques suite à la reconnaissance de motifs pathogéniques, en d'autres termes qu'elles n'ont pas évolué vers un phénotype matures mais sont restées invariablement immatures, cela conduit à une induction de tolérance pour les lymphocytes T (Steinman and Nussenzweig, 2002). Cette dichotomie du stade de maturation chez les DCs représente un point névralgique dans la compréhension des mécanismes qui régissent la tolérance et l'immunité (Heath and Carbone, 2001a, 2001b; Moser, 2003).

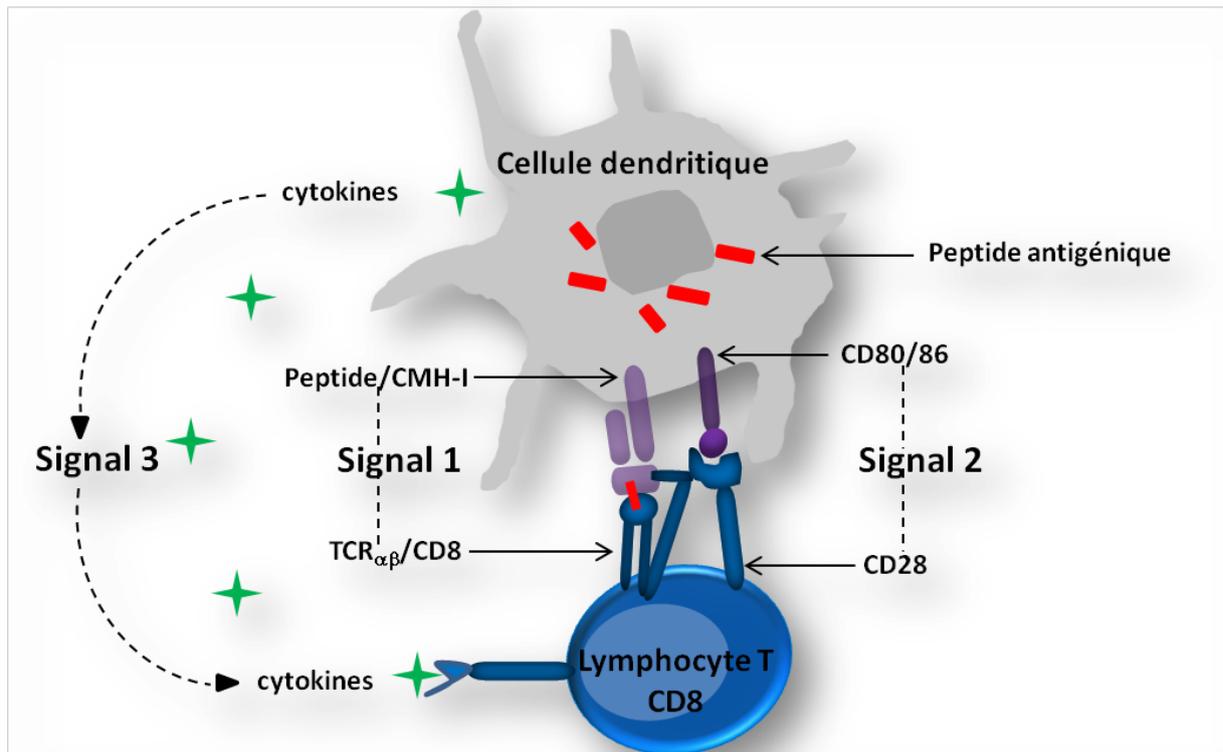


Figure 2 : Activation d'un lymphocyte T CD8 par une DC.

A la suite de leur maturation et de l'acquisition de l'antigène, la DC fournit les signaux nécessaires requis pour activer le lymphocyte T CD8 naïf. Ces signaux comprennent le Signal 1, la liaison entre le peptide/CMH-I et le TCR/CD8 ; le Signal 2, la liaison de costimulation entre les molécules CD80/86 et CD28 ; et le Signal 3, la sécrétion de cytokines telles que l'IL (interleukine)-12 et les IFNs (interféron) de type I.

Les différentes étapes de la réponse primaire adaptative conduisant à l'établissement de la mémoire immunologique sont représentées dans la figure ci-dessous.

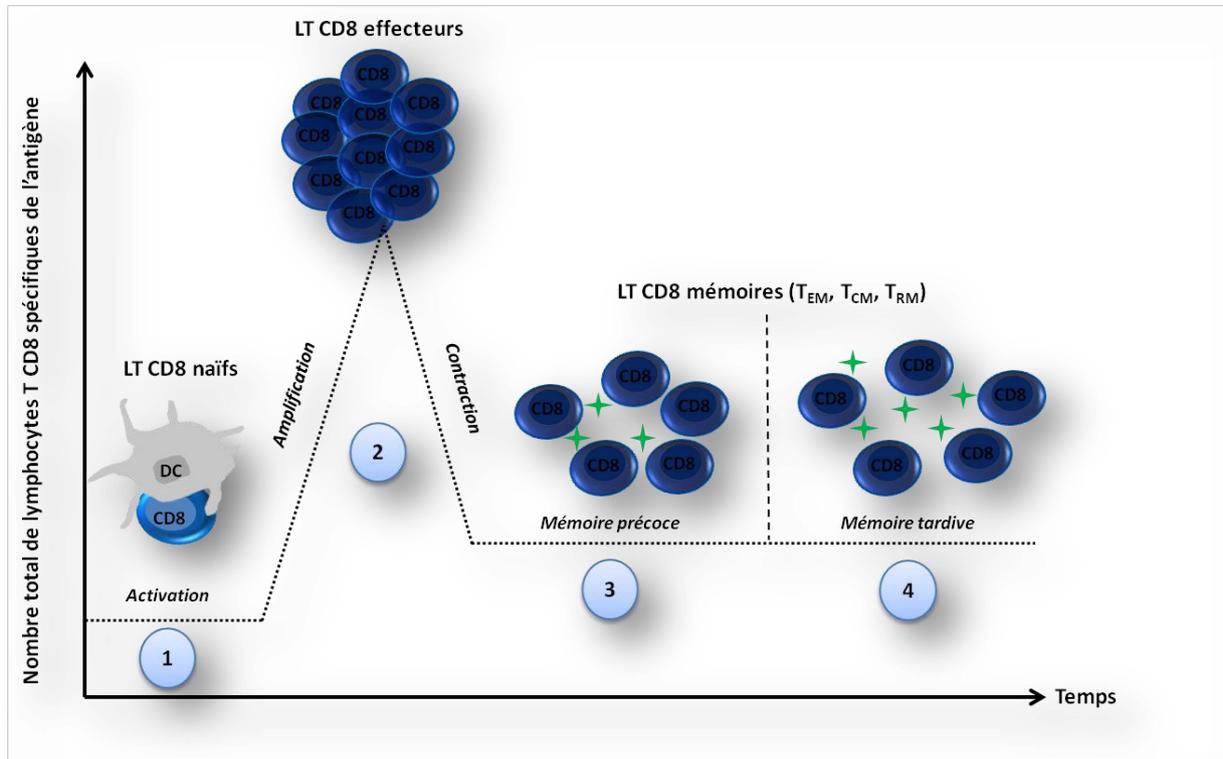


Figure 3 : La réponse primaire adaptative conduit à l'édification de la mémoire immunologique.

Une fois activés par les DCs (1), les lymphocytes T CD8⁺ subissent une phase rapide et forte d'amplification cellulaire amenant à la génération d'un pool homogène (clones) de lymphocytes T CD8⁺ effecteurs (2) capables de sécréter des cytokines inflammatoires et de tuer les cellules infectées par le pathogène. Pendant la phase de contraction, 90 à 95 % des nouveaux lymphocytes T CD8⁺ effecteurs vont mourir, et les 5 à 10 % restants vont s'établir en phase de mémoire précoce (3). Parmi ces lymphocytes T CD8⁺ mémoires, ceux qui sont dans un environnement favorable à leur maintien grâce notamment à la présence de signaux cytokiniques (IL-7, IL-15) peuvent alors transiter en phase de mémoire tardive (4) où ils se maintiennent à très long terme grâce à leur capacité de prolifération homéostatique.

CHAPITRE 1 : La mémoire immunologique : le lymphocyte T CD8⁺ mémoire, sa maintenance et ses interactions fonctionnelles

A. Considérations immunologiques

Lors d'une première rencontre avec un pathogène (infection primaire ou primo-infection), les cellules du système immunitaire adaptatif, et notamment les lymphocytes T, déclenchent ce que l'on appelle une réponse primaire (voir Préambule). Pendant la phase précoce de cette réponse primaire, cet agent infectieux est responsable de divers symptômes chez l'hôte qui sont synchrones avec l'apparition de la pathologie. Au terme de cette réponse primaire, l'hôte est totalement guéri et le système immunitaire adaptatif a mis en place un mécanisme conduisant à la génération de lymphocytes T capables de reconnaître spécifiquement un ou des antigènes provenant du pathogène : ce mécanisme cellulaire est appelé mémoire immunologique. Les différents agents infectieux préalablement rencontrés vont donc grâce à ce mécanisme être « fichés » par le système immunitaire adaptatif, et toute exposition ultérieure déclenchera une réponse secondaire ou réponse anamnétique conduisant à leur éradication massive et rapide sans l'apparition du moindre symptôme et par conséquent de la maladie. Cette mémoire immunologique est le fondement majeur de la vaccination (voir Chapitre 2) et de l'élaboration des vaccins servant à la protection de l'hôte face à des maladies infectieuses pouvant être potentiellement mortelles.

Cette mémoire immunologique repose sur des mécanismes très fins régulant le bon développement des cellules mémoires caractérisées à terme par leur efficacité protectrice et fonctionnelle. Ces cellules mémoires, et notamment les lymphocytes T CD8⁺ mémoires dont il sera question dans tout ce chapitre, diffèrent par leur nature, leur fonction, leur localisation et ceci se détermine au fur et à mesure de leur développement lequel est soumis à des modulations provenant des interactions des lymphocytes T CD8⁺ avec les autres types cellulaires mais également avec les facteurs environnementaux.

B. Les différentes populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires

1. Marqueurs phénotypiques et localisations

a. Caractérisation des deux grandes familles de cellules T CD8⁺ mémoires systémiques

i. CCR7 et CD62L

Il ya maintenant plus d'une décennie, la notion de mémoire systémique, c'est-à-dire la dispersion des cellules mémoires en différentes localisations d'un organisme consécutive à une infection généralisée, fut redéfini en scindant les cellules T CD8⁺ mémoires circulantes en deux populations en tenant compte de leur capacité effectrice, proliférative et de leur propension migratoire. Cette nouvelle nomenclature a pu être mise en évidence en se basant sur l'expression de deux principaux marqueurs : CCR7 et CD62L. Le premier marqueur est un récepteur aux chimiokines de type 7 de la famille CC (deux premières cystéines adjacentes) dont la signalisation par son ligand permet la migration des cellules immunitaires vers les organes lymphoïdes secondaires. Le second marqueur est une glycoprotéine appelée sélectine L (pour leucocytes) dont la principale fonction est d'assurer l'adhésion des lymphocytes à l'endothélium pour permettre à ceux-ci d'entrer dans les organes lymphoïdes secondaires via les veinules post-capillaires.

En 1999, l'équipe de Sallusto s'appuya sur ces deux marqueurs et réussit à démontrer que l'on pouvait discriminer les cellules T CD8⁺ mémoires humaines en deux populations distinctes (Sallusto et al., 1999). Dans cette étude, ils isolèrent des lymphocytes T CD8⁺ du sang périphérique et les séparèrent tout d'abord en fonction de leur expression de CCR7 et du marqueur CD45RA connu pour identifier la lignée leucocytaire et être exprimé sur les lymphocytes T naïfs. Puis pour chacune des quatre populations potentielles (CD45RA⁻ CCR7⁺, CD45RA⁺ CCR7⁻, CD45RA⁺ CCR7⁺ et CD45RA⁻ CCR7⁻) ils évaluèrent l'expression du marqueur CD62L. Ils réussirent à mettre en évidence qu'au sein des populations de lymphocytes T CD8⁺ naïfs (CD45RA⁺) et mémoires (CD45RA⁻) exprimant CCR7, le marqueur CD62L était fortement exprimé. Au contraire, dans les populations n'exprimant pas CCR7, CD62L était exprimé à des niveaux beaucoup plus faibles. CCR7 apparaissait donc comme étant un marqueur permettant de discriminer des populations aux capacités

migratoires distinctes. De plus, ils firent la démonstration des capacités prolifératives et effectrices des populations de lymphocytes T CD8 mémoires CCR7⁺ et CCR7⁻ après immunisation avec de l'anatoxine tétanique ; les résultats montrèrent que leurs capacités furent conservées même dix années après la vaccination. En utilisant à nouveau l'anatoxine tétanique comme challenge vaccinal, ils s'aperçurent que seuls les lymphocytes T CD8⁺ mémoires CCR7⁻ produisaient de l'IFN- γ . Ces capacités furent également démontrées *in vitro* après stimulation des populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires CCR7⁺ et CCR7⁻ où seules les cellules CCR7⁺ produisirent uniquement de l'IL-2, cytokine connue pour stimuler la prolifération cellulaire. Les cellules CCR7⁻ quant à elles secrétèrent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IFN- γ , cytokines permettant d'activer la fonction effectrice des cellules par leurs propriétés inflammatoire et cytotoxique. Cette étude fut donc à la base de la dénomination de deux grandes familles de lymphocytes T CD8 mémoires : les T_{CM} (cellule T mémoire centrale) et les T_{EM} (cellule T mémoire effectrice). Les T_{CM} arborent les marqueurs CCR7 et CD62L, sont essentiellement présents dans les organes lymphoïdes secondaires et possèdent de fortes capacités prolifératives mais n'ont aucune fonction inflammatoire et cytotoxique. Les T_{EM} n'expriment pas à leur surface CCR7 et CD62L, sont essentiellement présents dans les tissus (Masopust et al., 2001) et le sang périphériques et sont dotés de différentes fonctions effectrices qui seront détaillées ultérieurement dans ce chapitre (voir Partie 3.).

ii. IL-7R α (CD127)

D'autres marqueurs moléculaires furent également considérés comme permettant la démarcation de précurseurs de lymphocytes T CD8⁺ mémoires. Ainsi l'IL-7, qui est une cytokine importante dans la survie, le développement et l'homéostasie des thymocytes (lymphocytes T naïfs du thymus) jusqu'à leur maturité en lymphocytes T CD8⁺ effecteurs périphériques, a également été montrée comme étant impliquée dans la différenciation en cellules mémoires (Schluns and Lefrançois, 2003; Schluns et al., 2000). La signalisation déclenchée par l'IL-7 au sein du lymphocyte T se fait via son récepteur, l'IL-7R, et notamment sa chaîne α , l'IL-7R α (appelé également CD127). La régulation de l'expression à la surface de ce récepteur conditionne l'évolution de la phase effectrice vers la phase mémoire pour le lymphocyte T CD8⁺. Une étude a pu démontrer qu'un petit pool de cellules primaires effectrices (5-20 %) exprimait des taux détectables à leur surface de CD127 à la suite d'une infection par LCMV (virus de la chorioméningite lymphocytaire). Au sein de cette population

capable de survivre très longtemps, les cellules qui étaient CD127^{fort} contenaient des quantités importantes de molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2 (lymphome à cellule B) et Bcl-X_L (lymphome à cellule B extra large) (Kaech et al., 2003). Toujours dans cette même étude, ils isolèrent et transférèrent *in vivo* des lymphocytes T CD8⁺ CD127^{fort} et CD127^{faible} dans des souris naïves puis les challengèrent avec un pathogène et mirent en évidence sur la base d'une analyse cellulaire que les souris qui avaient reçu les cellules T CD8⁺ CD127^{fort} étaient beaucoup mieux protégées que celles qui avaient reçu les cellules T CD8⁺ CD127^{faible}.

En conclusion, les précurseurs mémoires arborant un phénotype CD127^{fort} sont beaucoup plus efficaces à générer les lymphocytes T CD8⁺ mémoires spécifiques à long terme.

La caractérisation plus avancée des cellules T CD8⁺ CD127^{fort} notamment à travers des modèles d'infection par Lm (*Listeria monocytogenes*), démontra la présence de sous-populations exprimant un des marqueurs précédemment évoqué, CD62L, scindées en CD62L^{fort} et CD62L^{faible} rappelant la discrimination faite entre les T_{CM} et les T_{EM} respectivement (Huster et al., 2004, 2006). Badovinac et Harty confirmèrent ce modèle en traitant, préalablement à une infection avec Lm, des souris avec des antibiotiques. Dans ce contexte, les lymphocytes T CD8⁺ mémoires furent générés en absence de contraction des effecteurs et cette apparition corréla avec une forte proportion de cellules T CD8⁺ exprimant CD127 au moment du pic de la phase d'amplification (Badovinac et al., 2004). Pourtant malgré cette corrélation, d'autres études de la même équipe d'ailleurs apportèrent une controverse quant à cette notion reliant la quantité de cellules T CD8⁺ CD127^{fort} et l'absence de contraction dans la génération de lymphocytes T CD8⁺ mémoires. C'est ainsi qu'une immunisation avec des DCs chargées en peptide génère une forte amplification des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène dont une grande partie d'entre eux (plus de 70 %) expriment CD127 au pic de la phase d'amplification (Badovinac et al., 2005). Malgré cette réponse, ils constatèrent que les cellules T CD8⁺ spécifiques de l'antigène avaient subi une forte contraction (plus de 90 % de perte) suivant une cinétique et une amplitude identiques à celles observées pour des cellules T CD8⁺ spécifiques du même antigène mais générées après une infection avec Lm ; situation où seulement 5 à 20 % des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène expriment CD127 au pic de la phase d'amplification (Badovinac et al., 2005; Hamilton and Harty, 2002). De manière similaire d'autres études montrèrent que le maintien d'un fort taux de CD127 par des effecteurs T CD8⁺ (dont le TCR est transgénique), après des immunisations avec des DCs chargées en peptide ou des complexes peptide-adjuvant, ne permettait tout de même pas d'éviter leur contraction

(Lacombe et al., 2005). Badovinac et Harty apportèrent une complication supplémentaire à ce sujet, à savoir qu'ils montrèrent que des lymphocytes T CD8⁺ activés par des DCs, et dont la destinée est de disparaître majoritairement au cours de la phase de contraction, furent capables de proliférer en réponse à un boost précoce conférant une fonction s'apparentant à celle observée en phase de mémoire pour ces cellules T CD8⁺ (Badovinac et al., 2005).

En résumé, la mesure de l'expression de CD127 peut représenter une caractéristique importante définissant les lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Schluns and Lefrançois, 2003). Mais pour autant cette expression n'évite pas la phase de contraction, ce qui soulève la question de savoir si ce marqueur moléculaire peut finalement être communément utilisé pour identifier les précurseurs des lymphocytes T CD8⁺ mémoires au pic de la phase d'amplification des cellules T CD8⁺ effectrices.

iii. IL-15

Une autre cytokine semble aussi jouer un rôle important dans le maintien à très long terme des populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires : l'IL-15 et son récepteur l'IL-15R. Bien que dans notre étude nous ne nous soyons pas focalisés sur l'expression de ce récepteur comme marqueur moléculaire pour identifier les populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires, il paraissait important de le mentionner. La signalisation déclenchée par l'IL-15 au sein du lymphocyte T se fait via son récepteur, l'IL-15R, et notamment sa chaîne α , l'IL-15R α . L'IL-15R possède également une chaîne β , l'IL-15R β (appelé également CD122) partagée avec l'IL-2R β . Il apparaît que très longtemps après une infection ou une vaccination, les populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires sont soumises à une substantielle prolifération homéostatique *in vivo*. Au contraire des signaux de survie fournis par le signal déclenché par l'IL-7, l'IL-15 semble être requise pour la maintenance à très long terme des lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Schluns and Lefrançois, 2003). Il a été démontré qu'en l'absence de signal déclenché par l'IL-15, les cellules mémoires ne perdurent pas dans le temps bien que la génération de ces cellules par les précurseurs mémoires puisse avoir lieu (Becker et al., 2002). Etant donné que l'IL-15 est un puissant activateur de la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ mémoires en absence d'une quelconque stimulation de leur TCR, les signaux de survie pourvus par le signal de l'IL-7 ne sembleraient pas être suffisants à eux seuls pour garantir le maintien à très long terme de ces cellules mémoires. En résumé, un cocktail bien dosé d'IL-7

et d'IL-15 semble être une condition nécessaire à la survie et à l'entretien homéostatique des populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires destinées à une longue espérance de vie.

iii. CD44

Un des marqueurs moléculaires que l'on retrouve communément associé à la description de lymphocytes T mémoires ou tout au moins ayant été préalablement activés, est le CD44. Ce marqueur identifié tel quel chez l'homme est une glycoprotéine de surface dont un des ligands principaux est l'acide hyaluronique. Il intervient principalement dans les mécanismes d'adhésion et de migration cellulaires. La première fois qu'il a été « suspecté » de pouvoir caractériser des cellules activées depuis une longue période, ce fut en utilisant un modèle murin. En effet, comme précédemment mentionné le terme de CD44 est à mettre en relation avec le gène qui encode cette molécule chez l'homme, le gène CD44 sur le chromosome 11 (Spring et al., 1988) ; mais chez la souris cette molécule fut identifiée sous le nom de Pgp-1 (phagocytic glycoprotein-1). Dans cette étude datant de 1987, les auteurs démontrèrent que les cellules T Pgp-1⁻ présentes à la périphérie ne dépendaient que de la présence du thymus chez ces souris. En effet, chez des souris thymectomisées la proportion des cellules T Pgp-1⁻ était moindre et ils notèrent une absence complète de ces cellules dans des souris athymiques nues. L'acquisition de Pgp-1 à la surface des lymphocytes T a pu être démontrée comme étant concomitante avec une stimulation antigénique permettant de les activer et de leur faire subir une différenciation. A travers des expériences *in vivo* où ils firent de multiples immunisations avec différents antigènes, ils observèrent que le pool de splénocytes s'enrichissait de cellules Pgp-1⁺ et qu'il y avait une corrélation avec l'augmentation d'une activité cytolytique des CTLs (lymphocyte T CD8⁺ cytotoxique) Pgp-1⁺. D'après leurs résultats, ils proposèrent un modèle qui jusqu'aujourd'hui est encore admis stipulant que les thymocytes matures n'expriment pas Pgp-1 à leur sortie du thymus vers la périphérie deviennent Pgp-1⁺ lors d'une stimulation antigénique (Budd et al., 1987). En résumé, l'expression de CD44 ou Pgp-1 au niveau des lymphocytes T périphériques est un marqueur important de leur différenciation car il permet de mettre en évidence les lymphocytes T effecteurs et les T_{EM} plus expérimentés.

iiii. KLRG1

Nous avons discuté jusqu'à présent des marqueurs moléculaires permettant d'établir une discrimination intrinsèque aux lymphocytes T CD8⁺ mémoires en les scindant en deux populations, les T_{CM} et les T_{EM}, ainsi que de marqueurs plus généralement utilisés dans le suivi de populations lymphocytaires T activées. Bien qu'étant des populations bien définies par leurs caractéristiques phénotypiques mais aussi comme on le verra plus tard fonctionnelles, les lymphocytes T CD8⁺ mémoires n'en restent pas moins des cellules dont le métabolisme et l'évolution circadienne sont proches de ceux des autres types cellulaires. En effet, lorsqu'un organisme vieillit la proportion de lymphocytes T ainsi que leur activité métabolique diminuent. Au sein de ce lignage, une certaine quantité de cellules converge inéluctablement vers des stades de maturité très avancés, on parle de cellules extrêmement différenciées. Ces cellules présentent alors des défauts fonctionnels qui pourraient expliquer en partie une diminution de l'efficacité du système immunitaire chez les individus âgés (Fletcher et al., 2005). Les lymphocytes T CD8⁺ extrêmement différenciés affichent une perte d'expression des molécules de costimulation telles que CD28 et CD27 à leur surface (Appay et al., 2002; Plunkett et al., 2005). En contrepartie, le vieillissement semblerait accroître l'expression de molécules de co-inhibition et notamment un récepteur co-inhibiteur KLRG1 (killer cell lectin-like receptor G1). Ce marqueur a été montré à la fois chez les humains et les rongeurs comme identifiant des cellules T et NK sénescentes (Blaser et al., 1998; Hanke et al., 1998; Voehringer et al., 2002). Son expression augmente très fortement avec l'âge et il a même été montré que des individus de plus de 65 ans possédaient des lymphocytes T CD8⁺ exprimant KLRG1 à plus de 90 % (Henson et al., 2009; Ito et al., 2006; Ouyang et al., 2003). Une des observations intéressantes concernant l'utilisation de ce marqueur moléculaire pour identifier une nouvelle population de lymphocytes T CD8⁺ mémoires fut que l'expression de KLRG1 augmente considérablement comme vu précédemment avec l'âge mais aussi au cours des phases de différenciation les plus avancées des cellules T CD8⁺ effectrices et au niveau des T_{EM} CD8⁺ (Voehringer et al., 2002). Dans un contexte notamment de stimulations répétées par LCMV chez la souris, une augmentation significative de l'expression de KLRG1 a pu être observée sur les lymphocytes T CD8⁺ gp33⁺ (épitope de classe I de LCMV). Toujours dans la même étude mais cette fois-ci chez l'homme, la plupart des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'infections virales chroniques (VIH (virus de l'immunodéficience humaine), CMV (cytomégalovirus) et le virus d'Epstein-Barr) ont été montrés comme étant KLRG1⁺, alors que ceux spécifiques d'infections virales éradiquées (virus de la grippe) ne

l'étaient pas (Thimme et al., 2005). Au sein du laboratoire, il nous a paru intéressant d'utiliser un marqueur tel que KLRG1 car chez la souris, qui est notre principal modèle d'étude, il est souvent utilisé pour identifier les précurseurs mémoires provenant des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs. En effet, dans des modèles d'infections virales aiguës, KLRG1 permet de faire la distinction entre les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs de courte durée qui sont généralement KLRG1^{fort} et les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs précurseurs mémoires dont le phénotype est KLRG1^{faible} (Joshi et al., 2007; Mousavi et al., 2008). Un des paramètres à prendre en considération pour notre étude est qu'il a été montré qu'il existe une corrélation entre une forte expression de KLRG1 et une incapacité proliférative (ou de prolifération clonale) des lymphocytes T CD8⁺ KLRG1⁺ après activation (Schwartzkopff et al., 2007; Voehringer et al., 2001). De plus, KLRG1 contient dans son domaine intracytoplasmique un ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) et sa liaison avec ses ligands, l'E-cadhérine et la N-cadhérine (Gründemann et al., 2006; Ito et al., 2006), déclenche des cascades d'inhibition par l'intermédiaire de molécules adaptatrices (Tessmer et al., 2007) (voir figure ci-dessous).

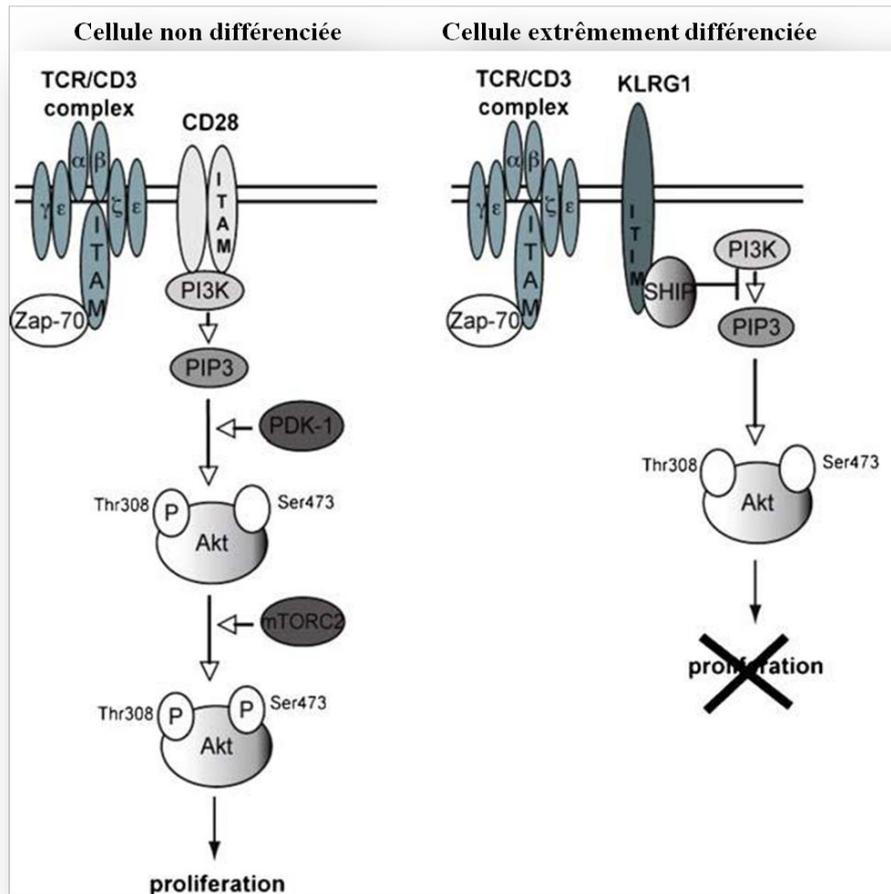


Figure 4 : Mécanismes d'action de la signalisation par KLRG1 sur l'évolution phénotypique d'un lymphocyte T au cours de sa différenciation.

Une cellule qui n'a pas encore subi de différenciations (ou peu) initie un signal à travers la molécule de costimulation CD28, déclenchant la voie de signalisation d'Akt (aussi appelée PKB pour protéine kinase B) conduisant ainsi à l'activation d'un large panel de fonctions cellulaires incluant la prolifération. Dans le cas d'une cellule très différenciée, l'expression de CD28 est perdue et il apparaît une surexpression de KLRG1 qui grâce à son ITIM va recruter une phosphatase par son domaine SH2 (Src homology-2 domain), SHIP-1 (SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1), conduisant ainsi à la dégradation du PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) en PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) ne permettant plus la phosphorylation de la sérine 473 d'Akt menant donc à une perte de la prolifération. Adapté de *Henson and Akbar, AGE, 2009*.

Enfin une étude récente sur la peau démontra qu'une autre population de lymphocytes T CD8⁺ mémoires, les T_{RM} (cellule T mémoire résidente du tissu) dont il est question dans la Partie b., provient de cellules précurseurs KLRG1⁻ (Mackay et al., 2013).

En résumé, l'utilisation de KLRG1 comme marqueur moléculaire s'avère intéressante et pertinente pour notre étude car celui-ci permet de raffiner la nature des lymphocytes T CD8⁺ générés notamment entre les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs très différenciés plutôt de courte durée et les futurs T_{EM} CD8⁺ et surtout T_{CM} CD8⁺ dont les facultés de prolifération cellulaire nécessitent d'être maintenues.

b. Caractérisation de la famille de cellules T CD8⁺ mémoires résidentes des tissus périphériques

i. CD103

Durant les dix années suivant leur description, les T_{CM} et les T_{EM} furent les deux grandes familles de lymphocytes T mémoires que l'on pensait impliquées dans toutes les réponses mémoires de l'immunité adaptative cellulaire. Puis, une nouvelle population dont le profil phénotypique semblait se rapprocher de la famille des T_{EM} fut identifiée comme pouvant résider de manière permanente au sein des tissus périphériques après l'éradication d'une infection (Gebhardt et al., 2009) ; ces cellules T mémoires furent dénommées T_{RM}. Gebhardt et ses collègues utilisèrent un modèle d'infection locale de la peau par le virus HSV-1 (virus de l'herpès de type 1) pour générer des lymphocytes T CD8⁺ mémoires spécifiques de l'épitope de classe I de HSV-1, gBT-I. Dans ce but, ils transférèrent des lymphocytes T CD8⁺ naïfs spécifiques de gBT-I couplé à la GFP (protéine fluorescente verte) dans des souris C57BL/6 naïves un jour précédant l'infection du flanc. Puis, ils réalisèrent des marquages immuno-histochimiques sur des coupes de la peau du flanc et démontrèrent que 13 jours après l'infection par HSV-1 celui-ci avait été totalement éradiqué. Mais l'observation la plus intéressante et novatrice fut la découverte de lymphocytes T CD8⁺ mémoires spécifiques de HSV-1 au niveau du site de l'infection dans la région entre le derme et l'épiderme, lymphocytes totalement absents dans le flanc contralatéral. Cette présence inattendue les poussa à caractériser cette population qui ne semblait pas être des T_{EM} puisque n'ayant pas recirculé après avoir combattu l'infection. Pour déterminer si cette présence était transitoire ou à long terme ils regardèrent plusieurs semaines après l'infection et s'aperçurent que les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de HSV-1 étaient toujours accumulés à la lisière de l'épiderme. La caractérisation phénotypique de cette population qui se maintenait à long terme montra qu'elle exprimait fortement une intégrine appelée $\alpha_E(\text{CD103})\beta_7$ capable de lier l'E-cadhérine des cellules épithéliales telles que les kératinocytes et formant un complexe impliqué dans l'adhésion cellulaire. Cette intégrine a été démontrée comme étant majoritairement exprimée par les IELs (lymphocyte intra-épithélial) dans l'intestin (Cepek et al., 1994), dans la peau (Pauls et al., 2001) et par quelques Tregs (cellule T régulatrice CD4⁺ CD25⁺) périphériques (Lehmann et al., 2002). En effet, dans un modèle d'inflammation de la peau par le psoriasis, Pauls et ses collègues montrèrent par des marquages immuno-histochimiques que la plupart des lymphocytes T CD8⁺ résidaient dans l'épiderme et que 55

% d'entre eux exprimaient CD103. Par contre, parmi les lymphocytes T CD8⁺ du derme seulement 5 % d'entre eux exprimaient CD103 et aucune expression de cette intégrine ne fut détectée au sein d'une peau dont l'intégrité n'avait pas été corrompue. Pour aller plus loin dans leur caractérisation, ils cultivèrent *in vitro* des lymphocytes T CD8⁺ du sang périphérique en présence de phytohémagglutinine et d'IL-2 pendant 10 jours puis ils enrichirent la culture avec une cytokine, le TGF-β₁ (facteur de croissance transformant), pendant 14 jours supplémentaires. Cette expérience révéla qu'en présence de TGF-β₁ les lymphocytes T CD8⁺ étaient capables d'exprimer CD103 à leur surface. Ce fut donc la démonstration d'un système d'induction spécifique de l'expression de CD103 sur une population de lymphocytes T CD8⁺ activés, système confirmé une dizaine d'années plus tard par d'autres études (Casey et al., 2012; Lee et al., 2011; Mackay et al., 2013; Sheridan et al., 2014; Zhang and Bevan, 2013). Si l'on transpose cette observation *in vivo* dans le cas d'une inflammation de la peau par le psoriasis, cela suggère qu'une surexpression de TGF-β₁ localisée au site d'infection pourrait entraîner la surexpression de CD103 à la surface des lymphocytes T CD8⁺ mémoires générés et conduire à leur accumulation au sein de l'épiderme. En conclusion, ces résultats tendent à attribuer à l'intégrine α_E(CD103)β₇ un rôle majeur dans la localisation des T_{RM} CD8⁺ de la peau, rôle amplifié en présence de facteurs microenvironnementaux capables d'induire son expression. De plus, des études précédentes mirent en lumière des preuves indirectes que l'expression de CD103 était associée aux lymphocytes T et notamment au lignage CD8⁺ (Kilshaw and Murant, 1990; Lefrançois et al., 1994) ; ce qui était en adéquation avec l'induction sélective de CD103 sur les lymphocytes T CD8⁺ démontrée par Pauls *et al.*

A la même époque que Gebhardt et dans un autre contexte d'infection, Rafi Ahmed et ses collaborateurs mirent en évidence la présence de T_{RM} CD8⁺ au niveau de l'épithélium intestinal (Masopust et al., 2010). Ils utilisèrent entre autre un modèle d'infection systémique par le virus LCMV et souhaitèrent savoir si les lymphocytes T CD8⁺ mémoires générés au niveau de l'épithélium intestinal avaient la capacité de recirculer ou non. Pour cela, ils eurent recours à un puissant agoniste modulateur du récepteur de la S1P (sphingosine-1-phosphate), appelé fingolimod (FTY720), dont une des particularités est de favoriser la rétention des lymphocytes T recirculants au niveau des organes lymphoïdes et par voie de conséquence de diminuer leur nombre au sein des autres tissus (Schwab and Cyster, 2007). Des lymphocytes T CD8⁺ naïfs provenant de souris transgéniques dont le TCR permet la reconnaissance spécifique d'un des épitopes de classe I de LCMV, gp33 (souris appelées P14), furent

transférés dans des souris C57BL/6 naïves puis celles-ci furent ensuite infectées par LCMV. Trois mois après l'infection, les souris furent traitées ou non par du FTY720 pendant 2 jours ou 30 jours. Le nombre de lymphocytes T CD8⁺ mémoires P14 spécifiques de LCMV fut évalué dans le sang périphérique, dans les ganglions lymphatiques inguinaux et dans l'épithélium intestinal. Ils constatèrent une forte déplétion des lymphocytes T CD8⁺ mémoires du sang après 2 jours de traitement et ceci fut maintenu également après 30 jours. Comme attendu, le traitement provoqua une augmentation considérable du nombre de cellules P14 dans les ganglions lymphatiques inguinaux suggérant que la recirculation de ces cellules à travers les ganglions avait été interrompue. Néanmoins, aucune réduction du nombre de cellules P14 intra-épithéliales n'a pu être observée même après 30 jours de traitement. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que les lymphocytes T CD8⁺ mémoires intra-épithéliaux ne recirculaient pas via les vaisseaux afférents lymphatiques. Cette étude vient corroborer les observations faites par Gebhardt *et al.*, à savoir que les lymphocytes T CD8⁺ mémoires générés lors d'une infection sont capables de résider de manière permanente dans les tissus cibles non lymphoïdes en l'absence de tout antigène, et possèdent des particularités qui en font une population à part entière identifiée désormais comme étant les T_{RM} CD8⁺.

Il est intéressant de noter que d'autres études mirent en évidence l'existence de présumées populations de T_{RM} CD8⁺ non recirculants se formant dans le cerveau (Hawke et al., 1998; Wakim et al., 2010), dans les glandes salivaires (Hofmann and Pircher, 2011), dans le vagin (Gebhardt et al., 2011; Tang and Rosenthal, 2010), et dans l'estomac, le rein, le pancréas et le cœur (Casey et al., 2012).

Enfin récemment, une large investigation basée sur l'isolation de lymphocytes T CD8⁺ mémoires spécifiques au sein de treize tissus périphériques non lymphoïdes montra que la majorité de ces cellules étaient des T_{RM}, ce qui apporta un constat supplémentaire quant à la régionalisation de cette population de lymphocytes T mémoires (Steinert et al., 2015).

ii. CD69

Un autre marqueur moléculaire se trouve également impliqué dans la maintenance et l'homéostasie des T_{RM}, il s'agit de CD69, une protéine transmembranaire appartenant à la famille des lectines de type C, qui a été tout d'abord montrée comme étant l'antigène de surface le plus précocement induit lors de l'activation du lymphocyte T et dont la fonction est d'agir comme une molécule costimulatrice pour l'activation et la prolifération de celui-ci

(Ziegler et al., 1994). CD69 a été montré comme étant induit sur les T_{RM} après que ceux-ci aient rejoint leurs sites de résidence que ce soit dans l'épithélium intestinal (Masopust et al., 2006) ou dans la peau (Mackay et al., 2013). Mackay et ses collègues montrèrent dans le cas d'une infection de la peau par HSV de souris naïves que lorsqu'ils transfèrent des cellules gBT-I dans ces souris et qu'ils séparèrent le derme de l'épiderme 11 jours après l'infection, les lymphocytes T $CD8^+$ gBT-I présentaient des niveaux hétérogènes d'expression de CD69 dans le derme mais que quasiment toutes les cellules gBT-I de l'épiderme étaient $CD69^+$. Par ailleurs, ils notèrent que ces mêmes cellules gBT-I de l'épiderme exprimaient CD103 ce qui les amena à la conclusion que ces deux marqueurs CD69 et CD103 étaient nécessaires au maintien et à la survie des T_{RM} dans l'épiderme. Cette hypothèse fut confirmée car ils utilisèrent des cellules gBT-I provenant de souris déficientes en CD69 ou CD103 et les co-transférèrent avec des cellules gBT-I sauvages avant l'infection, et ils constatèrent que le rapport T_{RM} sauvages sur T_{RM} déficients dans l'épiderme était largement en faveur des sauvages (Mackay et al., 2013). Il est également intéressant de noter que CD69 est un antagoniste du récepteur de la S1P (S1PR1) car son expression à la surface des lymphocytes T a été montrée par plusieurs études comme coïncidente avec la perte d'expression de S1PR1 (Cyster and Schwab, 2012; Matloubian et al., 2004; Schober et al., 1999; Shiow et al., 2006; Skon et al., 2013). Comme vu dans le paragraphe précédent, la signalisation via S1PR1 amène à la rétention des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires donc CD69 de par son expression favorise l'accès des futurs T_{RM} aux tissus périphériques où ils éliront résidence. Dans la régulation de S1PR1, un facteur de transcription du nom de KLF2 (kruppel-like factor 2) a été montré comme étant nécessaire à l'expression de S1PR1 sur les lymphocytes T $CD8^+$, mais son activation doit être stoppée pour permettre aux précurseurs des T_{RM} d'aller coloniser les tissus périphériques non lymphoïdes (Skon et al., 2013).

Très récemment, une étude est venue apporter une vision plus contrastée de l'implication de CD69 en tant que marqueur associé aux T_{RM} (Steinert et al., 2015). Les auteurs isolèrent plusieurs T_{RM} $CD8^+$ spécifiques issus de différents compartiments tissulaires non lymphoïdes et montrèrent que beaucoup d'entre eux étaient $CD69^+$, ce qui concordait avec les études précédentes (Mackay et al., 2013), mais que plusieurs T_{RM} $CD8^+$ étaient également $CD69^-$ et $CD103^-$. Ces résultats amenèrent donc une complexité supplémentaire quant à la définition de cette population de lymphocytes T $CD8^+$ mémoires résidents des tissus qui semblerait ne pas être unique de par son profil phénotypique, mais qui se subdiviserait en sous-populations de T_{RM} .

En résumé, pris tous ensemble ces résultats montrent que les T_{RM} sont une population de lymphocytes T mémoires plus hétérogène qu'il n'y paraît dont la maintenance semble requérir, mais non de manière exclusive, les expressions conjointes de marqueurs moléculaires comme CD103 et CD69 à leur surface, avec un microenvironnement favorable fournissant des cytokines telles que le TGF-β₁, et enfin une absence de certains types de récepteurs comme S1PR1 et KLRG1.

En conclusion de cette partie, il est important de retenir que l'expression ou non de différents marqueurs moléculaires à la surface du lymphocyte T CD8⁺ effecteur issu d'une activation antigénique, va conditionner l'appartenance de celui-ci à une des trois familles de lymphocytes T CD8⁺ mémoires ; et que ce sont également ces marqueurs moléculaires qui définiront le lieu d'action de ces cellules et leur maintien ou non sur le site à long terme.

c. Bilan

Dans le tableau récapitulatif ci-dessous sont listées les différentes populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires, leurs phénotypes et leurs localisations.

Population	Phénotype	Localisation
T _{CM}	CD44 ^{high} , CD62L ⁺ , CCR7 ⁺ , CD127 ⁺ , CD69 ⁻ , CD103 ⁻	Lymph nodes, spleen (white pulp > red pulp), blood, and bone marrow
T _{EM}	CD44 ^{high} , CD62L ⁻ , CCR7 ⁻ , CD127 ⁺ , CD69 ⁻ , CD103 ⁻	Spleen (red pulp > white pulp); fewer in lymph nodes, blood, lung, liver, intestinal tract, reproductive tract, kidney, adipose tissue, and heart
T _{RM}	CD44 ^{high} , CD62L ⁻ , CCR7 ⁻ , CD11a ^{high} , CD69 ⁺ , CD103 ⁺	CD8: epithelium of the skin, gut, and vagina; salivary glands and lung airways; brain and ganglia

Figure 5 : Identification des familles de lymphocytes T CD8⁺ mémoires en fonction de leur phénotype et de leur localisation.

N.B. : le marqueur KLRG1 ne figure pas dans ce tableau mais les trois types de populations mémoires ont été identifiés comme étant KLRG1⁻. Adapté de *Mueller et al., Annu. Rev. Immunol., 2013.*

La figure ci-dessous reprend les différentes populations de lymphocytes T $CD8^+$ (et $CD4^+$) mémoires en y associant leurs potentialités migratoires et leurs localisations tissulaires.

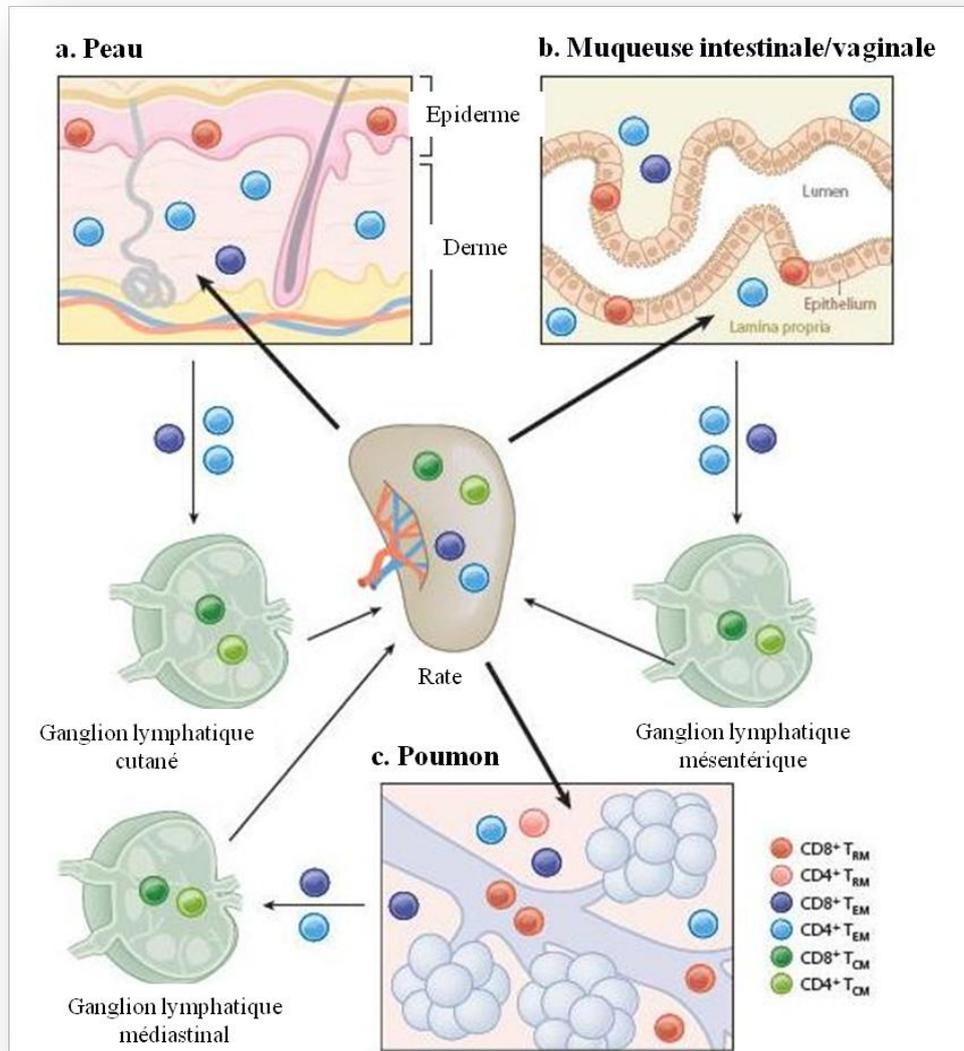


Figure 6 : Recirculation et sites de résidence des populations de lymphocytes T mémoires dans les tissus périphériques.

Les T_{CM} $CD4^+$ et $CD8^+$ recirculent principalement à travers les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques). Les T_{EM} $CD4^+$ et $CD8^+$ recirculent quant à eux majoritairement à travers la rate et une petite fraction d'entre eux est retrouvée dans les ganglions lymphatiques. Un grand nombre de T_{EM} migrent à travers les tissus non lymphoïdes tels que (a.) la peau, (b.) la muqueuse intestinale ou vaginale, (c.) le poumon, et retournent à la circulation via les vaisseaux lymphatiques drainant les ganglions lymphatiques à proximité du tissu. Les T_{RM} non recirculants sont localisés uniquement au niveau des épithéliums dans un contexte d'activation préalable de la peau, des muqueuses intestinale et vaginale et des voies respiratoires pulmonaires. Adapté de *Mueller et al., Annu. Rev. Immunol., 2013.*

2. Modèles de différenciation

En se basant sur les caractéristiques des $T_{EM} CD8^+$ et des $T_{CM} CD8^+$ il semblerait que celles qui interviennent dans la mémoire précoce en se positionnant dans le sang ou la rate sont principalement les T_{EM} ; alors que celles impliquées dans la mémoire tardive sont essentiellement les T_{CM} . Dans le cadre d'infections aiguës et en se basant sur des modèles de transfert adoptif de cellules T $CD8^+$ pourvues d'un TCR transgénique, la conversion des T_{EM} en T_{CM} a pu être démontrée comme s'effectuant au niveau d'une seule cellule sans avoir besoin de proliférer ; ce modèle fut appelé modèle de différenciation linéaire (Wherry et al., 2003). Ces résultats sous-entendraient que le phénotype $CD62L^{fort} CCR7^{fort}$ pourrait constituer le but ultime à atteindre dans la différenciation des lymphocytes T $CD8^+$ mémoires (Badovinac and Harty, 2003; Wherry et al., 2003).

Le débat reste ouvert sur le développement et la relation d'origine des populations de lymphocytes T $CD8^+$ mémoires. Des études ont proposé à l'inverse du modèle de Wherry *et al.* que les T_{CM} et les T_{EM} sont des populations figées qui ne se convertissent pas au cours du temps (Manjunath et al., 2001; Marzo et al., 2005; Sallusto and Lanzavecchia, 2001). Au contraire, des études avancèrent à l'instar de Wherry *et al.* que les T_{EM} en absence de stimulation antigénique peuvent se convertir en T_{CM} (Badovinac et al., 2007; Bouneaud et al., 2005; Wherry et al., 2004). Tirant parti de ces résultats, Kaech et Wherry (Kaech and Wherry, 2007), proposèrent l'existence de trois populations au sein du pool de lymphocytes T de la mémoire précoce, à la suite d'infections virales aiguës. Tout d'abord, il existe des T_{EM} provenant de cellules effectrices précurseurs mémoires $CD127^{fort}$ définissant ainsi une population de T_{EM} convertible pouvant se transformer lentement au cours du temps en T_{CM} (Badovinac et al., 2007; Marzo et al., 2005; Wherry et al., 2003, 2004). En effet, les T_{EM} font partis du pool de cellules primaires ayant rencontré un antigène et ayant survécu à la contraction et ils arborent majoritairement le phénotype $CD62L^{faible} CCR7^{faible} IL-2^{faible}$ pour se convertir en T_{CM} dont le phénotype $CD62L^{fort} CCR7^{fort} IL-2^+$ leur attribue un fort potentiel prolifératif pour assurer leur maintien homéostatique (Wherry and Ahmed, 2004). Ensuite, il y a une population de T_{CM} initialement dérivée des T_{EM} convertibles et qui a acquis la capacité de s'auto-renouveler de manière très efficace en utilisant le remplacement cellulaire homéostatique (Wherry et al., 2003, 2004). Certains T_{CM} pourraient dériver directement de cellules effectrices précurseurs mémoires $CD62L^{fort}$ qui se trouvent en grand nombre au moment du pic de la phase d'amplification clonale. Enfin, il reste des lymphocytes T

effecteurs de courte durée de vie $CD127^{faible}$ $KLRG1^{fort}$ $CD62L^{faible}$ différenciés de manière extrême (ou terminale) qui peuvent passer en phase mémoire tout en perdant l'expression de marqueurs d'activation propres aux effecteurs tels que le granzyme B par exemple. Ces lymphocytes T devenus latents au sein du pool de cellules mémoires, ne survivent pas longtemps, n'entreprennent pas d'auto-renouvellement, et ne se convertissent pas en T_{CM} (Joshi et al., 2007) ; ils semblent être le reflet d'un stade terminal de la population de T_{EM} .

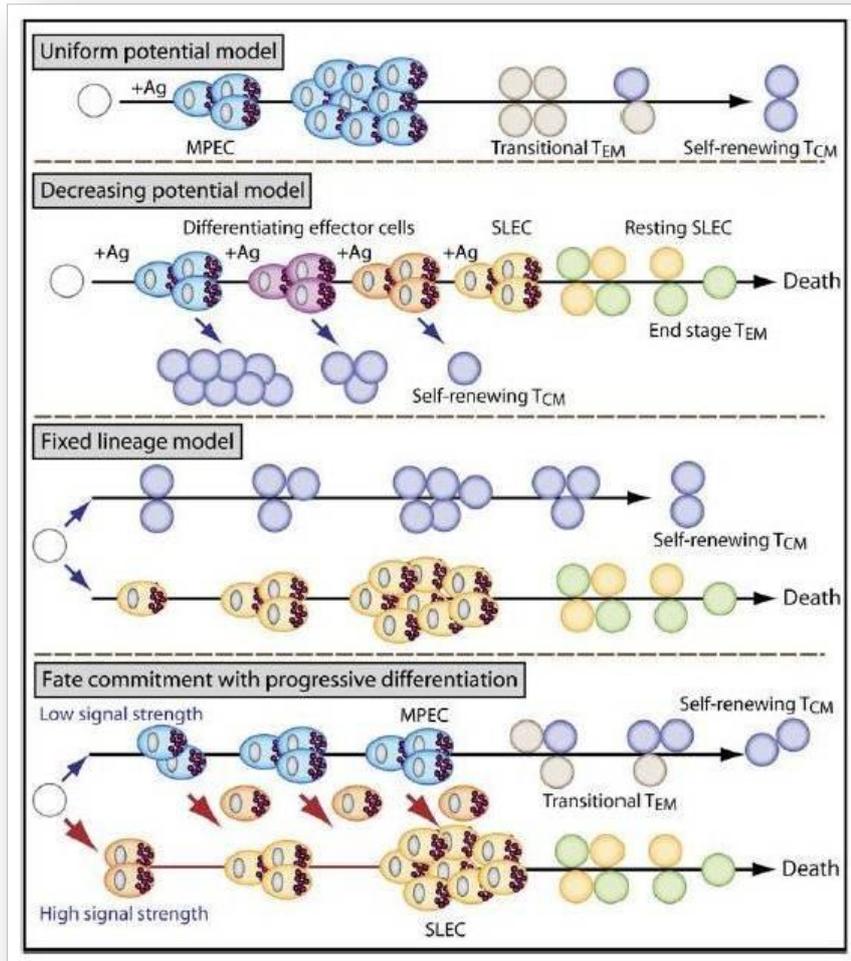


Figure 7 : Modèles décisionnels dans la destinée des cellules effectrices et mémoires au cours d'une infection virale aiguë.

Modèle 1 : potentiel uniforme. Toutes les cellules effectrices activées développent un potentiel similaire à devenir des cellules effectrices précurseurs mémoires (MPEC = memory precursor effector cell), cependant des facteurs externes vont limiter le nombre de lymphocytes T mémoires générés. Ce sont les MPECs qui vont donner naissance aux T_{EM} convertibles en T_{CM} capables d'auto-renouvellement. Modèle 2 : potentiel en diminution. De courtes périodes de stimulation antigénique privilégient les MPECs qui vont former les futurs T_{CM}. De plus longues stimulations avantagent la différenciation ultime des cellules effectrices de courte durée de vie (SLEC = short-lived effector cell) et provoquent l'entrée en stade terminal des T_{EM} voués à disparaître au cours du temps. Modèle 3 : lignage figé. Dès l'activation, les lymphocytes T naïfs se différencient en SLECs ou en lymphocytes T mémoires matures pouvant éviter la différenciation en T_{EM} et directement être capables d'auto-renouvellement leur conférant le phénotype de T_{CM}. Modèle 4 : engagement vers une destinée avec une différenciation progressive. En fonction de la force du signal, une destinée de MPEC ou de SLEC sera attribuée précocement après l'activation. Les MPECs se voient attribuer des fonctions effectrices mais demeurent multipotentes (possibilité de devenir des lymphocytes T mémoires matures ou des SLECs). La plupart des SLECs vont mourir et ceux qui persistent auront une destinée à court terme équivalente à celle des T_{EM} en stade terminal. Les MPECs vont survivre et donner naissance aux convertibles T_{EM} qui deviendront les T_{CM} subsistants à longue durée de vie. D'après *Kaech and Wherry, Immunity, 2007*.

Deux récentes études ont analysé à l'échelle d'une seule cellule T CD8⁺ l'importance de la phase d'amplification clonale sur la nature de la réponse générée après une infection par Lm. Pour cela des cellules OT-I, provenant de souris transgéniques dont le TCR est monospécifique de l'épitope de classe I de l'OVA (protéine du gène de l'ovalbumine), OVA₂₅₇, ont été utilisées soit dans des transferts d'une seule cellule soit dans des études basées sur des méthodes de codes à barres pour estimer la contribution de chaque famille de lymphocytes T CD8⁺ à la réponse contre le pathogène en suivant les progénitures de chaque cellule (Buchholz et al., 2013; Gerlach et al., 2013). Les résultats montrèrent un large éventail d'amplifications clonales pour chaque lymphocyte T CD8⁺. De plus, chaque cellule OT-I transférée avait subi une meilleure amplification par rapport aux cellules T CD8⁺ provenant d'un répertoire polyclonal. Il est à noter dans ces deux études la démonstration d'une corrélation négative entre l'expression de CD62L et une forte amplification. Un modèle mathématique fut utilisé pour caractériser une voie de différenciation linéaire stochastique dans la distinction des populations de lymphocytes T CD8⁺, voie dans laquelle les précurseurs des T_{CM} sont les progéniteurs des autres lignées (Buchholz et al., 2013). Dans une autre étude récente, un système de transfert d'une seule cellule a été développé pour suivre la destinée des précurseurs de chaque lymphocyte T CD8⁺ polyclonal (Plumlee et al., 2013). Les auteurs ont montré que selon le type de pathogène et le microenvironnement inflammatoire qu'il induit, les différents clones se différencient en adoptant des phénotypes de cellules effectrices précurseurs mémoires (faible pression inflammatoire du milieu) ou de cellules effectrices de courte durée de vie (forte pression inflammatoire du milieu). De plus, ils ont démontré que les lymphocytes T CD8⁺ mémoires clonaux provenant de cellules OT-I challengées avec VSV (virus de la stomatite vésiculaire)-OVA ou Lm-OVA (*Listeria monocytogenes* recombinante sécrétant l'OVA), sont intrinsèquement biaisés pour se différencier en effecteurs secondaires KLRG1^{fort}. Récemment, une étude montra qu'une infection chronique s'accompagnant de signaux inflammatoires soutenus impactait négativement la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs en cellules mémoires ainsi que leur nombre (Stelekati et al., 2014). Cette étude renforça ainsi l'idée de la nécessité d'éradiquer complètement un pathogène de l'organisme une fois l'infection maîtrisée pour permettre l'établissement optimal d'une mémoire efficace. Comme Marshall et Kaech le soulignent dans leur préface (Marshall and Kaech, 2013), ces résultats tendent à suggérer que la différenciation d'effecteurs secondaires à partir de cellules mémoires « au repos » est plus fortement soumise à l'influence de facteurs intrinsèques tels que des changements épigénétiques régulateurs de gènes ou à la propension de ces cellules mémoires à surexprimer rapidement le facteur de transcription T-bet (T-box-

expressed-in-T-cells) connu pour caractériser des cellules différenciées de manière terminale (Joshi et al., 2011), plutôt qu'à l'influence de signaux extrinsèques.

En conclusion, la destinée d'un lymphocyte T CD8⁺ venant d'être activé dépend de plusieurs paramètres qu'ils soient aussi bien extrinsèques (voir Partie C.) qu'intrinsèques au lymphocyte T CD8⁺ lui-même. La décision d'un précurseur mémoire de s'engager vers la génération de cellules mémoires complètement matures, ou l'évolution inéluctable d'un effecteur vers sa différenciation terminale, sont des paramètres primordiaux à considérer car ils conditionneront la nature du potentiel fonctionnel et l'accomplissement de l'efficacité protectrice du lymphocyte T CD8⁺ mémoire.

3. Evaluation du potentiel fonctionnel et de l'efficacité de protection

a. Les T_{EM} CD8⁺ et les T_{CM} CD8⁺

Maintenant que la nature des différentes populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires a pu être établie, il devient intéressant d'évaluer leur potentiel fonctionnel face à différentes situations qui pourraient mettre à mal l'intégrité de l'organisme. C'est ainsi que la fonction occupée par ces différentes populations va varier selon leur capacité à pouvoir accéder à certaines zones de l'organisme mais aussi à pouvoir s'entourer d'un microenvironnement favorable à leur homéostasie. Certaines populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires seront donc au premier rang dans l'éradication d'un pathogène alors que d'autres auront plutôt un rôle de cellules « souches » pour approvisionner le stock de l'organisme en cellules mémoires effectrices.

Au sein de la lignée des lymphocytes T CD8⁺, une étude montra il y a une dizaine d'années qu'il restait difficile d'établir de véritables différences dans les fonctions effectrices telles que la production d'IFN- γ ou l'activité cytolytique entre les T_{EM} et les T_{CM} (Unsoeld et al., 2002). La véritable discrimination fonctionnelle alors entre ces deux populations s'établissait surtout sur la capacité à produire de l'IL-2. Faisant le corollaire à cette preuve de distinction, Wherry et ses collègues (Wherry et al., 2003) utilisèrent LCMV ou Lm-gp33 comme modèles d'infections virale ou bactérienne systémiques pour générer des populations de T_{EM} et T_{CM} puis les transférèrent en quantité équivalente dans des souris naïves qu'ils challengèrent avec

le pathogène correspondant pour tester la capacité de chaque population à contrôler l'infection. Ils isolèrent les populations de cellules mémoires au sein de différents tissus et les distinguèrent sur la base de leur expression de CD62L en CD62L^{faible} (T_{EM}) et CD62L^{fort} (T_{CM}) pour être certains qu'une quantité équivalente de ces deux types de cellules mémoires avait bien été transférée. Compte tenu de leur phénotype, les T_{CM} se retrouvèrent en grande partie dans les ganglions lymphatiques alors que les T_{EM} capables de recirculer se trouvaient majoritairement dans des tissus périphériques non lymphoïdes comme le poumon et le foie. La rate quant à elle contenait autant de T_{EM} que de T_{CM}. Les auteurs démontrèrent ensuite les capacités fonctionnelles de ces deux populations au sein des différents tissus en mesurant leur production d'IFN- γ , de TNF (facteur de nécrose tumorale)- α et d'IL-2 et ils mirent en évidence au sein des splénocytes que les T_{CM} étaient capables de produire beaucoup plus d'IL-2 que les T_{EM} alors que pour les deux autres cytokines cette capacité de production était similaire pour les deux populations. Ils évaluèrent la protection conférée par les deux types de cellules mémoires et montrèrent que lorsqu'ils challengèrent les souris naïves ayant reçu ces populations de T_{EM} et T_{CM} avec une souche virulente de LCMV injectée en intraveineuse, ce furent les T_{CM} les plus prompts à contrôler l'infection. Ensuite, ils estimèrent la capacité de ces deux types de populations mémoires à réduire la réplication virale de manière localisée en injectant par voie intrapéritonéale VV (vaccinia virus) exprimant gp33 (VV-gp33), et une fois de plus ce furent les T_{CM} les plus efficaces à contrôler la réplication virale au sein des ovaires. La même observation a pu être faite lorsque VV-gp33 fut administré de manière intranasale. Cette étude a permis de mettre en évidence que quelle que soit la voie d'entrée d'un pathogène et les tissus infectés, la population de T_{CM} se distinguant par sa forte faculté à produire de l'IL-2 mais aussi tout comme les T_{EM} les autres cytokines inflammatoires, est également celle qui confère la meilleure protection dans le contrôle de la charge virale au sein des organes mais également de la virémie au sein de l'organisme tout entier. Cette propension à produire une grande quantité d'IL-2 soutient le fait que les T_{CM} peuvent engager des processus de prolifération cellulaire massifs et rapides à la suite d'une seconde rencontre avec un pathogène, processus ayant une action autocrine ou paracrine en vue soit de maintenir le pool de cellules T_{CM} progénitrices soit d'initier la formation entre autre d'un nouveau pool de cellules effectrices mémoires spécifiques telles que les T_{EM}.

Bien entendu, la part des T_{EM} dans la protection antivirale ne doit pas être occultée. En effet, dans des modèles murins d'infections virales les T_{EM} CD8⁺ ont été montrés grâce à leurs capacités cytolytiques accrues comme étant d'aussi efficaces sinon meilleurs médiateurs de la

protection de tissus non lymphoïdes que les $T_{CM} CD8^+$ (Bachmann et al., 2005; Roberts and Woodland, 2004). En effet, Roberts et Woodland utilisèrent un modèle d'infection systémique par le virus Sendai, virus proche de celui de la grippe, et montrèrent que les lymphocytes $T CD8^+$ mémoires $CD62L^{faible}$ ($T_{EM} CD8^+$) étaient en ligne de front et répondaient de manière très efficace contre ce type de virus mais également qu'ils étaient à l'origine de la génération de nouveaux T_{EM} établissant ainsi une seconde génération de cellules mémoires effectrices. Cette étude apporta une vision contrastée sur les rôles respectifs des T_{EM} et des T_{CM} établis par Wherry et ses collègues un an auparavant qui stipulaient que les $T_{CM} CD8^+$ étaient la population la plus impliquée et réactive dans l'éradication d'infections virales systémiques.

Dans cette première partie, il ressort que les T_{EM} et les T_{CM} sont dotés de fonctions spécifiques qui permettent au sein de l'hôte infecté de pouvoir contrôler et éradiquer dans la plupart des cas l'origine infectieuse. Mais il faut garder à l'esprit que c'est la polyfonctionnalité associée à chacun de ces phénotypes mémoires qui reste la meilleure arme dans le cas d'infections virales où la charge virale et le temps de résidence du virus sont restreints (voir figure ci-dessous).

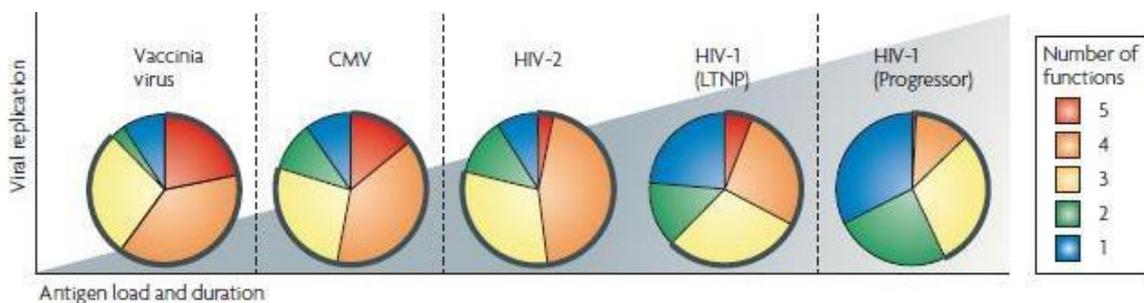


Figure 8 : Corrélation entre la qualité des lymphocytes $T CD8^+$ générés et la charge virale.

L'estimation de la fonctionnalité des lymphocytes $T CD8^+$ chez des personnes infectées avec différents virus a été déterminée par l'analyse de cinq fonctions correspondant à la mesure d'expression d'IL-2, d'IFN- γ , de TNF- α , de CCL4 (CC-chemokine ligand 4) et de CD107 après stimulation avec des peptides antigéniques. L'arc de cercle noir met en évidence la proportion de lymphocytes $T CD8^+$ polyfonctionnels (3 à 5 fonctions) selon chaque type d'infection. On observe une corrélation inverse entre l'acquisition de réponses polyfonctionnelles et la longévité du virus et de sa charge virale (fond grisé). HIV-1 et HIV-2 : human immunodeficiency virus ; LTNP : long-term non-progressor. D'après Seder et al., *Nature Reviews Immunology*, 2008.

En résumé, plus un lymphocyte T CD8⁺ mémoire apparaît être polyfonctionnel à l'issue de la première rencontre avec son antigène plus il sera efficace à protéger rapidement son hôte face à une nouvelle rencontre du même type. En effet, des lymphocytes T CD8⁺ sécrétant à la fois de l'IFN- γ et du TNF- α présentent une activité cytolytique améliorée comparée aux mêmes cellules ne sécrétant uniquement qu'une seule des deux cytokines telle que l'IFN- γ (Betts et al., 2006; Lichterfeld et al., 2004; Sandberg et al., 2001). A titre d'anecdote mais non des moindres, Betts *et al.* en 2006 ont publié la première étude utilisant la cytométrie en flux multiparamétrique pour caractériser la qualité des réponses lymphocytaires T CD8⁺ chez l'homme après une infection, et suggérant que des cellules polyfonctionnelles sont essentielles à la préservation de l'intégrité cellulaire d'un organisme.

Plus récemment, l'équipe de Rafi Ahmed (Tan et al., 2012) démontra qu'en immunisant des souris avec différents sérotypes de vecteurs adénovirus (Ad26, Ad35 et Ad5), il était possible de générer des populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires ayant des capacités fonctionnelles accrues. En effet, les auteurs mirent en évidence que les expressions de CD127 et Bcl-2 étaient significativement plus fortes chez les populations de cellules mémoires initiées par Ad26 et Ad35 que chez celles initiées par Ad5. De plus, l'expression de KLRG1 au niveau des cellules mémoires provenant de l'immunisation par Ad5 était quant à elle significativement plus forte que celle mesurée avec les deux autres vecteurs adénovirus. Forts de ces premières observations, ils en conclurent que les cellules mémoires issues d'une immunisation par Ad26 et Ad35 présentaient des caractéristiques phénotypiques s'apparentant aux populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires de longue durée de vie (T_{EM} et T_{CM}) ; alors que les cellules mémoires issues d'une immunisation par Ad5 apparaissaient différenciées de manière terminale et étaient de plus courte durée de vie. Puis les auteurs évaluèrent la capacité fonctionnelle de ces populations mémoires identifiées et ils montrèrent que les lymphocytes T CD8⁺ mémoires issus de la rate étaient de meilleurs coproducteurs d'IFN- γ et de TNF- α lorsqu'ils avaient été générés par Ad26 et Ad35. La même observation a pu être faite en ce qui concernait la production conjointe des trois cytokines que sont l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-2. Cette étude démontra que selon le type de vecteur choisi lors d'une immunisation, il apparaissait une gradation dans la nature des lymphocytes T CD8⁺ mémoires générés ce qui avait pour conséquence de leur conférer des capacités polyfonctionnelles variables et donc un impact plus ou moins efficace en termes de protection face à un agent infectieux.

Quelques mois après les travaux de l'équipe de Rafi Ahmed, une étude a été publiée mettant en avant l'efficacité de cellules mémoires effectrices apparentées aux T_{EM} dans l'établissement d'une immunité cellulaire à la fois forte et protectrice. Olson et ses collègues (Olson et al., 2013) mirent en évidence, suite à une infection par LCMV, la génération de trois types de sous-populations de cellules mémoires définies par leur niveau d'expression de deux marqueurs de surface, CD27 et CD43. CD27 appartient à la famille des récepteurs au TNF et CD43 est une protéine de surface transmembranaire dont le complexe formé avec un de ses ligands (moésine et ezrine) a été démontré comme participant à l'activation du lymphocyte T (Pedraza-Alva et al., 1998; Serrador et al., 1998; Yonemura et al., 1998). Les auteurs montrèrent qu'au sein de ces trois types de sous-populations des différences frappantes sont apparues. Les deux sous-populations $CD27^{fort} CD43^{faible/fort}$ contenaient des sous-ensembles exprimant $CD62L^{fort}$ et $CD62L^{faible}$ et arboraient des phénotypes typiques de lymphocytes T $CD8^+$ mémoires avec de fortes expressions de CD122 et CD127 et de faibles expressions de KLRG1. Suite à cette observation, ils ont donc pu en conclure que les deux sous-populations $CD27^{fort} CD43^{faible/fort}$ renfermaient les deux grands types de cellules mémoires, les T_{EM} et les $T_{CM} CD8^+$. La troisième sous-population $CD27^{faible} CD43^{faible}$ quant à elle présentait un tout autre phénotype avec une expression intermédiaire de CD127 et cette fois-ci de fortes expressions de KLRG1. De plus, cette sous-population affichait une forte expression de T-bet et une expression réduite du facteur Eomes (Eomesodermin), deux caractéristiques des cellules effectrices (Banerjee et al., 2010; Intlekofer et al., 2005; Joshi et al., 2007). A première vue, cette dernière sous-population en phase mémoire semblerait s'apparenter aux lymphocytes T $CD8^+$ effecteurs de courte durée de vie décrits précédemment mais leur niveau d'expression de CD127 a été montré par Olson *et al.* comme étant équivalent à celui de cellules naïves ce qui tendrait plutôt à les considérer comme une sous-population au phénotype $CD127^+ KLRG1^+$ déjà identifiée par d'autres études (Obar and Lefrançois, 2010). Des résultats précédents suggèrent que les lymphocytes T $CD8^+$ mémoires $CD27^{faible} CD43^{faible}$ n'étaient pas capables de proliférer suite à un rappel antigénique (Hikono et al., 2007). Pour tester la véritable capacité des trois sous-populations à protéger efficacement leur hôte, Olson *et al.* transfèrent celles-ci dans des souris naïves après qu'elles aient été générées plusieurs mois auparavant par LCMV ou VV puis les souris naïves furent ensuite challengées par Lm-gp33 ou Lm-B8R (épitope dominant de classe I de VV). A la grande surprise des auteurs de cette étude, ce furent les lymphocytes T $CD8^+$ mémoires arborant le phénotype mémoire le moins conventionnel, à savoir $CD27^{faible} CD43^{faible}$, qui s'avèrent être responsables de la protection la plus robuste dans ces expériences d'infections virales aiguës.

Cette découverte fut renforcée par le fait que cette même sous-population était la plus efficace à générer une activité cytolytique importante (mesure d'expression de granzyme B) impliquée dans l'éradication des pathogènes, constat beaucoup moins significatif pour les autres sous-populations testées. De plus, dans des souris déficientes pour la perforine, l'impact sur le potentiel cytolytique des sous-populations fut majeur pour les lymphocytes T CD8⁺ mémoires CD27^{faible} CD43^{faible}, démontrant que l'efficacité de ces cellules reposait beaucoup sur l'acquisition de molécules cytolytiques telles que la perforine en vue d'une protection robuste contre des pathogènes infectieux.

Finalement, une des mesures de l'efficacité fonctionnelle repose la libération très rapide de molécules cytotoxiques par les lymphocytes T CD8⁺ mémoires pour endiguer une infection secondaire. L'utilisation de cytokines inflammatoires telles que l'IFN- γ a été montrée comme essentielle pour éradiquer directement des pathogènes au sein de cellules (Iijima et al., 2008). Pourtant des mécanismes non basés sur une activité cytolytique directe existent également en tant qu'outils efficaces à l'éradication infectieuse. Par exemple, les lymphocytes T CD8⁺ mémoires ont été montrés comme capables de maintenir latente une infection par HSV-1 en sécrétant des granules lytiques dans des neurones infectés. Par cette action, cela permit d'éviter de déclencher une pathologie sérieuse provoquée par la destruction des neurones qui restèrent ainsi intacts ; et seule une protéine précoce importante pour la réplication du virus fut dégradée par le granzyme B relâché (Knickelbein et al., 2008). En conclusion, ces différents mécanismes tendent à moduler l'acquisition d'une immunité protectrice grâce aux caractéristiques fonctionnelles des populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires.

b. Les T_{RM} CD8⁺

Depuis plusieurs années maintenant, de nombreuses évidences s'accumulent faisant état de la capacité supérieure des T_{RM} à conférer une meilleure protection que leurs homologues mémoires recirculants, les T_{EM} et les T_{CM} (Hofmann and Pircher, 2011; Iijima and Iwasaki, 2014; Shin and Iwasaki, 2012). En effet, les T_{RM} ont été décrits comme occupant des positions stratégiques aux points d'entrée des pathogènes en particulier au niveau des muqueuses qui sont des sites privilégiés d'infections. Ce positionnement leur confère ainsi une capacité de réactivité accrue, les mettant en ligne de front pour exercer un contrôle efficace de la dissémination du pathogène et au final établir une protection anti-infectieuse robuste. Là où les T_{CM} nécessitent la présence de l'antigène au niveau des organes lymphoïdes

secondaires pour lancer une prolifération accrue générant des T_{EM} spécifiques de l'antigène devant ensuite rejoindre le site d'infection, les tissus contenant des T_{RM} bénéficient d'une protection *in situ* immédiate. Comme déjà évoqué précédemment et également souligné par Carbone *et al.* (Carbone et al., 2013), l'étude menée par Gebhardt *et al.* (Gebhardt et al., 2009) est la première montrant une protection accrue par les T_{RM} dans les tissus périphériques. Avec Masopust *et al.* (Masopust et al., 2010), ensemble ces deux études ont permis de définir une sous-population « autonome », n'appartenant pas à la discrimination classique faite des populations de lymphocytes T $CD8^+$ mémoires, de cellules mémoires spécifiques d'un pathogène dans des contextes d'infections de la peau et des muqueuses : les $T_{RM} CD8^+ CD103^+$. De plus Mackay *et al.* (Mackay et al., 2012) ainsi que Casey *et al.* (Casey et al., 2012), démontrèrent que plusieurs tissus périphériques pouvaient de manière intrinsèque supporter la formation et la maintenance de $T_{RM} CD8^+ CD103^+$ en absence totale de stimulation antigénique. Des expériences avec des souris parabiotiques montrèrent qu'uniquement l'animal qui avait été infecté à l'origine avait pu être protégé contre un challenge avec VV au niveau de la peau (Jiang et al., 2012). Le plus frappant dans cette étude fut que l'animal ayant à la fois des T_{RM} et des cellules mémoires recirculantes réussit à abaisser sa charge virale de 99,99 % 6 jours seulement après le challenge. La même observation avait pu être faite dans une expérience similaire de parabiose où seul l'animal ayant au préalable été infecté avait pu être protégé contre un challenge avec le virus de la grippe au niveau du tractus respiratoire (Teijaro et al., 2011). Ces expériences démontrèrent que malgré le partage équilibré entre les deux animaux parabiontes des cellules mémoires du sang périphérique recirculantes, celles-ci n'étaient pas capables de conférer à elles seules la protection optimale de l'animal naïf face à une infection aiguë localisée. De façon intéressante, il a été montré par microscopie confocale que les $T_{RM} CD8^+$ de l'épiderme présentaient une morphologie similaire à celle des DCs leur permettant ainsi de « patrouiller » et de scanner efficacement leurs tissus hôtes en vue de détecter des cellules infectées (Ariotti et al., 2012; Gebhardt et al., 2011). D'autres modèles de challenge avec différents pathogènes montrèrent que les T_{RM} étaient bien la sous-population de lymphocytes T $CD8^+$ mémoires à l'origine de la protection de différents types d'organes (Ariotti et al., 2014; Schenkel et al., 2014; Wu et al., 2014). Une étude intéressante s'appuyant sur un modèle d'immunisation par voie intravaginale avec des pseudovirus HPV (virus du papillome humain) utilisés en tant que vecteurs, montra qu'une partie des lymphocytes T $CD8^+$ induits et spécifiques de ce pathogène étaient des T_{RM} polyfonctionnels et avaient une forte capacité cytotoxique (Çuburu et al., 2012). En effet, parmi les $T_{RM} CD8^+$ présents au niveau de la muqueuse du col de

l'utérus près du vagin et producteurs de cytokines, une grande majorité (61 %) s'avéra être des doubles producteurs de cytokines essentiellement de l'IFN- γ et du TNF- α .

Très récemment dans une autre étude du même premier auteur (Çuburu et al., 2015), l'utilisation d'un vecteur HPV exprimant des glycoprotéines de HSV-2 (virus de l'herpès de type 2) et injecté par voie intravaginale conforta les observations faites dans l'étude précédente sur la fonctionnalité des T_{RM} induits. En effet, les T_{RM} CD8⁺ spécifiques de HSV-2 au niveau de la muqueuse vaginale furent identifiés comme étant des producteurs d'IFN- γ et de TNF- α pour 37 % des cellules productrices de cytokines après un challenge intravaginal avec HSV-2. Ces résultats montrent donc que la polyfonctionnalité des T_{RM} contribue à leur conférer un rôle clé dans l'éradication *in situ* d'un pathogène infectant un tissu périphérique non lymphoïde. La démonstration croisée de la protection d'un tissu par des T_{RM} spécifiques d'un pathogène ayant un autre point d'entrée a été notamment investiguée en administrant par voie intranasale HSV-2 conduisant à terme à l'induction de T_{RM} CD8⁺ spécifiques de HSV-2 au niveau de l'appareil génital capables de conférer une protection précoce et robuste après un challenge intravaginal avec HSV-2 (Sato et al., 2014). Enfin, une étude démontra que la voie d'infection contribue de manière critique à favoriser ou non la génération de cellules mémoires protectrices (Sheridan et al., 2014). En effet, en utilisant une méthode d'administration par voie orale de Lm, Sheridan et ses collègues mirent en évidence la génération de fortes réponses T CD8⁺ au sein de l'intestin définissant ainsi une population de T_{RM} CD8⁺ critique et indispensable pour une protection secondaire.

En parallèle d'agir en première ligne directement dans le contrôle d'une infection des cellules du tissu hôte via leurs fonctions cytotoxiques, il semble que les T_{RM} pourraient également interagir avec d'autres types cellulaires pour les activer en vue de collaborer avec eux dans l'établissement à long terme d'une protection tissulaire robuste. Supportant cette hypothèse, il a été montré que lorsque les T_{RM} sécrétaient de l'IFN- γ cela avait pour conséquence d'augmenter l'expression au niveau de l'endothélium de VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) impliquée dans le recrutement des lymphocytes T CD8⁺ mémoires circulants et des lymphocytes B au niveau du site de résidence des T_{RM} (Schenkel et al., 2014). De plus, l'apport d'IFN- γ par les T_{RM} au sein de la peau a pu être démontré comme étant la conséquence de l'augmentation rapide de l'expression de plusieurs gènes antibactériens et antiviraux (Ariotti et al., 2014). Enfin, la réactivation de T_{RM} présents au niveau de l'appareil reproducteur femelle a pu être montrée comme étant à l'origine d'une maturation anticipée des DCs ainsi que d'une activation des NKs via une sécrétion cytokinique (Schenkel et al.,

2014). Tous ensembles, ces mécanismes de régulation qui requièrent la participation des T_{RM} dans le but de déclencher une protection antivirale locale assurent le maintien de l'intégrité cellulaire périphérique de l'hôte.

C. Facteurs influençant l'établissement de la réponse mémoire T CD8⁺

La génération des populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires repose sur un équilibre dosé de plusieurs paramètres conditionnant à terme la capacité fonctionnelle et l'efficacité protectrice de ces cellules au cours non seulement de leur développement, mais également tout au long de leur vie. Dans cette partie nous nous intéresserons plus particulièrement à deux types de signaux : les signaux inflammatoires (signal 3) et l'aide procurée par les lymphocytes T CD4⁺.

1. Rôles du contexte inflammatoire

Un principe émergent tend à se généraliser en ce qui concerne l'impact de l'inflammation sur la génération de cellules mémoires : plus les niveaux d'inflammation et d'antigène sont importants plus la proportion de lymphocytes T effecteurs de courte durée de vie augmente par rapport à celle des lymphocytes T mémoires (Badovinac et al., 2004; Joshi et al., 2007; Obar et al., 2011). Faisant écho à ce principe, il a été montré que pendant des infections chroniques, où le niveau d'antigène mais également le niveau d'inflammation demeurent persistants, les cellules mémoires non spécifiques ne se forment pas (Wherry, 2011). Donc en abolissant la réplication du pathogène et par voie de conséquence en réduisant la persistance de l'antigène et de l'inflammation générée, on se retrouve dans un contexte favorable à l'établissement d'une mémoire, ce qui fut démontré par la génération de T_{CM} (Badovinac et al., 2004).

Comme mentionné précédemment, les signaux inflammatoires ont une influence critique sur la modulation et l'intensité des réponses des lymphocytes T CD8⁺. Il a été montré que l'IL-12 est une des cytokines régulatrices majeures impliquée dans la formation des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs, mais qu'elle est aussi capable de réguler négativement la génération de populations mémoires (Pearce and Shen, 2007). En effet, en utilisant un modèle de souris déficientes pour l'IL-12 les auteurs ont pu montrer que les souris étaient beaucoup plus

résistantes à une réinfection par Lm-OVA mais également que ces souris présentaient beaucoup plus de précurseurs mémoires au sein de leur pool de lymphocytes T CD8⁺ effecteurs. D'autres études mirent en avant le rôle important de la signalisation par l'IL-2 dans la formation des lymphocytes T effecteurs de courte durée de vie (Kalia et al., 2010; Pepper et al., 2011; Pipkin et al., 2010). Au contraire, STAT3 (signal transducer and activator of transcription)-SOCS (suppressor of cytokine signalling) ainsi que la signalisation par l'IL-10 semblent protéger les lymphocytes T des stimuli inflammatoires ce qui permettrait de promouvoir la formation d'une mémoire (Cui et al., 2011). Ces résultats tendent à démontrer qu'à différentes étapes de la vie d'un lymphocyte T CD8⁺ effecteur, des signaux notamment inflammatoires peuvent moduler la programmation de la destinée de celui-ci. Le choix de la destinée d'un lymphocyte T CD8⁺ effecteur reste quelque peu flexible du moins jusqu'à l'acquisition de caractères phénotypiques le définissant comme différencié à un stade ultime et dont le destin, une fois la réponse immunitaire terminée, est de mourir.

De manière intéressante une étude chez l'homme montra qu'au niveau des lymphocytes T CD8⁺, l'IL-12 induisait une différenciation vers un phénotype s'apparentant à celui des T_{EM} alors que les interférons de type I favorisaient la formation des T_{CM} (Ramos et al., 2009). Ces résultats pourraient sous-entendre que différentes CPAs ou des microenvironnements activateurs seraient impliqués dans l'engagement vers une population mémoire plutôt que vers une autre. D'ailleurs, la plupart des cellules du système immunitaire sont capables de « ressentir » les variations de leur environnement et donc de s'alerter en cas de rupture de l'intégrité de l'organisme. Ce mécanisme participe fortement à la mise en place de signaux inflammatoires plus ou moins forts et il est relié à la présence de TLRs à la surface des cellules qui vont pouvoir détecter des signaux de danger provenant de particules de microorganismes et ainsi engager des signalisations intrinsèques et extrinsèques pour endiguer, via la coopération cellulaire, le problème (Hervas-Stubbs et al., 2007).

Les cytokines pro-inflammatoires ont été montrées comme étant impliquées dans le façonnage des phases d'amplification et de contraction des lymphocytes T CD8⁺ primaires à travers l'accroissement de la survie des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs ; et la magnitude du taux de conversion des cellules ayant survécu à la contraction et passant de la mémoire précoce à la mémoire tardive (Haring et al., 2006; Mescher et al., 2006). A titre d'exemples, plusieurs études ont montré que les signaux provenant des interférons de type I, de l'IL-12 et de l'IFN- γ peuvent agir directement sur les lymphocytes T pour engager une amplification optimale des effecteurs ainsi qu'une meilleure survie (Badovinac et al., 2000; Curtsinger et

al., 2003; Haring et al., 2005; Kolumam et al., 2005; Mullen et al., 2001; Whitmire et al., 2005). De façon intéressante, il a été montré que la nature du pathogène engage la production d'un type de cytokine inflammatoire plus qu'un autre conditionnant ainsi la réponse des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs (Way et al., 2007).

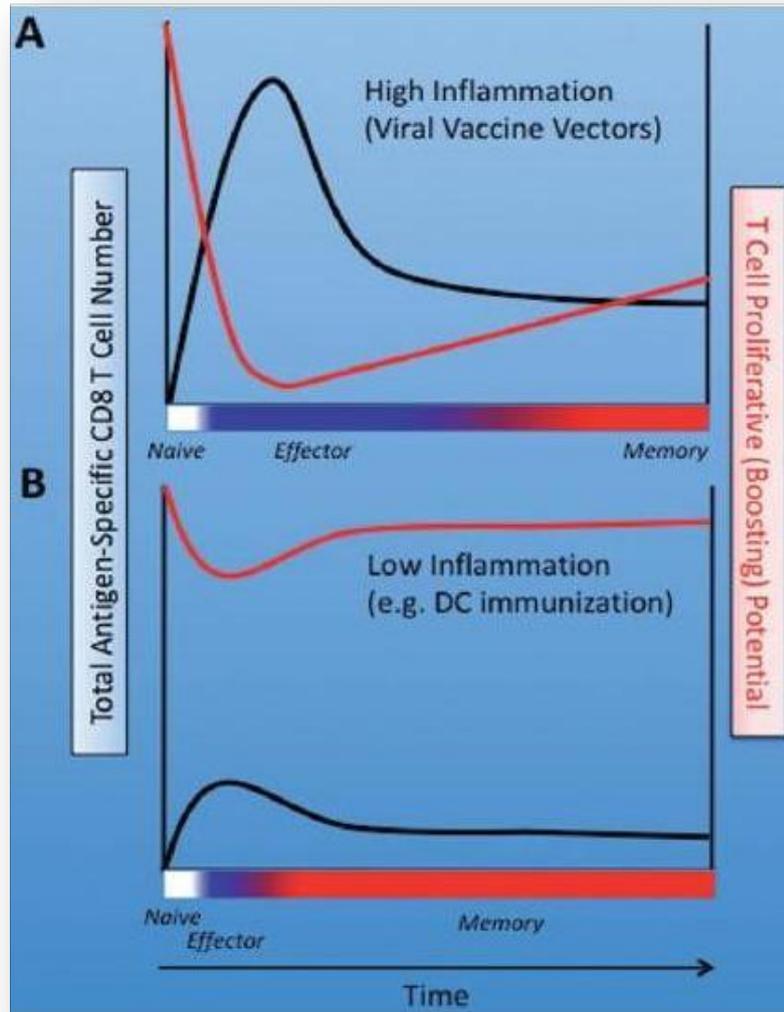


Figure 9 : L'inflammation parallèle à l'activation du lymphocyte T CD8⁺ régule le taux pour lequel les cellules T CD8⁺ induites acquièrent un potentiel prolifératif.

A. A la suite d'une immunisation avec un vecteur virulent (vecteur viral par exemple), une forte inflammation systémique permet d'accroître la survie des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs spécifiques de l'antigène conduisant à une phase effectrice de longue durée (en bleu) et une relative augmentation de l'accumulation des lymphocytes T CD8⁺ mémoires. Dans ce contexte, il apparaît une « période réfractaire » (entre quelques semaines et plusieurs mois) au cours de laquelle la majorité des lymphocytes T CD8⁺ induits et spécifiques de l'antigène ne peuvent pas être stimulés de nouveau et accèdent à la phase mémoire tardivement. **B.** L'immunisation avec des particules immunogènes amène à présenter de manière croisée aux lymphocytes T CD8⁺ des antigènes exogènes dans un environnement de faible inflammation. Les cellules T CD8⁺ issues bien qu'en nombre relativement faible, passent par une phase effectrice condensée et arborent rapidement des caractéristiques de lymphocytes T CD8⁺ mémoires tardifs. Dans ce contexte, les lymphocytes T CD8⁺ sont capables de répondre à un nouveau boost dans les 4 à 5 jours suivant leur activation. D'après *Butler et al., Cellular Microbiology, 2011.*

Bien que l'exposition à une forte inflammation pendant l'activation des lymphocytes T CD8⁺ conduise à une plus large capacité de réponses, cette inflammation comme vu précédemment impacte de manière négative la génération de populations mémoires tardives et par conséquent diminue potentiellement l'efficacité d'un boost pour la réponse secondaire. Des travaux ont avancé la théorie que l'apport d'une particule immunogène en absence d'inflammation systémique mesurable accélère de manière significative le niveau pour lequel les lymphocytes T CD8⁺ présentent des caractéristiques de mémoire tardive (Badovinac et al., 2005; Pham et al., 2009). En effet, Badovinac *et al.* ont montré que des DCs qui ont mûri *in vitro* avec soit du LPS (lipopolysaccharide), soit des CpG ou soit du LPS + CpG ont toutes réussi après immunisation à activer des lymphocytes T CD8⁺ leur conférant un phénotype de cellules mémoires précoces et ayant un potentiel prolifératif élevé car capables de subir une forte amplification secondaire 6 jours après leur activation. De manière intéressante, l'injection de CpG 3 jours après avoir injecté ces-mêmes DCs, qui ne sont plus détectables, empêche encore la formation de lymphocytes T CD8⁺ mémoires précoces suggérant que les CpG n'agissent pas au travers des DCs préalablement injectées. Pour autant, les lymphocytes T CD8⁺ ne semblent pas exprimer TLR9 qui est le récepteur des CpG (Wagner, 2002) ce qui soulève la notion en concordance avec les résultats précédents que des cytokines inflammatoires puissent être induites par les CpG et agir sur les lymphocytes T CD8⁺ empêchant leur acquisition rapide de caractéristiques de cellules mémoires (Badovinac and Harty, 2006). Alors que les lymphocytes T CD8⁺ expriment des récepteurs pour une large quantité de cytokines inflammatoires, l'IFN- γ semble être le principal « suspect » empêchant la transition rapide du phénotype effecteur au phénotype mémoire. En effet, dans un modèle de souris déficientes pour le récepteur II à l'IFN- γ , un traitement avec des CpG n'a eu aucun effet sur l'établissement d'une réponse T CD8⁺ mémoire (Pernis et al., 1995).

Une étude récente sortie dans la littérature en 2013 a montré que le microenvironnement dans lequel évolue un lymphocyte T CD8⁺ influence le type de cellules filles qu'il donnera après l'amplification et la contraction clonales (Plumlee et al., 2013). Ainsi, pendant une infection par VSV qui génère un milieu pauvre en signaux pro-inflammatoires, la différenciation des clones de lymphocytes T CD8⁺ effecteurs a été montrée comme convergente vers des phénotypes de cellules effectrices précurseurs mémoires et de cellules effectrices précoces. Au contraire, pendant une infection par Lm qui génère un milieu riche en signaux pro-inflammatoires, une grande majorité des clones cellulaires a été montrée comme ayant acquis une différenciation vers un phénotype de cellules effectrices de courte durée de vie. Cela

indique donc que la nature du milieu cytokinique, induit par différentes infections, et d'autres signaux externes sont des modulateurs de l'établissement d'un type de réponse mémoire T CD8⁺.

Collectivement, ces résultats tendent à démontrer que le signal 3 reçu par un lymphocyte T CD8⁺ naïf au moment de son activation par une DC et impliquant la sécrétion de cytokines inflammatoires dans son environnement, pourrait être à fortes doses un signal contradictoire à l'établissement d'une mémoire précoce avec des cellules ayant un fort potentiel prolifératif et réactivables rapidement après la première rencontre avec l'antigène. Bien entendu, il ne faut pas tirer de conclusions hâtives en pensant que l'absence de conditions inflammatoires améliore la génération de cellules mémoires ; ce qui mettrait en doute l'utilité de l'inflammation dans les méthodes de vaccination actuelles. En effet, l'activation de lymphocytes T CD8⁺ en absence totale d'inflammation conduit à l'établissement d'une tolérance et/ou d'une délétion clonale (Redmond and Sherman, 2005).

2. Rôles des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires

a. Impacts sur la mémoire T CD8⁺ systémique

Bien que ce soit un fait établi dans de nombreux modèles que les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires sont importants dans la mise en place de la mémoire des cellules T CD8⁺, il existe pourtant plusieurs études dans la littérature qui apportent des controverses à ce sujet. Certaines études indiquent que les réponses primaires des lymphocytes T CD8⁺ sont dépendantes de l'aide fournie par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires qui conditionnent alors leur développement en populations mémoires (Novy et al., 2007). D'autres études avancent plutôt l'argument que seules les réponses secondaires ou mémoires des lymphocytes T CD8⁺ sont dépendantes des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (Belz et al., 2002; Janssen et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003; Sun and Bevan, 2003). Le timing d'intervention des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires fait également débat. En effet, des travaux montrent que les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires sont nécessaires au moment de l'activation des lymphocytes T CD8⁺ pour leur garantir une amplification efficace lors d'une réponse secondaire, mais inutiles lors de leur amplification primaire (Janssen et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003). D'autres travaux rapportent que la présence des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires est requise pendant la maintenance de la phase mémoire (Matloubian et al., 1994; Sun et al., 2004). Certains agents

infectieux ont été identifiés comme générant une mémoire indépendante des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (Marzo et al., 2004; Xu et al., 2004), mais ce mécanisme reste pour le moment inconnu. Comme dit précédemment, il a été établi qu'une déficience en lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires conduit en la génération d'une population de cellules mémoires ressemblant aux T_{EM} et ayant une faible capacité de réponse proliférative face à un nouveau challenge, voire dans certains cas à l'expression du récepteur de mort, Trail (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) (Badovinac et al., 2006; Janssen et al., 2005). Un mécanisme proposé dans le contexte de l'assistance précoce des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires soutient que ces derniers aideraient les DCs à activer plus rapidement les lymphocytes T CD8⁺ naïfs en améliorant leur chimiotactisme (Castellino et al., 2006). Bachmann *et al.* (Bachmann et al., 2004) montrèrent qu'il existe des évidences que les anticorps de haute affinité, produits par la coopération des lymphocytes B et des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires, puissent de manière indirecte aider au développement des lymphocytes T CD8⁺ mémoires. Ensemble ces deux dernières études (Bachmann et al., 2004; Castellino et al., 2006) apportent comme évidence que les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires peuvent également soutenir la génération de lymphocytes T CD8⁺ mémoires de manière indirecte. Enfin il est à noter que les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires jouent également le rôle indirect de pourvoyeurs de signal 3 par l'intermédiaire des DCs en stimulant celles-ci pour qu'elles déclenchent le développement en cellules effectrices et mémoires des lymphocytes T CD8⁺. Pour autant ce rôle des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires peut être contourné si les DCs sont directement stimulées par les ligands des TLRs qu'elles expriment à leur surface.

Une étude basée sur une immunisation utilisant une combinaison de poly I:C (acide polyinosinique:polycytidylique), qui est un agoniste du TLR3, et un anticorps agoniste du CD40, montra la génération de lymphocytes T CD8⁺ mémoires de manière totalement indépendante de la participation des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (Edwards et al., 2013). Ces cellules mémoires étaient capables de protéger efficacement contre des challenges infectieux mais leurs caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques n'étaient en rien comparables à celles des cellules mémoires générées par d'autres formes d'immunisations s'appuyant sur la dépendance des lymphocytes T CD8⁺ aux lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires pour leur acquisition du phénotype mémoire. Les auteurs démontrèrent que ce type d'immunisation créait des T_{CM} protecteurs même en présence de Blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1), qui est un facteur de transcription répresseur du promoteur de

l'IFN- β et est également associé à un phénotype de différenciation terminale et d'épuisement clonal (Crotty et al., 2010; Rutishauser et al., 2009).

L'aide apportée à la génération de lymphocytes T CD8⁺ mémoires a également été décrite comme dépendante de l'expression de la protéine CD40 à la surface des lymphocytes T CD8⁺, mais pour autant cette génération de cellules mémoires ne nécessitait pas l'expression de CD40 par les CPAs (Bourgeois et al., 2002). En effet, des cellules T CD8⁺ déficientes pour CD40 ne parviennent pas à acquérir une capacité proliférative et une sécrétion cytokinique accrues, caractéristiques des lymphocytes T mémoires, et ne sont pas en mesure de recevoir l'aide apportée par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires.

b. Impacts sur la mémoire T CD8⁺ des tissus périphériques

En ce qui concerne les T_{RM}, il a été montré que ces cellules mémoires reposaient pour leur développement sur un ensemble de signaux régulateurs bien définis (Mackay et al., 2013; Skon et al., 2013). Ces signaux apparaissent d'autant plus singuliers qu'ils sont en lien directement avec le microenvironnement tissulaire où résident les T_{RM}. Un des paramètres récemment étudié concerne l'influence des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires sur le développement des T_{RM} CD8⁺ à la suite d'une infection par le virus de la grippe des voies respiratoires et notamment du poumon chez la souris (Laidlaw et al., 2014). Dans cette étude, les lymphocytes T CD8⁺ associés au tissu arboraient un phénotype distinct des autres populations ayant la capacité de recirculer, à savoir de fortes expressions à leur surface de CD103, CD69, d'un récepteur aux chimiokines appelé CXCR3, et enfin une expression réduite de KLRG1. A la vue de ce phénotype, les auteurs associèrent ces caractéristiques aux T_{RM} CD8⁺ et voulurent connaître l'impact des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires dans leur formation en supprimant ces derniers par des anticorps déplétants. Ils constatèrent qu'en absence de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires les T_{RM} CD8⁺ n'étaient plus en mesure d'exprimer CD103, CXCR3 et CD69, marqueurs essentiels dans leur maintenance et rétention au sein du tissu et les différenciant des autres populations mémoires. De plus ces T_{RM} CD8⁺ n'avaient plus la capacité d'aller se positionner dans les épithéliums des voies respiratoires comme dans celui du poumon. Ils en conclurent que pour générer au sein du tissu infecté de véritables T_{RM} CD8⁺ CD103⁺, les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires étaient indispensables. Les auteurs allèrent plus loin en démontrant que le mécanisme par lequel les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires régulaient le développement optimal des T_{RM} CD8⁺ CD103⁺ reposait sur la

sécrétion d'IFN- γ dans le milieu proche des T_{RM}. Une des hypothèses faite serait que les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires fourniraient l'aide nécessaire à l'entrée des T_{RM} dans le tissu par leur sécrétion d'IFN- γ conditionnant de ce fait le microenvironnement. Un tel mécanisme a été démontré au niveau de l'établissement des réponses T CD8⁺ de la muqueuse vaginale où l'IFN- γ sécrété par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires était à l'origine de l'induction de ligands de CXCR3 présent à la surface des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs et leur permettant d'infiltrer le tissu (Nakanishi et al., 2009). Il est important de souligner que l'aide apportée par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires n'est primordiale qu'à la phase précoce de développement des T_{RM} CD8⁺ car ceux-ci une fois établis au niveau du tissu ne requièrent plus l'influence de cytokines telles que l'IFN- γ minimisant à ce stade l'impact des cellules T CD4⁺ auxiliaires. Laidlaw *et al.* (Laidlaw et al., 2014) montrèrent également que les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires étaient requis pour supprimer l'expression de T-bet et que cette perte d'expression conditionnait le développement optimal des T_{RM}. T-bet pourrait avoir un rôle de répresseur d'activation de gènes car en tant que facteur de transcription il est connu pour se lier à des régions régulatrices d'un gène clé dans le développement des T_{RM}, le gène Cd103. De plus, il a été montré que l'environnement tissulaire et notamment la présence de TGF- β permettait de supprimer l'expression de T-bet, ce qui corrélait avec une forte expression de ce facteur de transcription chez les lymphocytes T CD8⁺ ayant un défaut de localisation en absence d'aide des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires, et une protection moindre contre une nouvelle infection avec des variants du virus de la grippe.

La figure ci-dessous reprend l'impact des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires sur une réponse T CD8⁺ restreinte au tissu pulmonaire.

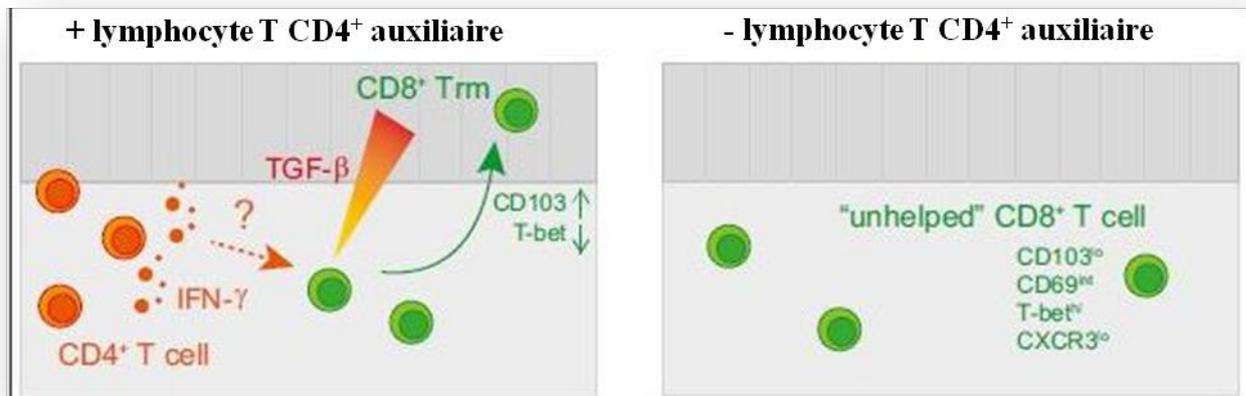


Figure 10 : Les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires participent à la formation des T_{RM} CD8⁺ du poumon.

Les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires sécrètent de l'IFN- γ , lequel conditionne le microenvironnement tissulaire et oriente la localisation des lymphocytes T CD8⁺ vers les épithéliums des voies respiratoires où ils sont sujets à une conversion en T_{RM} CD8⁺ sous l'influence de cytokines comme le TGF- β . Les cellules T CD8⁺ assistées des cellules T CD4⁺ expriment en grande quantité CD103, CD69, CXCR3 et très peu T-bet (à gauche). En absence de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires, les lymphocytes T CD8⁺ n'accèdent pas aux épithéliums des voies respiratoires. Les cellules T CD8⁺ sans assistance perdent la capacité d'expression de CD103, CD69 et CXCR3 mais expriment fortement T-bet (à droite). Adapté de Mackay and Carbone, *Immunity*, 2014.

L'importance des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires dans le développement des T_{RM} CD8⁺ a également été démontrée dans une autre étude où un vecteur HPV était injecté par voie intravaginale dans des souris (Çuburu et al., 2012). La déplétion quasi-complète des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires *in vivo* entraîna la perte totale de réponses T CD8⁺ spécifiques de HPV au niveau du tractus génital et de la rate. Néanmoins, quelques lymphocytes T CD8⁺ spécifiques furent détectés au sein des ganglions inguinaux présentant majoritairement des caractéristiques phénotypiques les apparentant aux T_{CM} CD8⁺. Ces résultats soulignent comme dans l'étude précédente que les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires ont un rôle critique dans l'induction de réponses effectrices et effectrices mémoires T CD8⁺ à la suite d'une immunisation avec des vecteurs HPV, mais pour autant on apprend ici que leur présence ne semble qu'en partie requise pour la génération de T_{CM} CD8⁺ dans les ganglions inguinaux.

Enfin, une étude intéressante montra que la nature du tissu infecté pouvait moduler l'influence des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires sur les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs pour leur développement en cellules mémoires (Jiang et al., 2012). En effet, dans un modèle d'infection de la peau par VV, les auteurs montrèrent que les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de VV étaient capables de proliférer au sein des ganglions lymphatiques drainants même en absence totale de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires. De plus, ils observèrent que l'accumulation de ces cellules T CD8⁺ spécifiques au sein de la peau n'était pas altérée malgré le fait que les cellules T CD4⁺ auxiliaires étaient manquantes. Au contraire, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques se retrouvèrent en plus grande quantité dans une peau de souris où les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires avaient été déplétés. En conclusion, l'accumulation des lymphocytes T CD8⁺ au sein de la peau après une infection avec VV n'est pas dépendante de la présence de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires ; ce qui apporte une nouvelle vision quant à l'utilité d'une assistance auxiliaire pour les lymphocytes T CD8⁺ se spécialisant dans la protection cutanée.

CHAPITRE 2 : La vaccination et le développement de nouvelles approches immunologiques

La vaccination, et plus particulièrement la capacité à manipuler le système immunitaire en vue de protéger un organisme contre un pathogène responsable d'une maladie, reste de nos jours l'une des plus grandes réussites de la recherche scientifique dans le domaine de la santé publique (André, 2003). La première tentative d'immunisation enregistrée eut lieu au cours du 16^{ème} siècle quand le concept de variolisation fut mis en place pour prévenir l'apparition de la variole (Plotkin, SL.; Plotkin, SA. *A short history of vaccination. In: Plotkin, SA.; Orenstein, WA.; Offit, PA., editors. Vaccines. Elsevier Inc; 2008. P. 1-16*). Cette méthode reposait sur le fait d'injecter des pustules de variole provenant d'un patient infecté dans des patients sains. Ce qui fut remarquable pour cette époque, c'est que ces tentatives d'injection précédaient toute connaissance au sujet de la microbiologie et de l'immunologie. La découverte capitale en vaccination fut faite en 1796 quand Jenner utilisa le virus de la variole chez les vaches comme vaccin contre le virus de la variole humaine. Ce fut très astucieux de sa part, d'autant plus qu'il avait pu observer le mécanisme de la mémoire immunologique car des vaches laitières ayant été infectées par le virus de la variole bovine furent épargnées par le virus de la variole humaine.

La vaccination moderne a su démontrer toute son efficacité jusqu'à l'éradication mondiale du virus de la variole humaine en 1977 (date du dernier cas recensé en Somalie), éradication confirmée en 1980 par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) (Breman and Arita, 1980). Pour autant, la vaccination telle qu'on la connaît aujourd'hui ne parvient toujours pas à être la réponse ultime face à des maladies infectieuses comme la malaria, le SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) ou encore la tuberculose. Enfin, le développement de vaccins dans le but de combattre les cancers et les maladies auto-immunes est devenu un objectif très recherché, ce qui constitue pour les années futures de nouvelles approches de recherche et développement dans le domaine de la vaccination.

A. Les différents types de vecteurs utilisés en vaccination

Le but de la vaccination est de conditionner le système immunitaire adaptatif d'un hôte en vue d'établir une mémoire immunologique robuste (voir Chapitre 1) capable de parer à toute invasion d'origine infectieuse et de conduire à l'éradication de pathogènes lorsque ceux-ci ont franchi l'intégrité cellulaire de l'hôte. Pour pouvoir moduler la mémoire immunologique, il faut pouvoir introduire au sein de l'hôte des agents ou particules infectieux susceptibles d'être analysés, mémorisés et reconnus par le système immunitaire adaptatif lors de nouvelles infections de même nature.

L'une des manières les plus aisées de le faire est d'injecter directement l'agent infectieux (inactivé, vivant atténué ou vivant recombinant) ou les particules infectieuses (protéines, fragments d'enveloppe, etc.) dans l'hôte par différentes voies d'immunisation ; méthode qui est couramment utilisée de nos jours en santé humaine dans le cadre de la prophylaxie primaire. La limite de cette méthode est qu'il est difficile d'anticiper le devenir de l'agent infectieux et d'estimer les différentes étapes conduisant à l'établissement d'une mémoire immunitaire protectrice ; c'est pour cela que différentes voies d'administration (voir Partie B.) sont considérées afin de moduler au mieux les réponses immunitaires. De plus, cette méthode repose surtout, en ce qui concerne les vaccins à base d'agents infectieux inactivés, sur la génération d'une réponse humorale produisant des clones de lymphocytes B mémoires capables de sécréter de grandes quantités d'anticorps de haute affinité lors de rencontres ultérieures avec un pathogène similaire de celui ayant initié la réponse primaire.

Une autre méthode consiste à utiliser des outils vaccinaux plus élaborés tels que des vecteurs permettant une intégration mieux contrôlée de l'agent infectieux au sein de l'hôte. Le choix du vecteur s'avère primordial puisqu'il doit à la fois tenir compte du type de pathogène, de la nature du tissu choisi comme site préférentiel d'infection par le pathogène, mais également de la nature de la réponse immunitaire adaptative induite (humorale, cellulaire ou les deux) faisant intervenir différents acteurs de la réponse mémoire. Bien entendu, la pénétration au sein de l'hôte de ce vecteur ne doit pas se faire au détriment de sa santé, et donc par conséquent, il ne doit pas être déclencheur de pathologies ou voire même létales. De plus, les réponses immunitaires générées à l'encontre du vecteur ne doivent pas interférer sur la mise en place et l'efficacité des réponses immunitaires spécifiques à un pathogène contre lequel on veut établir une protection (Casimiro et al., 2003; Quirk et al., 2008). En effet, ceci est souvent soulevé par des problèmes liés à la réutilisation d'un vecteur, ou l'utilisation de

vecteur dans des hôtes qui ont déjà été exposés au virus tels que les vecteurs pour le virus de la variole dans des hôtes immunisés auparavant. Enfin, la stimulation de l'immunité innée déclenchée par les vecteurs eux-mêmes (Ulmer et al., 2009; Zhu et al., 2007) représente également un facteur permettant d'accroître le potentiel des vecteurs vaccinaux. En tenant compte de tous ces paramètres, les techniques avancées de vaccination se sont focalisées sur l'utilisation de tels vecteurs pour transporter les agents infectieux à l'intérieur de l'hôte ; et ainsi élaborer une réponse immunitaire mémoire reposant sur la génération de cellules mémoires très spécifiques et capables de conférer une protection maximale, fondement essentiel du principe de la vaccination.

Il est aujourd'hui admis que ce sont majoritairement les réponses immunitaires adaptatives cellulaires et particulièrement les réponses impliquant des CTLs qui sont les meilleures garantes de la protection contre des infections virales ou des cancers. C'est donc logiquement que l'élaboration de vaccins vectorisés a pu se développer car ils sont capables de faire exprimer des antigènes hétérologues qui seront traités par les voies de transformation d'antigènes indispensables à l'activation des CTLs qui sont restreints à la reconnaissance de peptides chargés sur les molécules du CMH de classe I (Liu, 2010). Ce type de stratégie reposant sur l'utilisation de vecteurs ne doit pas être considéré comme étant seulement restreint à la réponse cellulaire laissant penser que la réponse humorale n'est pas une composante importante des vaccins vectorisés. En effet, ces vecteurs vaccinaux sont plutôt un moyen beaucoup plus sûr de générer des réponses cellulaires qui jusqu'ici étaient difficiles à stimuler sans l'utilisation de vaccin vivant atténué potentiellement dangereux pour l'hôte. Il y a presque 20 ans, il a été montré qu'il était possible d'introduire directement des protéines dans la voie de présentation d'antigène par les molécules du CMH de classe I, et ce grâce à l'utilisation de certaines particules (Oh et al., 1997) incluant les particules antigéniques de surface du virus de l'hépatite B (Schirmbeck et al., 1998). Pourtant on sait sans équivoque qu'il est bien plus réalisable de délivrer un gène codant pour une protéine donnée, source de l'antigène, dans des cellules telles que les DCs qui se chargeront d'apprêter l'antigène sous forme de peptides qui à terme seront chargés sur des molécules du CMH de classe I pour être présentés aux lymphocytes T CD8⁺ (Donnelly et al., 1997). De nombreuses techniques furent utilisées pour tenter de mimer ce mécanisme, la transfection de cellules entre autres, mais l'utilisation de vecteurs comme outils vaccinaux s'est avérée être le meilleur compromis en terme d'efficacité vaccinale générée par les réponses immunitaires mémoires et de risques pour l'hôte (Liu, 2010).

Le tableau ci-dessous récapitule les différents types de vecteurs utilisés en vaccination en fonction de leur nature, de leurs avantages et de leurs limites.

Vector	Potential Advantages	Issues/Concerns
Nucleic Acids		
Plasmid DNA	Licensed veterinary vaccines	Low human potency without heterologous boost
	Relatively generic construction and production	Use of delivery device or technology will increase complexity and cost
	Potent prime in animal studies	
RNA	Considered to have fewer safety regulatory issues than other vectors, e.g., no integration, no issue of autoimmunity	Instability; likely require formulation and/or delivery technology
	Facile production with high purity	
Viruses		
Poxviruses	Licensed veterinary vaccine vector	Possible issue of pre-existing immunity for vaccinia (smallpox) vaccinees
	MVA known clinical safety	Probably will need prime, increasing complexity and cost
	Room for large gene insert	
	Various strains available	
Adenovirus	Historic oral adenovirus vaccine	Pre-existing immunity to certain human strains may not preclude use as vectors, but results of HIV STEP trial need to be understood re: safety for high-titered vaccinees relative to subsequent risk of HIV infection if exposed
	Strong immune responses	Human Ad strains oncogenic in animals
	Many strains available	
Adeno-associated virus	Apparent efficacy as vector in small gene therapy trial for eye disease ^a	Disputed risk of integration
	Safety shown in small gene-Rx trials	Limited gene insert capacity
Alphaviruses	Virus particles or DNA replicons	Modest gene capacity
	High expression	
	No risk of integration because RNA particle can target DCs	
Herpes virus	Broad tropism including DCs	Neurotropism may be safety issue
		Possible pre-existing immunity
Measles virus	Mucosal delivery possible	Possible pre-existing immunity
	RNA virus (no integration issue)	
Vesicular stomatitis virus	Broad tropism including DCs	Neurotropism ^b may be safety issue
	High expression	
Bacteria		
Salmonella/Shigella	Oral delivery	Concern about heterologous gene if on plasmid
	Infect M cells (gut antigen uptake cells)	Potential stability of antigen gene if on plasmid
BCG	Extensive safety of BCG vaccine	Bacterial (versus mammalian) posttranslational modifications
Listeria	Efficient mechanisms for CTL induction	Concerns re: vector virulence in immunocompromised

Figure 11 : Exemples de vecteurs vaccinaux utilisés.

^a(Maguire et al., 2008) ^b(Johnson et al., 2007). D'après Liu, *Immunity*, 2010. Voir annexe 1 également.

Enfin, s'il existe une autre raison qui doit être citée comme étant importante et justifiant l'utilisation de vecteurs en tant qu'outils vaccinaux, c'est leur capacité à délivrer de manière ciblée les vaccins. En effet, comme discuté précédemment les vecteurs permettent d'insérer leur contenu au sein de la machinerie des voies de présentation d'antigène, mais aussi ils permettent de focaliser la distribution des antigènes au niveau de tissus et de cellules particuliers. Pour autant et comme c'est le cas des vecteurs dérivés d'adénovirus qui sont capables de cibler une large gamme de cellules, cette faculté pourrait être une limite à leur utilisation car ils atteignent également des cellules qui ne sont pas des CPAs spécialisées dans la présentation d'antigène telles que les hépatocytes (Arnberg, 2009). Des améliorations ont été apportées aux vecteurs pour qu'ils puissent atteindre des types particuliers de cellules ou pour qu'au contraire ils s'en éloignent ; et ceci en additionnant ou en supprimant des motifs de ciblage sur les vecteurs (Einfeld et al., 2001).

Bien qu'au niveau du développement clinique de vaccins vectorisés chez l'homme il demeure une certaine frustration suite à l'échec de l'utilisation d'un vaccin VIH (Buchbinder et al., 2008), il n'en reste pas moins que le potentiel des vaccins vectorisés semble énorme notamment grâce aux études précliniques et cliniques menées chez l'animal pour le développement de vaccins à usage vétérinaire (Bergman et al., 2003; Davis et al., 2001; Kurath, 2005; Liao et al., 2006; Turell et al., 2003).

Illustrant cet intérêt grandissant pour l'utilisation de vecteurs vaccinaux, une étude récente a démontré qu'un vaccin ADN contre VIH-1 vectorisé dans un plasmide était très efficace à générer des réponses humorales et cellulaires s'il était injecté de manière combinée en intradermique et en intramusculaire (Mann et al., 2014). Encore plus récemment, Çuburu et ses collègues ont à leur tour démontré l'efficacité d'un vaccin ADN contre HSV-2 vectorisé dans un vecteur HPV dans la génération de T_{RM} protecteurs au niveau du tractus génital femelle (Çuburu et al., 2015).

B. Les différentes voies d'administration en vaccination

L'introduction d'un vaccin au sein d'un hôte peut s'effectuer par différentes voies d'accès. Selon la localisation et la nature du tissu (ou organe) que l'on souhaite cibler car étant le site privilégié d'entrée d'un pathogène ou un site favorable à l'induction de réponses immunitaires systémiques robustes, le vaccin peut être administré par les voies suivantes : intramusculaire, sous-cutanée, intradermique, transcutanée, orale, intranasale, ou encore intravaginale.

Dans cette partie, il sera essentiellement discuté de deux des voies majoritairement utilisées en vaccination humaine et qui sont à la base de mon travail de thèse, à savoir les voies intramusculaire et intradermique.

La figure ci-dessous donne une vue d'ensemble des différentes techniques d'immunisation réalisées via la peau en vaccination, ainsi que leurs zones de diffusion.

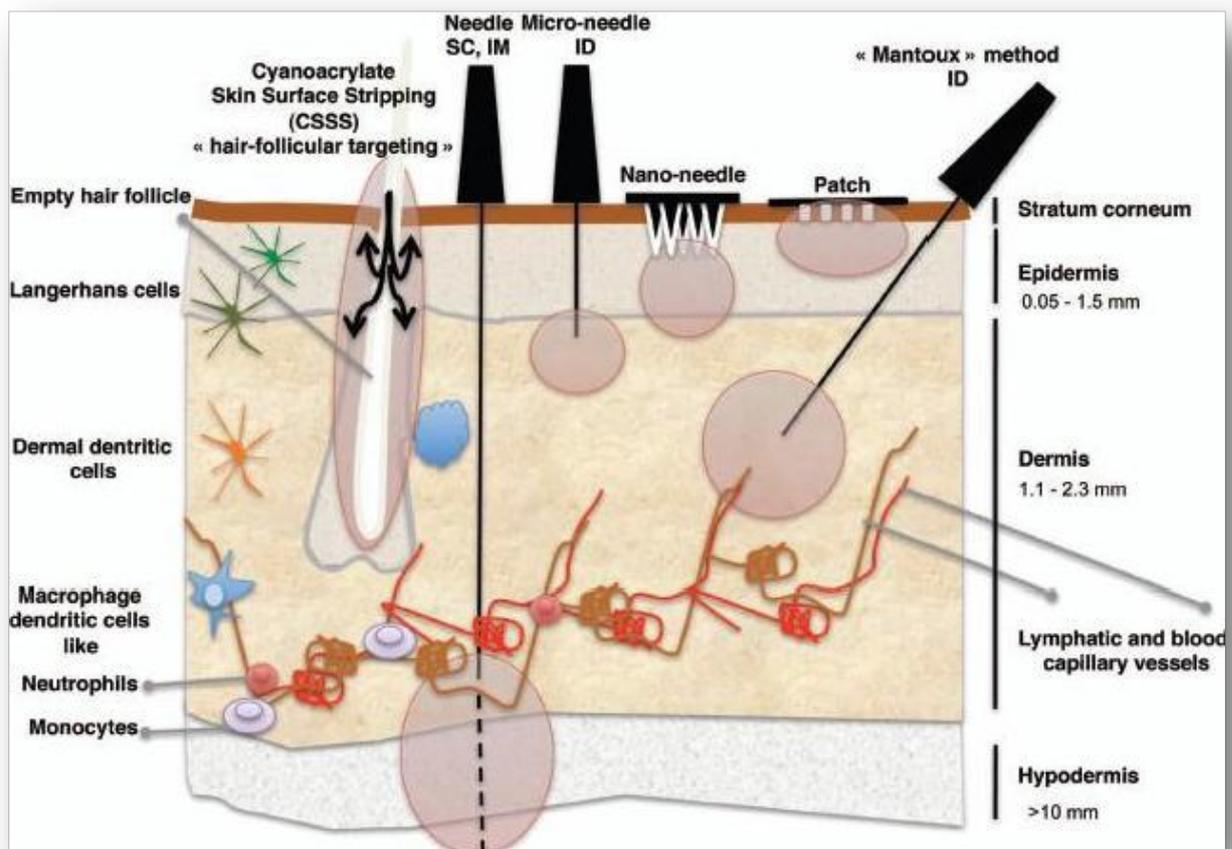


Figure 12 : Les différentes voies d'administration en vaccination.

SC : sous-cutanée, IM : intramusculaire, ID : intradermique. D'après *Combadiere and Liard, Human Vaccines, 2011*.

1. La voie intramusculaire

Pour atteindre le muscle, il faut pouvoir passer sous l'hypoderme ce qui nécessite l'utilisation d'une aiguille assez longue. Les seringues utilisées permettent d'injecter de larges volumes de solution vaccinale (> à 1 mL) (Nicolas and Guy, 2008). Cette voie d'administration cible le muscle squelettique et les fibres musculaires (myocytes) qui le composent. Elle contribue à l'attraction des leucocytes qui vont alors infiltrer le muscle sous l'influence de cytokines inflammatoires sécrétées au niveau du site de l'injection (Marino et al., 2011). De plus, récemment il a été montré que le muscle pouvait être aussi un lieu de résidence pour certaines CPAs qui seraient donc impliquées dans l'activation de l'immunité adaptative (Langlet et al., 2012).

a. Identification des cellules présentatrices d'antigène du muscle

Des travaux décrivent pour l'une des premières fois la capacité intrinsèque des myoblastes et des myocytes à pouvoir présenter des antigènes, caractéristique qui les apparentait à des CPAs non professionnelles (Marino et al., 2011). Si de nombreuses études, aussi bien dans des modèles de souris dystrophiques au muscle naturellement inflammé (Hartigan-O'Connor et al., 2001), d'inflammation du muscle (Brigitte et al., 2010; Liao et al., 2012; Tateyama et al., 2011) ou d'injections d'adjuvants (Awate et al., 2014; Calabro et al., 2011), ont pu faire état du faible nombre de DCs résidentes dans le muscle squelettique, une seule étude à ce jour c'est proprement attelée à les caractériser chez la souris démontrant des profils bien particuliers (Langlet et al., 2012). Dans cette étude, les auteurs identifiaient les CPAs du muscle squelettique comme étant des DCs conventionnelles et des Mo-DCs (DC dérivée de monocyte). Ils discriminaient ces deux sous-populations de DCs en fonction de leur expression de CD64, le récepteur pour les IgG de haute affinité aussi appelé Fc (fragment cristallisable) γ RI (van der Poel et al., 2011). A l'état basal, ils montrèrent que le muscle squelettique renfermait deux sous-populations de DCs conventionnelles et des Mo-DCs identifiées comme suit : les DCs interstitielles $CD45^+ CD11c^+ CMHII^+ CD24^{-\Delta+} CD11b^+ CD64^-$, les DCs interstitielles $CD45^+ CD11c^+ CMHII^+ CD24^{-\Delta+} CD11b^- Ly6C^- CD64^-$ et les Mo-DCs interstitielles $CD45^+ CD11c^+ CMHII^+ CD24^{-\Delta+} CD11b^+ Ly6C^+ CD64^+$. En utilisant la dépendance des monocytes au CCR2 pour leur différenciation (Serbina and Pamer, 2006) et le fait que les DCs conventionnelles ne sont pas soumises à cette dépendance, Langlet *et al.* ont

notamment clairement pu confirmer que les DCs $CD24^{-\text{à}+} CD11b^{+}$ du muscle étaient composées de Mo-DCs et de DCs conventionnelles. Les auteurs allèrent plus loin dans la caractérisation des DCs conventionnelles du muscle et montrèrent que les DCs interstitielles $CD24^{-\text{à}+} CD11b^{-}$ arboraient également un phénotype $CD207$ (langérine) $^{-} CD8\alpha^{\text{faible}} CD172\alpha^{-}$, et qu'environ la moitié d'entre elles exprimaient $CD103$. En revanche, les DCs interstitielles $CD11b^{+} CD64^{-}$ étaient $CD172\alpha^{+}$ mais n'exprimaient pas du tout $CD207$, $CD8\alpha$ et $CD103$. En tenant compte de ces caractéristiques phénotypiques les DCs interstitielles $CD24^{-\text{à}+} CD11b^{-}$ et les DCs interstitielles $CD11b^{+} CD64^{-}$ semblent respectivement s'apparenter aux DCs $CD8\alpha^{+}$ et aux DCs $CD11b^{+}$ décrites dans la littérature (Guilliams et al., 2010; Heath and Carbone, 2009; Helft et al., 2010).

En résumé grâce à cette étude (Langlet et al., 2012), trois types de DCs $CD11c^{+} CMHII^{+}$ ont pu être mis en évidence au sein du muscle squelettique : les DCs interstitielles de type $CD8\alpha^{+}$, les DCs interstitielles de type $CD11b^{+}$ et les Mo-DCs interstitielles.

b. Capacité d'induction de réponses immunitaires

Comme évoqué précédemment, les myoblastes et les myocytes ont pu être associés à des CPAs non professionnelles (Marino et al., 2011). En conditions physiologiques et standard, ni des fibres musculaires matures ni des myoblastes humains en culture ne sont capables d'exprimer les molécules du CMH de classe II. Dès lors que les conditions varient et que les cellules musculaires se retrouvent dans un milieu inflammatoire, elles se mettent à exprimer les antigènes du CMH de classe II. Ainsi des études ont rapporté une forte expression des molécules de HLA (antigène des leucocytes humains)-DR à la surface de fibres musculaires soumises à une inflammation chronique (polymyosite) (Bartoccioni et al., 1994; Englund et al., 2001; Wiendl et al., 2005). De plus, il a également été montré qu'une stimulation avec de l'IFN- γ seul ou en combinaison avec du TNF- α , induisait les expressions de HLA-DR et plus tardivement de HLA-DP et HLA-DQ sur des myoblastes humains en culture (Curnow et al., 1998; Nagaraju et al., 1998). Donc de par ces caractéristiques, les myoblastes humains sont considérés comme des CPAs non professionnelles capables de participer à l'activation et à la prolifération des lymphocytes T $CD4^{+}$ (Curnow et al., 2001; Goebels et al., 1992) ; mais n'ayant pas la capacité d'activer des lymphocytes T naïfs comme le feraient des CPA professionnelles telles que les DCs. En ce qui concerne l'induction de réponses cytotoxiques à travers la reconnaissance des molécules du CMH de classe I par les lymphocytes T $CD8^{+}$, il a

été montré que le muscle squelettique exprime à des niveaux très faibles les molécules du CMH de classe I en conditions physiologiques (Daar et al., 1984). En conditions inflammatoires, les fibres musculaires se mettent à exprimer les molécules du CMH de classe I. Ceci concorde avec l'observation, sur des coupes histologiques marquées, de l'infiltration de CTLs puis d'une régénération cellulaire avec des fibres musculaires centro-nucléées (Bender et al., 1995; Dalakas, 1991). Enfin, si l'on considère que la majorité des cellules transduites lors d'une vaccination par la voie intramusculaire sont des cellules musculaires, alors celles-ci vont se mettre à produire l'antigène qui sera ensuite capturé par des CPAs professionnelles, recrutées par des cytokines inflammatoires, pour être présenté via la présentation croisée d'antigène sur des molécules du CMH de classe I aux lymphocytes T CD8⁺ et activer leur capacité cytolytique (Rice et al., 2008).

La capacité de présentation d'antigène et d'induction de réponses immunitaires fut également évaluée pour les DCs résidentes du muscle squelettique décrites précédemment (Langlet et al., 2012). Dans le cadre d'un modèle de vaccination intradermique à l'aide d'un antigène protéique modèle (OVA) couplé à un adjuvant (Alum), Langlet et ses collègues montrèrent que les DCs CD11b⁺ CD64⁻ migratoires étaient les plus efficaces à présenter OVA aux cellules T CD4⁺. De manière intéressante, les trois populations de DCs migratoires possédaient la même capacité de présentation croisée d'OVA aux cellules T CD8⁺. Ces résultats tendent à démontrer donc que les DCs CD11b⁺ CD64⁻ migratoires, capables à la fois d'induire des réponses impliquant les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺, semblent faire partie des DCs résidentes du muscle squelettique impliquées dans une grande majorité des réponses des cellules T suite à une vaccination par voie intramusculaire.

2. La voie intradermique

La vaccination intradermique correspond à la distribution d'un antigène au niveau de la couche profonde de la peau, le derme. Pour réaliser cette injection, une seringue munie d'une micro-aiguille est nécessaire car la réussite de cette vaccination dépend fortement de la précision de l'injection. En effet, une vaccination intradermique mal réalisée peut s'apparenter à une vaccination sous-cutanée. La voie d'injection sous-cutanée, ou encore appelée voie de vaccination hypodermique correspond à une immunisation visant à atteindre le tissu adipeux entre les couches de la peau et le muscle, l'hypoderme. En plus des cellules adipeuses, l'hypoderme contient les glandes sudoripares. Le fait que cette zone ne contienne quasiment

pas de CPAs, contrairement à la peau, ne permet pas une activation efficace du système immunitaire, ce qui est donc un facteur limitant à une induction efficace de l'immunité adaptative.

La vaccination intradermique telle qu'elle est pratiquée aujourd'hui en santé humaine repose sur la technique développée par le physicien français Charles Mantoux en 1910 alors qu'il était en train de développer un test tuberculinique. Techniquement, cela consiste à introduire une seringue de calibre 26-27 dans la peau avec l'aiguille légèrement inclinée à 45°. Cette technique permet une injection de 100 à 200 µl de solution vaccinale, ce qui est beaucoup plus faible qu'une injection faite par voie intramusculaire. De plus, la difficulté d'exécution de cette technique, qui nécessite une bonne formation du praticien, associée à des effets indésirables tels que des sensations de douleur au point d'injection, ont marginalisé cette vaccination.

Néanmoins, la peau renferme de nombreuses cellules appartenant au système immunitaire et notamment des DCs spécialisées capables, une fois l'antigène capturé, de déclencher des réponses immunitaires robustes ; ce qui confère à la voie intradermique un avantage non négligeable lors du choix de la voie d'administration de vaccins.

a. Identification des cellules présentatrices d'antigène de la peau

Les populations principales de DCs dans la peau que l'on peut distinguer à la fois chez l'homme et la souris sont les LCs (cellule de Langerhans épidermique) et les dDCs (DC dermique). Chez les deux espèces, les LCs sont organisées en réseau continu à travers les kératinocytes épidermiques et peuvent être identifiées grâce à leur expression de la langérine (CD207), un récepteur de la famille des lectines de type C (Ginhoux et al., 2012; Teunissen et al., 2012).

Chez la souris, les dDCs sont représentées par les DCs résidentes du derme qui sont les DCs CD103⁺ et les DCs CD11b⁺, et on trouve également à cet endroit des LCs migratoires (Merad et al., 2008). Les DCs CD11b⁺ négatives pour la langérine constituent la majorité des dDCs (environ 70 % des DCs) résidentes du derme (Ginhoux et al., 2009). Les DCs CD103⁺ positives pour la langérine se situent juste en dessous de la jonction entre l'épiderme et le derme (Bursch et al., 2007). Outre ces deux populations de dDCs, une troisième a été identifiée et elle exprime à la fois le CMH de classe II et CD11c, mais pas CD11b, CD103 ou

la langérine (Ginhoux et al., 2009; Henri et al., 2010). A ce jour, le phénotype exact de cette population de dDCs n'est pas encore bien caractérisé (Ginhoux et al., 2012).

Au niveau de la peau chez l'homme, trois populations de DCs négatives pour la langérine ont été identifiées : les DCs CD1c⁺, les DCs CD14⁺ et les DCs CD141^{fort} (Haniffa et al., 2009, 2012; Nestle et al., 1993). D'après les caractéristiques de ces trois populations, il semblerait que les DCs CD141⁺ s'apparentent aux DCs CD8 α ⁺/CD103⁺, les DCs CD1c⁺ aux DCs CD11b⁺, et pour les DCs CD14⁺ les évidences sont moins claires mais elles pourraient être proches des monocytes chez la souris (Schlitzer and Ginhoux, 2014).

Enfin, au niveau des parties superficielle et basale de l'épiderme se trouvent également les kératinocytes qui peuvent se comporter comme des CPAs non professionnelles. En effet, il a d'abord été montré qu'ils pouvaient exprimer les molécules du CMH de classe II à leur surface lors d'études sur la maladie du greffon contre l'hôte (Nickoloff and Turka, 1994). Puis faisant suite, des études ultérieures ont également démontré la capacité des kératinocytes à exprimer les molécules du CMH de classe II notamment dans des pathologies de troubles de la peau caractérisées par une infiltration massive des cellules T (Nickoloff and Turka, 1994). De plus, il a été montré que l'IFN- γ peut stimuler *in vitro* l'expression du CMH de classe II sur des cultures primaires de kératinocytes humains et sur des lignées cellulaires de kératinocytes immortalisées (Nickoloff and Turka, 1994).

La figure ci-dessous reprend les différentes populations de CPAs de la peau, chez la souris, ainsi que leurs localisations.

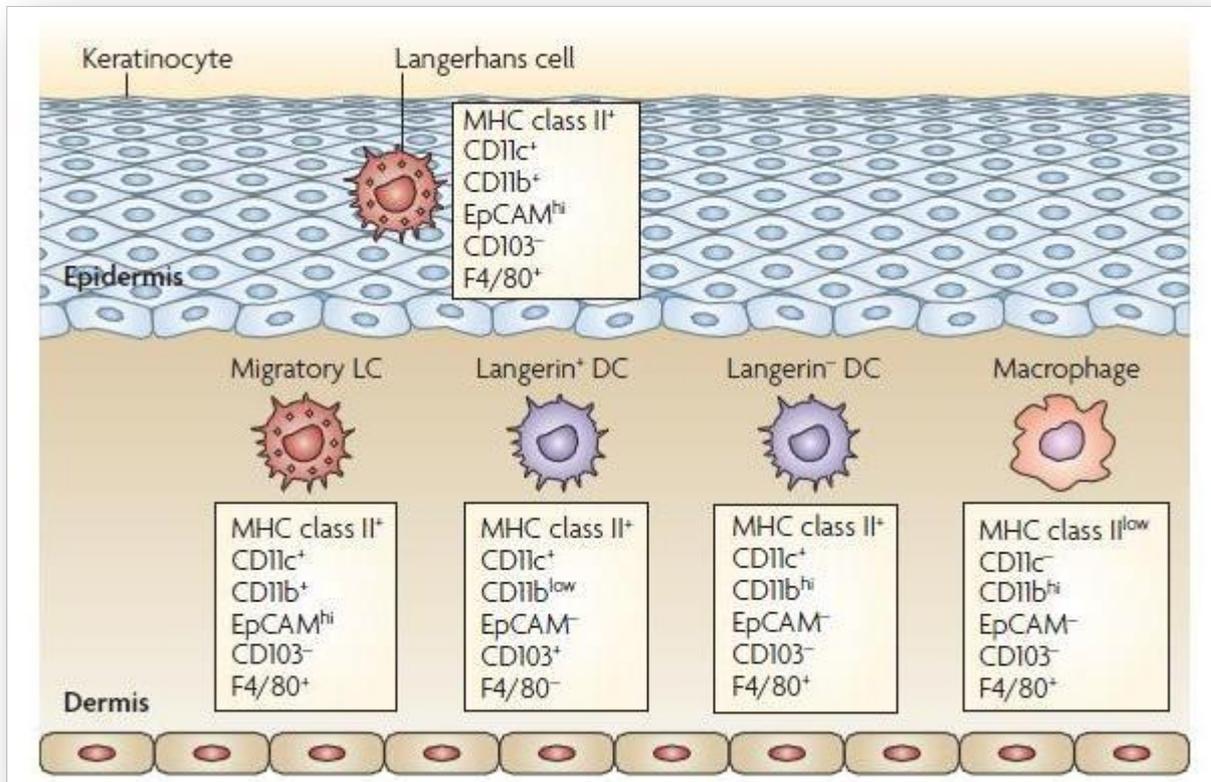


Figure 13 : Phénotypes des cellules présentatrices d'antigène de la peau chez la souris en conditions physiologiques.

La peau renferme deux populations principales de DCs positives pour la langérine : les LCs dans l'épiderme et les DCs langérine⁺ dans le derme. Les LCs migratoires peuvent se retrouver également dans le derme afin de rejoindre les ganglions lymphatiques via les vaisseaux afférents. Les LCs et les dDCs langérine⁺ peuvent être discriminées par leur expression de CD11b, d'EpCAM (epithelial-cell adhesion molecule) et de CD103. La peau contient également deux types supplémentaires de CPAs : les dDCs langérine⁻ et les macrophages du derme. Les dDCs langérine⁻ et les macrophages du derme sont similaires aux dDCs langérine⁺ et peuvent se retrouver dans d'autres tissus que le derme, alors que les LCs sont uniquement présentes au sein de l'épiderme. D'après Merad *et al.*, *Nature Reviews Immunology*, 2008.

b. Capacité d'induction de réponses immunitaires

Chez la souris, les DCs CD11b⁺ résidentes du derme ont été identifiées comme étant les principales instigatrices de l'induction de réponses immunitaires par les lymphocytes T CD4⁺, mais pour autant toutes les dDCs sont capables de présenter des antigènes viraux (Bedoui et al., 2009). Il a également été montré que les DCs CD11b⁺ favorisent la prolifération locale des lymphocytes T effecteurs et des Tregs (McLachlan et al., 2009). Dans la différenciation en Th1/Th2 des cellules effectrices, les DCs CD103⁺ sont impliquées dans l'induction de réponses de type IgG2a/c et IgG2b, alors que les LCs interviennent dans la génération de réponses humorales basées sur la sécrétion d'IgG1 (Nagao et al., 2009). Une caractéristique unique des DCs CD103⁺, est qu'elles sont les seules DCs à pouvoir présenter de manière croisée un antigène aux lymphocytes T CD8⁺ en vue de les activer (Bedoui et al., 2009). Par ailleurs, il a été montré que les dDCs CD207⁺ CD103⁺ étaient aptes à présenter de manière croisée des antigènes dérivés de produits d'expression provenant de kératinocytes, et ce indépendamment de la présence de LCs (Henri et al., 2010).

Chez l'homme, plusieurs études ont souligné la capacité des DCs CD14⁺ à induire une réponse de type Th1 biaisée (Klechevsky et al., 2008, 2009) et à favoriser la sécrétion de grandes quantités d'immunoglobulines différentes (Caux et al., 1997; Klechevsky et al., 2008). Les DCs CD141^{fort} ont été caractérisées comme étant capables de présenter efficacement de manière croisée des antigènes exogènes aux lymphocytes T CD8⁺ périphériques (Haniffa et al., 2012).

L'implication des LCs est plus complexe car il leur a été attribué à la fois un rôle dans le maintien de la tolérance périphérique au sein d'une peau saine en y activant les Tregs résidents, mais également un rôle dans l'induction de l'activation des cellules T suite à une infection (Seneschal et al., 2012). A noter que leur rôle dans le maintien de la tolérance périphérique est d'autant plus difficile à analyser à cause des modèles disponibles qui résultent en une ablation de plusieurs populations de DCs à la fois (langerinDTR (diphtheria toxin receptor) vs langerinDTA (diphtheria toxin fragment A)). Chez l'homme, dans un contexte infectieux, les LCs ont démontré *in vitro* une capacité supérieure à déclencher une immunité antivirale en activant les lymphocytes T CD8⁺, et à développer des réponses de type Th17 (lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire capable de produire de l'IL-17) (van der Aar et al., 2011; Klechevsky et al., 2009; Mathers et al., 2009). Ceci est loin d'être le cas chez la souris où au contraire, *in vivo*, les LCs ne sont pas nécessaires et ce sont les dDCs langérine⁺ qui

sont impliquées dans le déclenchement des réponses anti-infectieuses (Henri et al., 2010; Seneschal et al., 2014). Enfin, une étude a montré que lorsque de la peau humaine ou murine était injectée par voie intradermique avec un vaccin élaboré à partir d'une particule, la morphologie des LCs était modifiée et elles se mobilisaient au niveau du derme. Les auteurs notèrent que ce recrutement des LCs à la suite d'une immunisation intradermique était nécessaire à l'induction des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène, mais pour autant pas essentiel à la génération de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques et d'anticorps neutralisants (Liard et al., 2011).

En ce qui concerne les kératinocytes, certains modèles *in vitro* et *in vivo* ont initialement suggéré qu'ils pourraient être responsables de l'induction de tolérance ou d'anergie des cellules T plutôt que de leur activation (Gaspari and Katz, 1991). Néanmoins, il a pu être constaté que les kératinocytes peuvent participer à la prolifération, sous l'influence d'un superantigène, des lymphocytes T anergiques, ce qui démontre qu'ils sont aptes à fournir les signaux nécessaires à la prolifération cellulaire sans toutefois avoir un véritable rôle de CPAs professionnelles (Nickoloff et al., 1993). Une étude intéressante montra que les kératinocytes pourraient induire des réponses fonctionnelles au sein de populations de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ mémoires spécifiques (Black et al., 2007). En effet, ils pourraient apprêter l'antigène et le présenter aux lymphocytes T CD4⁺ qui deviennent alors les médiateurs de la production de cytokines de type Th1 et de type Th2. Les auteurs montrèrent que les kératinocytes pourraient également apprêter des peptides viraux endogènes ou exogènes et les présenter directement ou de manière croisée aux lymphocytes T CD8⁺ chargés de la production de cytokines pro-inflammatoires et de la lyse spécifique des cellules cibles, celles-ci étant ici les kératinocytes eux-mêmes. Donc cette étude apporte une nouvelle vision sur les capacités des kératinocytes qui bien que n'étant pas capables d'activer des cellules T naïves comme peuvent le faire des DCs, peuvent réactiver des cellules mémoires qui pourront initier une réponse anamnésique. Cette vision du rôle des CPAs au sein de la peau en tant que réactivatrices de cellules mémoires spécifiques est aussi discutée dans une revue récente (Malissen et al., 2014), où par exemple des kératinocytes ou des DETCs (dendritic epidermal $\gamma\delta$ T cell) ont pu participer à la réactivation de T_{RM} CD8⁺ de l'épiderme lors d'une réinfection avec HSV-1 (Wakim et al., 2008).

C. Les vecteurs recombinants dérivés de l'AAV

1. Origine et caractéristiques de l'AAV sauvage

L'AAV (virus adéno-associé) sauvage a été découvert pour la première fois sous forme de petites particules virales uniformes suite à l'observation par microscopie électronique d'une préparation d'un adénovirus simien de type 15 (Atchison et al., 1965). Puis deux ans plus tard, des AAVs ont pu être directement isolés au sein d'échantillons humains (Blacklow et al., 1967). L'AAV est un virus à ADN simple brin appartenant à la famille des *Parvoviridae* et à la sous-famille des *Parvovirinae*, et les différents sérotypes d'AAV décrits chez les primates (Gao et al., 2004) identifient le genre des *Dependovirus* (Brown, 2010). Comme déjà suggéré par Atchison et ses collègues en 1965, il a été montré que l'AAV ne peut pas enclencher sa phase de réplication de manière autonome au sein d'une cellule. En effet, pour que sa réplication soit efficace cela nécessite la présence d'un virus auxiliaire avec lequel il va co-infecter une cellule. Les virus les plus fréquemment décrits comme étant auxiliaires de l'AAV pour sa réplication lors d'infections sont les adénovirus, HSV-1 et 2 et HPV (Buller et al., 1981; Schlehofer et al., 1986; Thomson et al., 1994; Walz et al., 1997). En absence de virus auxiliaire, la réplication de l'AAV est très limitée, l'expression des gènes viraux est réprimée. L'AAV de sérotype 2 (AAV2), premier sérotype à avoir été cloné en 1982 (Samulski et al., 1982), déclenche alors sa propre mise en latence en s'intégrant dans le chromosome 19 au locus q13.4 appelé AAVS1 (Kay et al., 2000; Kotin et al., 1990), s'établissant ainsi comme l'unique ADN de mammifère connu capable d'opérer une intégration à un site spécifique, on parle d'intégration site-spécifique. Il a été montré que 40 à 70 % des intégrations s'effectuent au niveau d'AAVS1 (Daya and Berns, 2008). Le génome de l'AAV2 est linéaire, composé d'un ADN monocaténaire de 4,7 kb (kilobases) (Srivastava et al., 1983). Le génome est caractérisé par deux ITRs (répétition terminale inversée) composées de 145 bp (paires de bases) qui encadrent deux ORFs (cadre de lecture ouvert). Le rôle majeur des ITRs est d'assurer le bon fonctionnement de la réplication de l'ADN de l'AAV ainsi que son encapsidation. En effet, l'ITR est le point d'origine de la réplication et sert d'amorçage (« primer ») dans la synthèse du second brin d'ADN par l'ADN polymérase. L'ORF gauche contient le gène Rep qui code pour la synthèse de quatre protéines Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40. Rep78 et Rep68 régulent positivement et négativement l'expression du gène de l'AAV que ce soit en présence ou en absence de virus auxiliaire, et elles sont indispensables à

la réplication de l'ADN (Pereira et al., 1997). Rep52 et Rep40 quant à elles sont impliquées dans l'accumulation d'ADN viral monocaténaire utilisé pour le conditionnement au sein des capsides d'AAV. D'ailleurs, l'absence des protéines Rep a été montrée comme conduisant à une intégration de l'AAV à la fois inefficace et aléatoire. Il est cependant reconnu que les cellules peuvent être efficacement transduites avec des vecteurs AAV sans exiger de processus d'intégration. Ceci est rendu possible par la formation de molécules d'ADN circulaires concatamériques et monomériques associées à des épisomes (Penaud-Budloo et al., 2008). L'ORF droite contient le gène Cap qui code pour la synthèse de trois protéines de la capside virale VP1, VP2 et VP3. La capside de l'AAV2 comprend soixante protéines de capside virale arrangées dans une structure icosaédrique.

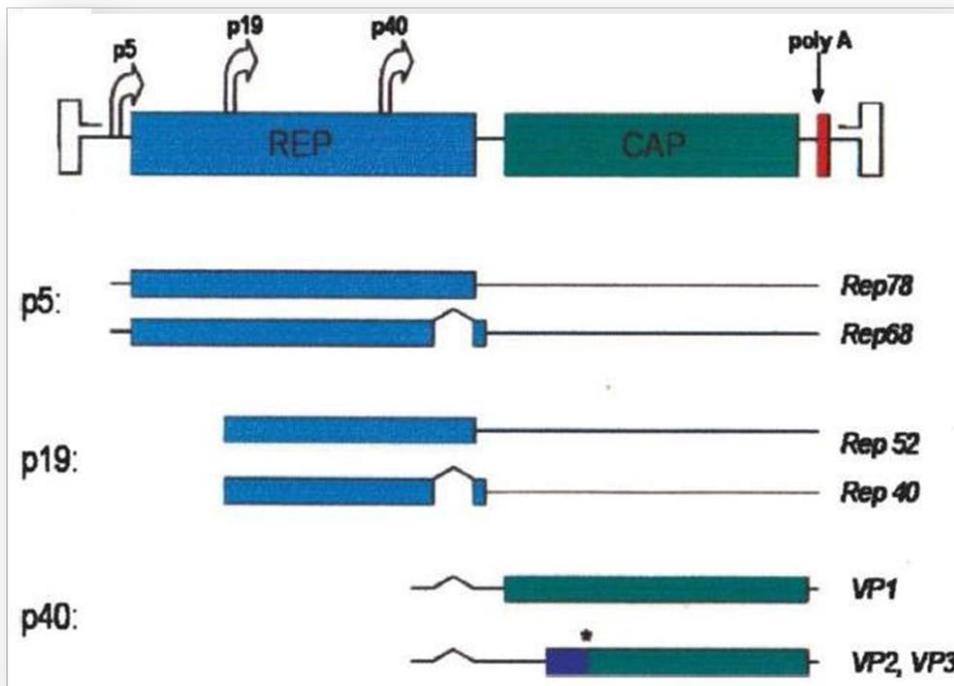


Figure 14 : Structure du génome de l'AAV sauvage.

Les séquences des gènes Rep et Cap sont encadrées par les ITRs. Rep78 et Rep68 sont produites à partir de transcrits induits sous le promoteur p5, alors que Rep52 et Rep40 sont produites à partir de transcrits induits sous le promoteur p19. Rep78 et Rep52 proviennent de transcrits non épissés, alors que Rep68 et Rep40 dérivent de transcrits épissés. VP1, VP2 et VP3 sont produites à partir d'un transcrit induit sous le promoteur p40. L'épissage alternatif de ce transcrit est utilisé pour synthétiser les trois protéines virales à partir de deux transcrits. Le transcrit non épissé produit VP1, alors que le transcrit épissé produit VP2 et VP3. * indique que VP2 est produite en utilisant un codon start ACG non conventionnel. D'après *Daya and Berns, Clinical Microbiology Reviews, 2008*.

Le génome de l'AAV est entouré d'une capsidie qui le protège et lui permet d'entrer dans les cellules avant d'être libéré au niveau du noyau. Cette capsidie et notamment les protéines qui la composent ont permis de définir de nouveaux sérotypes d'AAV autres que celui de l'AAV2 historiquement décrit (voir figure ci-dessous).

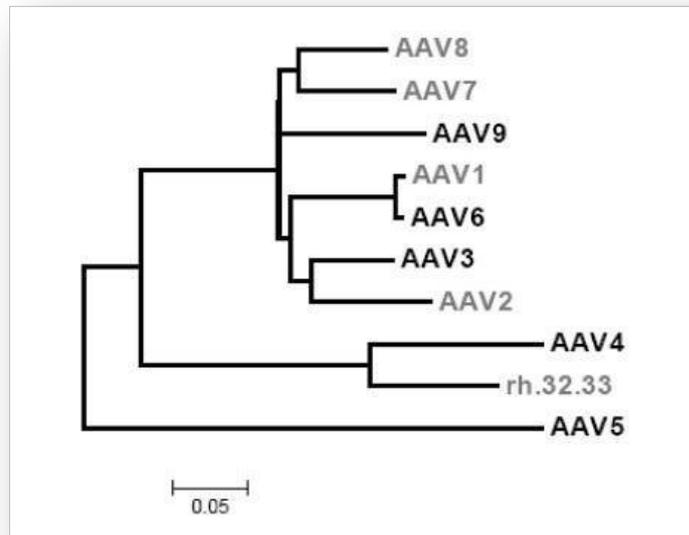


Figure 15 : Arbre phylogénétique des différents sérotypes d'AAV.

L'élaboration de cet arbre de données phylogénétiques s'est appuyée sur la méthode dite de « neighbor-joining » qui tient notamment compte des différences de vitesse d'évolution entre les différentes ramifications de l'arbre phylogénétique. Cette phylogénie a été déduite avec une correction de Poisson pour les séquences protéiques des protéines de capsidie VP1 de l'AAV. D'après *Calcedo et al., The Journal of Infectious Diseases, 2009*.

Un nouveau sérotype est défini lorsque l'AAV et notamment ses protéines de capsidie ne sont pas reconnues par des anticorps neutralisants préexistants au sein d'un hôte ayant été préalablement infecté par les sérotypes d'AAV connus ; cela permet de déterminer la séroprévalence en terme d'anticorps neutralisants anti-AAV pour un sérotype donné. C'est ainsi que dans des études épidémiologiques, des analyses ont suggéré qu'avec un AAV recombinant, ne nécessitant pas la présence d'un virus auxiliaire, la séroprévalence était beaucoup plus faible en Europe, en Australie et aux Etats-Unis avec environ 30 % d'adultes présentant des anticorps neutralisants contre la capsidie de l'AAV2, et 10 à 20 % d'adultes avec des anticorps neutralisants contre les capsides des autres sérotypes humains (Calcedo et al., 2009; Halbert et al., 2006). Aujourd'hui, outre ces différents sérotypes bien caractérisés une centaine de variants naturels d'AAV ont été isolés provenant pour la plupart de primates non humains (Gao et al., 2003, 2004; Mori et al., 2004).

L'intérêt suscité par l'étude des différents sérotypes s'est très vite accès sur l'utilisation des propriétés des différentes capsides virales en vue de l'utilisation des AAVs en tant que vecteurs pour effectuer du transfert de gènes vers des tissus ou organes cibles (voir Partie 2.). En effet, il a été démontré que chaque sérotype, défini par ses caractéristiques de protéines de capside, arbore un tropisme d'infection qui lui est propre (voir figure ci-dessous).

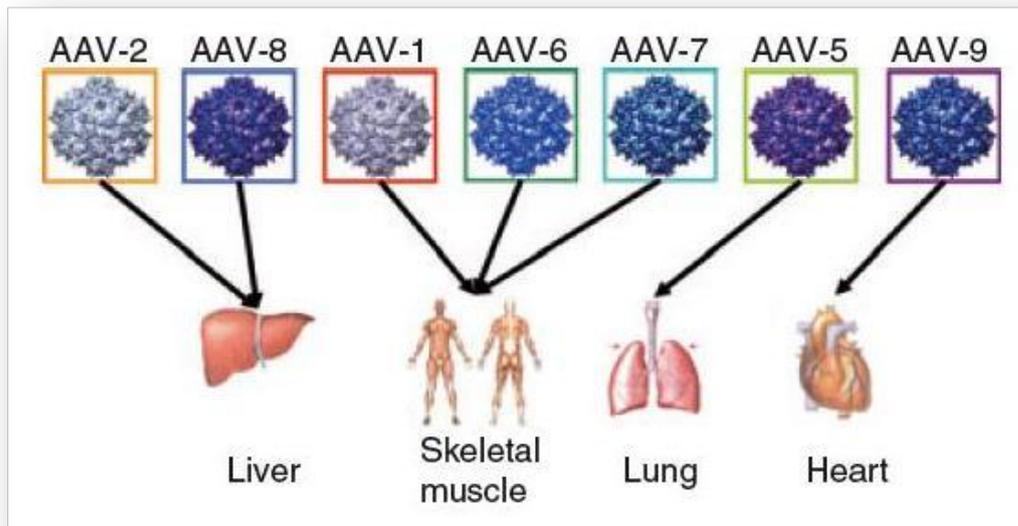


Figure 16 : Représentation des organes préférentiellement ciblés par les différents sérotypes d'AAV.

Ici sont représentés les sérotypes les plus communément utilisés en tant que vecteurs pour effectuer du transfert de gènes dans des petits et grands modèles d'animaux ainsi que leurs principaux organes cibles (cerveau non représenté). D'après *Arruda and Xiao, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2007*. Voir annexe 2 également.

L'AAV2 et l'AAV8 ont été montrés comme particulièrement efficaces dans la transduction des hépatocytes. L'AAV1, l'AAV6 et l'AAV7 semblent être plus spécifiques des cellules musculaires, alors que l'AAV9 quant à lui aurait un tropisme qui tendrait à le diriger vers le cœur (Gao et al., 2006, 2002; Wu et al., 2006). Une étude un peu plus récente a également démontré que l'AAV9 pourrait grâce à sa capside cibler le cerveau, même constat en ce qui concerne un sérotype non présenté sur la figure ci-dessus, l'AAV10 (McCown, 2011).

AAV	% d'homologies entre les différents sérotypes d'AAV								
	AAV-1	AAV-2	AAV-3	AAV-4	AAV-5	AAV-6	AAV-7	AAV-8	AAV-9
AAV-1	100								
AAV-2	83	100							
AAV-3	87	88	100						
AAV-4	63	60	63	100					
AAV-5	58	57	58	53	100				
AAV-6	99	83	87	63	58	100			
AAV-7	85	82	85	63	58	85	100		
AAV-8	84	83	86	63	58	84	88	100	
AAV-9	82	82	84	62	57	82	82	85	100

Figure 17 : Homologies entre les séquences en acides aminés des capsides parmi les sérotypes d'AAV1 à AAV9.

Adapté de *Daya and Berns, Clinical Microbiology Reviews, 2008.*

En accord avec leur capacité intrinsèque à cibler de manière plus ou moins spécifique certains tissus, on peut noter qu'il existe des différences entre la plupart des sérotypes au niveau de leur séquence en acides aminés (voir figure ci-dessus). Toutefois, on peut noter qu'il existe une très forte homologie entre l'AAV1 et l'AAV6 décrits précédemment tous les deux comme ayant un tropisme prononcé pour la transduction des cellules musculaires.

Maintenant que l'on connaît mieux l'organisation structurale de l'AAV sauvage, il devient intéressant d'en apprendre un peu plus sur son cycle de vie et ses modalités. Une fois l'infection réalisée, il existe deux phases du cycle de l'AAV : une phase lytique et une phase lysogénique. En présence d'un virus auxiliaire (adénovirus ou HSV), c'est la phase lytique qui est activée. Au cours de cette période, l'AAV subit une phase d'infection productive caractérisée par la réplication de son génome, l'expression des gènes viraux et la synthèse de virions. Dans le cas d'une co-infection avec HSV, ce dernier aide l'AAV dans l'expression de ses gènes en fournissant l'ADN polymérase virale et l'hélicase qui lui sont par ailleurs aussi indispensables pour assurer les fonctions précoces nécessaires à sa propre transcription. En absence de virus auxiliaire et comme dit précédemment, la réplication de l'AAV est faible sans possibilité d'expression des gènes viraux ; ceci met en avant une des caractéristiques de l'AAV qui concerne sa capacité à s'intégrer de manière spécifique et à établir une infection latente (voir figure ci-dessous). Il a été montré que pour infecter des cellules cibles, l'AAV2 utilise les récepteurs cellulaires des protéoglycanes à héparane sulfate qui constituent ainsi un premier site d'ancrage cellulaire (Summerford and Samulski, 1998). Cette liaison, qui augmente souvent de façon considérable l'infectiosité, permet de concentrer les particules

virales au voisinage des récepteurs et corécepteurs tels que les intégrines $\alpha_v\beta_5$ (Summerford et al., 1999), le récepteur 1 au facteur de croissance des fibroblastes (Qing et al., 1999), le récepteur au facteur de croissance des hépatocytes (Kashiwakura et al., 2005), l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (Asokan et al., 2006), le récepteur des laminines (Akache et al., 2006), utilisés pour l'internalisation du virus dans les cellules. L'endocytose de l'AAV2 se ferait de manière clathrine-dépendante car il a été montré que dans des cellules déficientes en dynamine la capacité d'infection était fortement entravée (Duan et al., 1999). Par contre, la manière dont l'AAV pénètre dans le noyau après avoir échappé aux vésicules d'endocytose et aux endosomes n'est pour le moment pas bien connue et suscite de nombreuses recherches. La petite taille de l'AAV pourrait faire penser qu'en théorie il utiliserait le complexe de pores nucléaires pour rentrer dans le noyau, mais il y a presque 15 ans une étude pionnière dans ce domaine suggéra que son entrée serait indépendante de ce mécanisme (Hansen et al., 2001).

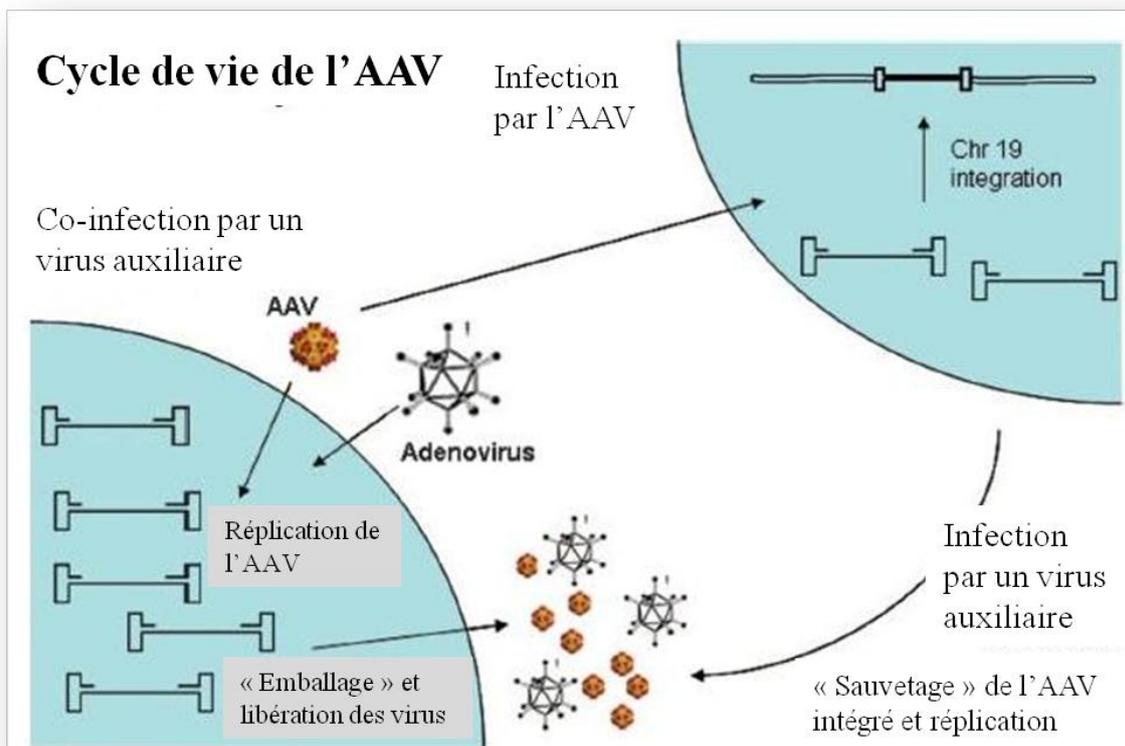


Figure 18 : Cycle de vie du virus AAV.

Avec la présence de l'adénovirus comme virus auxiliaire, l'AAV co-infecte la cellule puis réplique son génome, active l'expression de ses gènes viraux et la production des virions. En absence de l'adénovirus, l'AAV s'établit de manière latente en s'intégrant à un locus spécifique (AAVS1) du chromosome 19. Ce génome de l'AAV latent peut être « sauvé » et se répliquer dès une superinfection par un adénovirus. Adapté de *Daya and Berns, Clinical Microbiology Reviews, 2008.*

A l'heure actuelle, il ne semble pas y avoir d'évidence de la pathogénicité d'une infection par l'AAV sauvage même lorsqu'il demeure à l'état latent dans le génome (Flotte and Berns, 2005; Henckaerts and Linden, 2010).

Grâce aux nombreuses caractéristiques de l'AAV, son absence d'effets délétères chez l'hôte, sa capacité à transduire des cellules ne se divisant pas (Podsakoff et al., 1994) et son potentiel à exprimer à long terme les transgènes véhiculés (Okada et al., 2002) ; la perspective de l'utiliser comme vecteur dans le transfert de gènes à des fins thérapeutiques a donc naturellement suscité un vif intérêt au sein de la communauté scientifique impliquée dans la recherche biomédicale.

2. Caractéristiques des vecteurs AAV recombinants

a. Le vecteur

Les vecteurs AAV recombinants sont construits en remplaçant les gènes Rep et Cap par la séquence du transgène d'intérêt que l'on veut faire exprimer sous un promoteur spécifique tout en conservant les séquences ITRs de l'AAV2 sauvage (Samulski et al., 1989) (voir figure ci-dessous). Comme mentionné précédemment, la perte du gène Rep va conduire à une perte de l'efficacité de l'intégration du vecteur AAV recombinant, intégration qui devient alors rare et aléatoire et où le transgène inséré va majoritairement persister sous forme d'épisme.

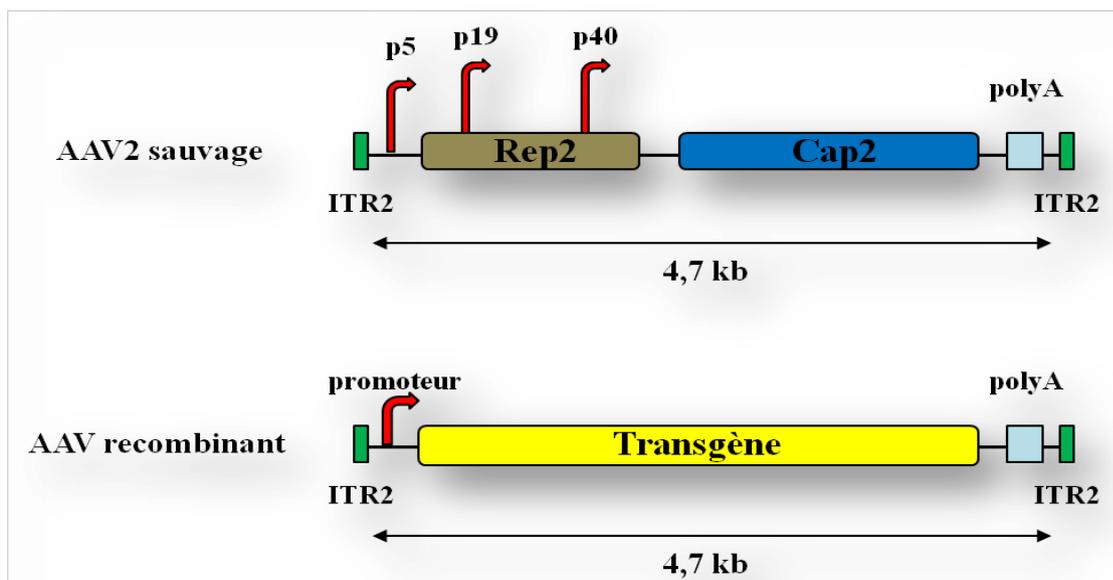


Figure 19 : Modélisation de la structure du génome d'un vecteur AAV recombinant.

Dans un souci de toujours vouloir améliorer les outils à leur disposition pour en faire de puissants « alliés » thérapeutiques, les chercheurs ont donc essayé de faire de même avec les vecteurs AAV recombinants en ayant recouru au génie génétique. En effet, une des caractéristiques du vecteur AAV recombinant est que la cassette d'expression du transgène que l'on souhaite insérer ne peut excéder 4,7 kb, ce qui pour beaucoup de gènes est relativement faible surtout dans un contexte où le vecteur AAV recombinant doit véhiculer des transgènes en vue de réparer des gènes déficients souvent de haut poids moléculaire tels que la dystrophine par exemple. De plus, le génome au sein du vecteur AAV recombinant est composé d'un ADN monocaténaire ce qui ralentit fortement l'expression du transgène car il doit d'abord passer par une phase de synthèse d'un second brin complémentaire. Tenant compte de ces limites, de nouvelles technologies axées sur les vecteurs AAV recombinants ont été développées afin d'une part d'accroître leur capacité génomique et d'autre part d'améliorer leur expression génique.

Tout d'abord, pour augmenter la taille des transgènes insérés dans les vecteurs AAV recombinants la technique du *trans*-épissage (« *trans*-splicing ») a été développée (Yan et al., 2000). Cette technique repose sur la capacité intrinsèque de l'AAV à former des concatémères en « tête à queue » via des recombinaisons entre les ITRs de deux vecteurs AAV recombinants indépendants (Duan et al., 2001). Techniquement, la cassette d'expression du transgène est séparée en deux avec chaque vecteur AAV recombinant possédant une partie du génome et contenant pour l'un un site donneur et pour l'autre un site accepteur pouvant être épissés. Une fois la recombinaison opérée entre les deux ITRs des deux AAV recombinants, la transcription complète du gène peut avoir lieu, et l'épissage de l'ARN (acide ribonucléique) messenger transcrit contenant les deux sites donneur/accepteur encadrant les deux ITRs conduit à la traduction complète de la protéine d'intérêt (voir figure ci-dessous).

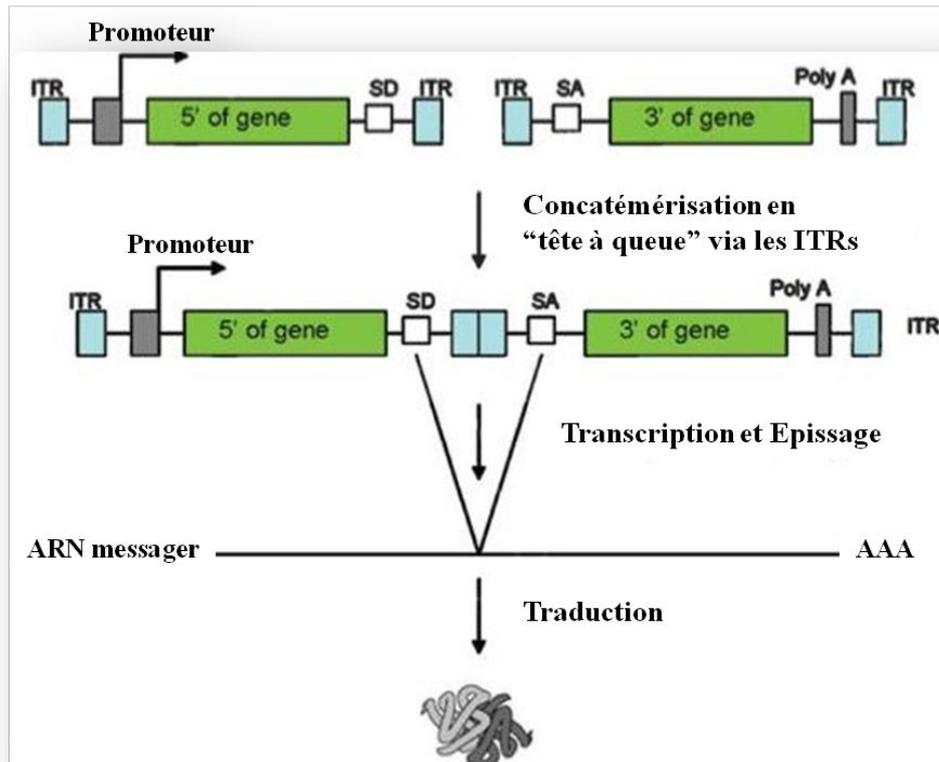


Figure 20 : Technique du trans-épissage.

SD : site donneur, SA : site accepteur. Adapté de *Daya and Berns, Clinical Microbiology Reviews, 2008.*

Cette modulation de la taille du transgène inséré dans le vecteur AAV recombinant devient notamment intéressante lorsqu'il s'agit de véhiculer des gènes thérapeutiques pouvant atteindre jusqu'à 9 kb. La technique du *trans-épissage* fut utilisée avec succès dans des tests d'expression de gène au sein de la rétine (Reich et al., 2003) et du muscle (Ghosh et al., 2006) ; puis de manière plus concrète dans des essais de thérapie génique du poumon (Liu et al., 2005b) et du muscle (Lai et al., 2005). D'une manière générale, l'estimation de l'efficacité des vecteurs véhiculant un transgène issu de la technique du *trans-épissage* a néanmoins démontré qu'ils étaient moins efficaces que les vecteurs AAV recombinants classiques (Daya and Berns, 2008).

En parallèle, et pour améliorer l'expression génique de ces vecteurs AAV recombinants, des vecteurs AAV « self-complementary », dont la séquence ADN présente la capacité de se replier sur elle-même pour former automatiquement un double brin d'ADN prêt à être transcrit immédiatement (voir figure ci-dessous), ont été développés afin de s'affranchir de l'étape de synthèse d'un second brin d'ADN complémentaire normalement nécessaire (McCarty et al., 2001). L'intérêt d'un tel vecteur est bien entendu de pouvoir raccourcir le

temps de latence dû à la synthèse d'un second brin d'ADN avant l'expression du transgène au sein de la cellule et donc d'améliorer l'efficacité du vecteur. Cependant, l'utilisation de tels vecteurs comporte un inconvénient et non des moindres à savoir que la taille maximale du transgène inséré ne peut excéder 3,3 kb (Wu et al., 2007). Néanmoins, il faut noter une caractéristique intéressante de ce type de vecteur à savoir que la transduction des cellules a été montrée comme étant accélérée avec l'utilisation des vecteurs AAV « self-complementary » que ce soit lors d'expériences réalisées *in vitro* ou *in vivo* (Fu et al., 2003; McCarty et al., 2001, 2003; Wang et al., 2003; Yang et al., 2002).

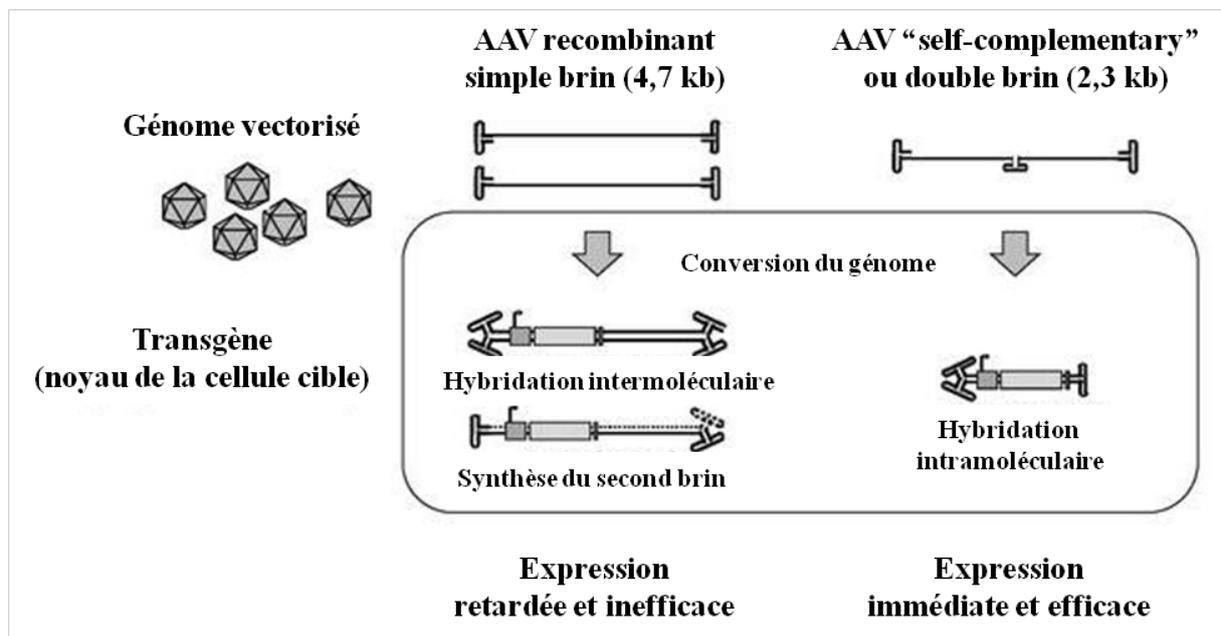


Figure 21 : Mécanismes de transduction cellulaire opérés par un vecteur AAV recombinant classique et un vecteur AAV « self-complementary ».

Adapté d'Okada, *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, 2013.

b. La capsid

Dans le cadre de l'amélioration des vecteurs AAV recombinants, de nouveaux types de capsides ont été conçus en vue d'apporter une meilleure modulation du tropisme de chaque vecteur mais également une meilleure transduction cellulaire. En effet comme vu précédemment, la capsid et plus particulièrement les protéines qui la composent définissent différents sérotypes d'AAV ayant un tropisme tissulaire préférentiel. L'une des techniques utilisées pour modifier le tropisme intrinsèque d'un vecteur AAV recombinant est d'associer la séquence d'un transgène encadrée par les ITRs de l'AAV2 à une capsid provenant d'un autre sérotype que l'AAV2. Ainsi ce vecteur recombinant tout en gardant les caractéristiques génomiques originelles développées sur la base de l'AAV2, en vertu du maintien des ITRs, sera en mesure de cibler des tissus différents de ceux définis par le tropisme de l'AAV2 lui-même. Ce type de vecteur AAV recombinant est appelé pseudotypé et sa nomenclature est définie comme suit : vecteur AAV2/X recombinant dérivé de l'AAV2 pour la conservation des ITRs et associé à la capsid de l'AAVX.

D'autres techniques quant à elles permettent de modifier la structure de la capsid elle-même, c'est le cas pour les vecteurs AAV recombinants formés de capsides mosaïques. Ces capsides sont composées d'une association de sous-unités de protéines de capsides provenant de différents sérotypes (Wu et al., 2006). La fabrication de telles capsides est rendue possible en transfectant un mix de plasmides auxiliaires de l'AAV codant pour différents gènes Cap en même temps que le plasmide codant pour le transgène d'intérêt flanqué des deux ITRs et un plasmide apportant les fonctions adénovirales auxiliaires (ou un adénovirus), dans des cellules compétentes à la réplication de l'AAV (Ferrari et al., 1997; Grimm and Kleinschmidt, 1999). Toutefois, la proportion des différentes protéines impliquées dans la formation de la capsid mosaïque est rarement homogène ce qui tend à favoriser la participation d'un sérotype par rapport à un autre dans l'élaboration du vecteur recombinant final (Büning et al., 2008). Pour autant, grâce à cette technique de combinaison des protéines de capsides des différents sérotypes, les vecteurs recombinants produits acquièrent les caractéristiques des sérotypes parentaux respectifs leur permettant de cumuler les tropismes tissulaires associés. A titre d'exemple, des vecteurs recombinants possédant des capsides mosaïques issues de la combinaison des protéines de capsid de l'AAV1 et de l'AAV2 sont capables de transduire efficacement des cellules musculaires mais également des cellules hépatiques tout comme le feraient de manière indépendante un vecteur AAV1 et un vecteur AAV2 recombinants (Hauck et al., 2003). Quant aux mécanismes liés à leur infection dont dépendent les vecteurs

AAV recombinants pour pénétrer dans une cellule, les vecteurs recombinants avec des capsides mosaïques sont capables de se lier à différents motifs d'adhésion cellulaire. C'est ainsi que des vecteurs recombinants possédant des capsides mosaïques issues de la combinaison des protéines de capsidite de l'AAV3 et de l'AAV5 sont capables de se lier à la fois à des récepteurs à héparane sulfate (propriété de l'AAV3) et à mucine (propriété de l'AAV5) (Rabinowitz et al., 2004).

Une autre manière de modifier la structure de la capsidite du vecteur recombinant est de permuter les domaines des protéines de la capsidite d'un sérotype avec ceux d'un autre, cette technique caractérise les vecteurs AAV recombinants formés de capsides chimériques (Wu et al., 2006). Techniquement, ce type de capsidite est généré en co-transfectant le génome de l'AAV2 portant une mutation non fonctionnelle du gène Cap avec des plasmides codant pour les séquences Cap sauvages d'un autre sérotype, dans des cellules compétentes à supporter la réplication de l'AAV (Bowles et al., 2003). Par exemple, il a été montré qu'il est possible de remplacer une séquence bien spécifique d'acides aminés (en position 350-430) de l'AAV2 par une séquence homologue de l'AAV1 (en position 213-423) (Hauck et al., 2006). Cette approche démontra une capacité accrue de ce vecteur à transduire les cellules musculaires, mais sa reconnaissance par les anticorps anti-capsidite de l'AAV2 (anticorps A20) et les anticorps neutralisants anti-AAV2, fut moins efficace. De plus, une étude a montré que l'utilisation de vecteurs recombinants à capsidite chimérique permet d'en apprendre davantage sur les mécanismes biologiques liés à l'infection par l'AAV (Grieger et al., 2006). Du point de vue clinique, la permutation d'un domaine de capsidite de cinq acides aminés entre l'AAV1 et l'AAV2 a permis de produire un vecteur recombinant ayant un tropisme dirigé vers les muscles (Wu et al., 2006), vecteur utilisé pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. De la même manière, Wu et ses collègues décrivent un autre variant de vecteur AAV ayant un tropisme pour le cœur chez la souris.

Une dernière technique utilisée dans la modification des capsides virales des vecteurs AAV recombinants consiste à insérer au sein des protéines de capsidite des ligands permettant un adressage spécifique de la capsidite vers un récepteur cellulaire particulier différent de celui pour lequel la capsidite de l'AAV possède un tropisme intrinsèque. De la même manière que pour la permutation opérée dans les capsides chimériques, il est nécessaire que le domaine d'insertion du ligand pour le récepteur cellulaire naturel de l'AAV soit totalement supprimé afin que le nouveau ligand puisse cibler la capsidite vers son nouveau récepteur cellulaire (Bartel et al., 2011; Büning et al., 2008, 2011; Muzyczka and Warrington, 2005; Wu et al.,

2006). Cette particularité caractérise les vecteurs AAV recombinants formés de capsides reciblées, on parle également d'« AAV targeting vector ». Une telle technique permet la transduction de types cellulaires qui sont normalement réfractaires à une infection par des vecteurs AAV recombinants classiques. Il existe deux stratégies conduisant à l'élaboration de ce type de vecteur à capside reciblée : un ciblage indirect (non génétique) et un ciblage direct (génétique). Le ciblage indirect repose sur l'utilisation d'une molécule qui sert de « pont » entre la capside virale et le récepteur cellulaire cible. La démonstration d'un tel procédé a pu être faite par Bartlett et ses collègues (Bartlett et al., 1999) lorsqu'ils créèrent une liaison avec un anticorps bispécifique entre la capside d'un vecteur AAV2 recombinant et le fibrinogène, constituant de la matrice extracellulaire, dans des lignées cellulaires normalement non transduites par ce type de vecteur. Les auteurs montrèrent ainsi que l'efficacité de transduction était alors augmentée de 70 fois par rapport au bruit de fond établi. Une autre étude montra qu'on pouvait également lier la capside d'un AAV2 au facteur de croissance de l'épiderme ou à celui des fibroblastes grâce à un complexe formé entre l'avidine et la biotine (Ponnazhagan et al., 2002). L'approche par le ciblage direct comme mentionné au début de ce paragraphe repose sur l'insertion génétique d'un ligand sous forme de peptide au sein du domaine des protéines de la capside virale spécifique à l'adressage cellulaire. Un exemple de cette approche consista à fusionner un anticorps à chaîne unique avec la partie N-terminale de la protéine de capside VP2 en vue de rediriger le vecteur AAV vers des cellules CD34⁺ (Yang et al., 1998). Cette étude révéla que les vecteurs AAV issus de cette production présentaient des titres de génome viral faibles. Au contraire, il a été montré que la fusion de peptides codant pour la GFP à la partie N-terminale de VP2 augmentait le rendement en génome viral de la production de tels vecteurs utilisés ensuite pour la visualisation des mécanismes d'infection cellulaire par l'AAV (Lux et al., 2005; Warrington et al., 2004). Ces différences en termes de titres infectieux pourraient être expliquées par les différentes techniques de production et de purification des vecteurs AAV recombinants où certains protocoles étaient basés sur l'inactivation des virus auxiliaires restants par la chaleur, alors que d'autres s'appuyaient sur des productions complètement indépendantes de virus auxiliaires (Büning et al., 2008; Xiao et al., 1998).

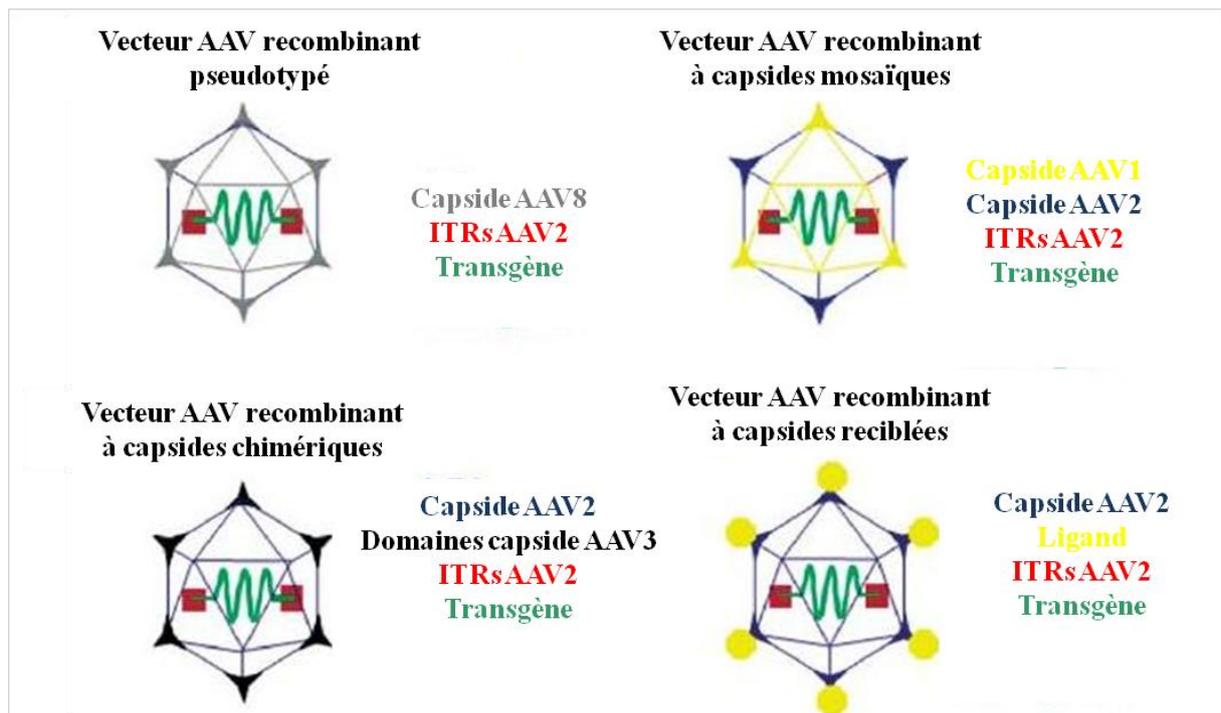


Figure 22 : Modèles de modifications apportées aux capsides des vecteurs AAV recombinants.

Adapté de Büning *et al.*, *The Journal of Gene Medicine*, 2008.

3. Induction de réponses immunitaires

Toutes les caractéristiques précédemment décrites au sujet du vecteur AAV recombinant ont naturellement permis de le positionner comme un outil phare pour la vectorisation de transgènes à but thérapeutique ou, plus récemment, vaccinal. Ainsi, le développement de la thérapie génique visant à réparer des gènes déficients responsables de pathologies sévères s'est accompagné d'un intérêt grandissant pour l'utilisation des vecteurs AAV recombinants. En effet, un vecteur qui ne présente aucune pathogénicité intrinsèque, qui réside sous forme d'épisome dans des sites spécifiques bien identifiés d'intégration de l'ADN de la cellule hôte, et qui peut bénéficier de plusieurs modulations de son contenu et de son tropisme, représente un « candidat » idéal. Bien entendu pour que le transfert du transgène jusqu'à sa cible s'effectue dans les meilleures conditions et que celui-ci s'installe de manière prolongée, le vecteur AAV recombinant doit passer le plus inaperçu possible au travers du maillage resserré du système immunitaire et de ses « brigades » cellulaires. Ainsi certaines limitations à l'utilisation des vecteurs AAV recombinants en thérapie génique, et notamment celles qui

concernent la génération de réponses immunitaires dirigées contre ces vecteurs, ont très vite émergé.

a. L'immunité innée

Parmi les différents PRRs impliqués dans le déclenchement de l'immunité innée à la suite de la reconnaissance de PAMPs, ce sont principalement deux TLRs, TLR2 et TLR9, qui ont été décrits comme capables de reconnaître les vecteurs AAV. Le TLR2 a été identifié comme le récepteur pour la capsid virale dans des études sur les réponses immunitaires de cellules autonomes provenant de cellules primaires de foie humain et de cellules endothéliales activées (Hösel et al., 2012). Le TLR9 quant à lui a été montré comme détecteur du génome du vecteur AAV2 au niveau des endosomes de DCs plasmacytoïdes murines et humaines activées *in vitro*. Cette liaison TLR9-génome de l'AAV2 déclencha la sécrétion d'IFN de type I par les DCs plasmacytoïdes (Zhu et al., 2009). Les auteurs allèrent plus loin et démontrèrent que cette sécrétion d'IFN de type I résultait non seulement de la présence du TLR9 mais était également dépendante de la voie de signalisation impliquant l'adaptateur MyD88 (myeloid differentiation primary response 88). De plus, Zhu *et al.* montrèrent que l'activation de la voie de signalisation TLR9-MyD88 par l'AAV était indépendante de la nature du transgène inséré ainsi que du sérotype d'AAV. Etant donné que le TLR9 a la capacité de reconnaître des motifs CpG, le vecteur AAV recombinant une fois endocyté serait, par l'intermédiaire du trafic intracellulaire et des différentes variations de pH (potentiel hydrogène) des compartiments cellulaires, décapsidé et son génome présenterait des motifs CpG aux TLR9 présents au sein des endosomes (Rogers et al., 2011). De manière intéressante, une étude basée sur le transfert de gène au sein des cellules hépatiques a montré que l'utilisation d'un génome provenant d'un vecteur AAV « self-complementary » et stimulant le TLR9, conduisait à une sécrétion accrue d'IFN de type I comparée au génome dérivé d'un vecteur AAV simple brin ; ce qui participe à un renforcement des réponses de l'immunité innée contre les vecteurs AAV recombinants « self-complementary » (Martino et al., 2011).

Les capsides des vecteurs AAV recombinants ont également été montrées comme interagissant avec les molécules du complément, interactions participant à l'élaboration des réponses immunitaires innées contre les vecteurs AAV (Zaiss et al., 2008). En effet, le fragment issu de l'opsonisation de la protéine C3 du complément, iC3b, a été retrouvé lié à la capsid de l'AAV suite à des expériences d'immunoprécipitation menées *in vitro*, et cette liaison a permis d'accroître le potentiel des macrophages à phagocyter le vecteur AAV au

niveau de sa capsid et à activer leurs gènes d'expression de cytokines pro-inflammatoires via la voie NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells).

Enfin, la voie d'acheminement du vecteur semble être un paramètre important dans la reconnaissance de l'AAV par l'immunité innée. En effet, il a été montré que l'activation de la voie de signalisation TLR9-MyD88 conduisant à la sécrétion d'IFN de type I permettait de déclencher des réponses immunitaires adaptatives humorales et cellulaires contre la capsid de l'AAV mais également contre le produit du transgène, lorsque le vecteur AAV recombinant avait été injecté par voie intramusculaire (Zhu et al., 2009). Inversement, après une injection de vecteur AAV dans la veine de la queue par voie intraveineuse, aucune induction de réponses humorales n'a pu être détectée que ce soit par l'intermédiaire de TLR2, TLR9 ou même de la sécrétion d'IFN de type I ; seule la présence de MyD88 était requise pour la génération d'anticorps spécifiques de classe IgG contre l'AAV (Sudres et al., 2012).

b. L'immunité adaptative

L'immunité adaptative se trouve également sollicitée dès lors qu'un hôte est exposé au vecteur AAV recombinant. Ses deux composantes, la réponse humorale et la réponse cellulaire, participent à l'élimination des cellules transduites et à l'établissement dans la durée d'une mémoire basée sur la génération d'anticorps neutralisants et de lymphocytes T CD8⁺ mémoires spécifiques de la capsid, mais aussi du transgène véhiculé. C'est cette dernière qui est tout particulièrement exploitée dans le cadre de l'utilisation vaccinale des vecteurs AAV recombinants.

i. Les réponses humorales contre la capsid

Comme souligné précédemment, la prévalence chez l'homme des anticorps neutralisants contre la capsid de l'AAV est variable selon le sérotype et également la région géographique (Calcedo et al., 2009), avec une prévalence globale allant jusqu'à environ 60 % chez la population saine (Mingozzi and Büning, 2015). De façon intéressante, les sérotypes AAV4 et AAVrh32.33 qui sont très proches phylogénétiquement affichent la séroprévalence en anticorps neutralisants la plus faible avec moins de 2 % de personnes détectées positives pour ces deux sérotypes à travers le monde (Calcedo et al., 2009). Cet avantage en faibles réponses humorales préexistantes plaça le sérotype AAVrh32.33 comme un « candidat » très

prometteur pour la vectorisation de transgènes dans des expériences de thérapie génique. Cependant, des études montrèrent qu'il était aussi la source de réponses cellulaires fortes contre le produit du transgène qu'il véhiculait, réponses à hauteur de celles générées par un adénovirus, et donc ne permettant pas le maintien de l'expression du transgène sur le long terme (Mays et al., 2009). Outre les anticorps neutralisants, les anticorps de capture jouent également un rôle important dans l'utilisation des vecteurs AAV pour des applications cliniques. L'opsonisation des particules d'AAV par les anticorps non neutralisants conduit à leur phagocytose par les DCs et les macrophages grâce aux récepteurs Fc qu'ils possèdent à leur surface et dont les signaux d'internalisation activent la génération de réponses inflammatoires. On estime que les fréquences d'anticorps de capture contre l'AAV1 et l'AAV2 chez l'homme sont d'environ 70 %, contre l'AAV6 et l'AAV9 de 45 % et de 38 % contre l'AAV8 (Boutin et al., 2010). La présence de ces deux types d'anticorps a poussé les chercheurs à tenter de les associer en essayant d'établir une mesure indirecte de la quantité d'anticorps neutralisants en fonction de la quantité d'anticorps de capture détectés (Hurlbut et al., 2010; Wang et al., 2011). Suite à ces études, une corrélation a pu être établie entre ces deux types d'anticorps, mais pour autant dans presque 20 % des échantillons présentant de forts taux d'anticorps de capture il n'a quasiment pas été possible de détecter des anticorps neutralisants. Une notion importante à souligner dans l'établissement des réponses immunitaires adaptatives notamment humorales, est la capacité de réaction croisée des anticorps générés contre un sérotype d'AAV particulier. En effet, les anticorps spécifiques issus d'une première immunisation avec un vecteur AAV recombinant peuvent également reconnaître de manière plus ou moins efficace les autres sérotypes d'AAV injectés lors d'immunisations ultérieures. Ainsi, cette capacité de réaction croisée a pu être mise en évidence chez la plupart des sujets possédant des anticorps (neutralisants et/ou de capture) spécifiques des sérotypes AAV7, AAV8 et AAV9 qui sont capables également de reconnaître le sérotype AAV2. Pour autant, la réciproque ne s'avéra pas vraie car peu de sujets ayant des anticorps (neutralisants et/ou de capture) spécifiques de l'AAV2 eurent ces mêmes anticorps capables de réagir contre les sérotypes AAV7, AAV8 et AAV9 (Boutin et al., 2010; Calcedo et al., 2009). Un essai clinique de phase 2 utilisant un vecteur AAV1 recombinant exprimant l' α 1-antitrypsine montra que les sujets impliqués développèrent des anticorps neutralisants spécifiques de l'AAV1 avec une capacité de réaction croisée quasiment nulle envers les sérotypes AAV2, AAV7 et AAV8 (Flotte et al., 2011). Une des explications potentielles, serait la présence dans le sérum d'anticorps neutralisants dirigés contre un large spectre d'antigènes homologues dû à l'exposition naturelle de l'homme aux infections par les AAVs.

En effet, des sujets avec des taux très faibles d'anticorps neutralisants préexistants contre les sérotypes AAV1, AAV2, AAV7 et AAV8 montrèrent dans ce cas une capacité accrue de réaction croisée des anticorps neutralisants générés lors de l'injection de l'AAV1 contre les sérotypes AAV2, AAV7 et AAV8. L'AAV2 étant le sérotype le plus répandu dans la population humaine avec le plus fort taux d'anticorps neutralisants (Calcedo et al., 2011), cela suggère qu'il est aussi celui par lequel l'infection naturelle est la plus courante, et donc la capacité de réaction croisée des anticorps qui lui sont spécifiques sera d'autant plus importante si le sérotype d'infection est proche de l'AAV2.

ii. Les réponses cellulaires contre la capsid

De manière intéressante, des études chez l'homme ont montré que chez des sujets ayant subi une splénectomie, 2/3 des adultes de plus de 25 ans possédaient des lymphocytes T CD8⁺ capables de produire de l'IFN- γ lorsqu'on les restimulait avec des peptides de la capsid de l'AAV2. Au contraire, chez des sujets âgés de moins de 5 ans, peu d'entre eux montrèrent une telle réactivité des lymphocytes T pour la capsid de l'AAV2 (Hui et al., *Mol Ther ASGCT Annu Meet Abstr*, 2012). Ceci suggère donc une acquisition de la séroprévalence en AAV assez tôt dans la vie entre le stade de l'enfance et celui de jeune adulte lors d'expositions naturelles. Il faut tout d'abord noter que du fait du fort degré de conservation de la séquence en acides aminés de la capsid de l'AAV (Gao et al., 2002), les cellules T affichent une forte capacité de réaction croisée de leurs réponses contre la plupart des sérotypes (Mingozzi et al., 2007). De plus, il semblerait qu'il n'existe pas de synergie d'action entre les réponses B et T contre l'AAV car des sujets présentant une sérologie positive aux anticorps anti-AAV n'affichaient pas de réactivité des lymphocytes T envers la capsid, et vice versa (Veron et al., 2012). Comme le soulignent également Basner-Tschakarjan et Mingozzi dans leur revue (Basner-Tschakarjan and Mingozzi, 2014), à la suite d'une exposition à l'AAV certaines personnes seraient donc sujettes à développer des réponses de type Th1 impliquant les CTLs, et d'autres de type Th2 impliquant les anticorps.

Le rôle et l'implication des réponses cellulaires dirigées contre la capsid ont notamment pu être mis en relief lors du premier essai clinique de thérapie génique impliquant l'utilisation d'un vecteur AAV2 recombinant introduit au niveau du foie de patients atteints d'hémophilie B sévère (Manno et al., 2006). Au cours de cet essai, deux sujets perdirent l'expression du transgène (facteur IX), véhiculé par l'AAV2, environ quatre semaines après l'injection.

L'analyse des lymphocytes T CD8⁺ du sang circulants et spécifiques de la capsid de l'AAV2 de sujets immunisés avec l'AAV2-F.IX (facteur IX) montra que leur amplification corrélait avec une forte expression d'enzymes du foie (les transaminases) dans le sérum, trois semaines après l'injection. La contraction de cette population de lymphocytes T se fit également en parallèle de la perte d'expression de ces transaminases (Mingozzi et al., 2007). Ces observations apportèrent la suspicion que les hépatocytes ciblés et transduits par l'AAV2-F.IX devaient être détruits par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la capsid, ne permettant pas ainsi l'établissement à long terme du transgène. Pour confirmer cela, les auteurs recherchèrent des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du transgène mais ne réussirent pas à en détecter. Par contre, une restimulation des lymphocytes T CD8⁺ du sang circulants avec de la capsid d'AAV2 montra tout leur potentiel à sécréter de l'IFN- γ , les désignant comme les principaux responsables de la perte d'expression du transgène au sein des hépatocytes. Enfin, Mingozzi *et al.* réussirent à démontrer que les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la capsid en jeu dans ce rejet provenaient en fait d'une population mémoire de lymphocytes T CD8⁺ initiée lors d'une précédente exposition des sujets à l'AAV2. Donc cet essai clinique permit de mettre en évidence que tout comme les réponses humorales préexistantes, les réponses cellulaires préexistantes s'avèrent être une limitation importante à considérer dans le cadre de l'utilisation des vecteurs AAV recombinants en thérapie génique.

Un autre essai clinique basé sur le transfert de F.IX par le vecteur AAV8 recombinant au niveau du foie de sujets atteints d'hémophilie B sévère, confirma les résultats obtenus lors de l'essai avec l'AAV2-F.IX (Nathwani et al., 2011). Etant donné que les médiateurs cellulaires impliqués dans ces deux essais étaient des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la capsid, cela suggère que les antigènes de capsid ont du être apprêtés et présentés sur des molécules du CMH de classe I par les hépatocytes transduits. A noter, là où quatre semaines furent nécessaires à l'apparition des réponses T CD8⁺ anti-capsid AAV2 et à l'augmentation de la quantité de transaminases après l'injection du vecteur, il fallu attendre huit à neuf semaines pour observer les mêmes résultats dans l'essai conduit avec le vecteur AAV8 recombinant. A l'heure actuelle, il n'y a pas d'explication avancée quant à cette différence de timing. De plus, il semblerait que la réactivité des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la capsid chez l'homme soit dictée par la dose de vecteur injectée (Pien et al., 2009).

Quant au mécanisme de présentation des antigènes de la capsid permettant de générer des réponses T cytotoxiques spécifiques capables de détruire les cellules transduites, une étude montra que le vecteur AAV devait échapper au trafic endosomal/lysosomal pour induire la

lyse de sa capsidie par le protéasome, ceci n'étant efficace que si le génome viral restait encapsidé (Li et al., 2013).

Les mesures des réponses cellulaires via les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la capsidie n'ont pas été restreintes aux études de transfert de gène par les vecteurs AAV recombinants au niveau du foie. En effet, de telles observations ont pu également être faites lorsque le muscle était ciblé par ces vecteurs dans le cadre d'études cliniques de thérapie génique (Brantly et al., 2009; Flotte et al., 2005, 2011; Herson et al., 2012; Jaski et al., 2009; Mendell et al., 2009, 2010a, 2010b; Mingozzi et al., 2009). De même que dans le cadre des études cliniques de thérapie génique visant le foie, l'intensité des réponses des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la capsidie a été montrée comme dépendante de la dose de vecteur injectée au niveau du muscle (Flotte et al., 2011; Mingozzi and A High, 2011). De manière intéressante, il a été montré que la présence de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la capsidie n'influe pas forcément sur le maintien à long terme du transgène suite à l'injection de vecteur AAV recombinant dans le muscle, corrélant avec la présence de Tregs également spécifiques de la capsidie (Mueller et al., 2013).

iii. Les réponses contre le produit du transgène

Le vecteur AAV recombinant véhicule un transgène qui peut s'avérer lui-même être la source de réponses immunitaires adaptatives spécifiques non désirées lors de transfert de gène pour la thérapie génique, mais au contraire souhaitées dans le cadre de la vectorisation de vaccins pour l'établissement d'une mémoire immunologique. Ainsi, la première démonstration de telles réponses fut faite vers la fin des années 90 avec l'utilisation d'un vecteur AAV2 exprimant soit la glycoprotéine B ou D de HSV-2 et injecté par voie intramusculaire qui mena à la génération de CTLs et d'anticorps spécifiques des deux glycoprotéines (Manning et al., 1997). De plus, les auteurs montrèrent que l'immunisation par un vecteur AAV recombinant était plus efficace dans l'induction de réponses humorales qu'une immunisation par ADN plasmidique ou par protéine recombinante. La restimulation *in vitro* des lymphocytes T CD8⁺ montra qu'ils étaient capables de proliférer rapidement et de lyser des cellules exprimant l'antigène. Deux ans plus tard, une observation similaire de réponses humorales et cellulaires put être faite chez la souris suite à l'immunisation par un vecteur AAV2 exprimant l'OVA sécrétée qui conduit à la formation d'anticorps de capture, d'anticorps neutralisants et de CTLs anti-OVA (Brockstedt et al., 1999). Dans cette étude le vecteur AAV2-OVA fut injecté

par différentes voies et les auteurs mirent en évidence que la voie intramusculaire était celle ayant le plus faible pouvoir immunogène quant à la génération de réponses cytotoxiques comparée aux voies intrapéritonéale, intraveineuse ou sous-cutanée. Ceci dénote une contradiction avec les résultats obtenus par Manning *et al.* qui après une injection de vecteur AAV2 en intramusculaire observèrent de fortes réponses cytotoxiques élimant rapidement le transgène. L'une des potentielles explications de cette différence au niveau du pouvoir immunogène lié à la voie intramusculaire pourrait être la nature et la forme du transgène. En effet, Sarukhan *et al.* (Sarukhan et al., 2001a) ont pu montrer qu'en reciblant à la membrane l'expression de la protéine lacZ (gène de l'opéron lactose codant pour la β -galactosidase) codée par un vecteur AAV2-lacZ, des réponses cytotoxiques spécifiques étaient observables et conduisaient à la destruction des cellules transduites ; ce qui n'était pas le cas lorsque l'expression de la protéine lacZ était restreinte au cytoplasme. Donc comme déjà suggéré précédemment, la localisation du produit du transgène impacte l'efficacité de reconnaissance par les CPAs, ce qui a pour conséquence de moduler l'activation des réponses cellulaires. Brockstedt *et al.* montrèrent que l'OVA sécrétée une fois délivrée par le vecteur AAV2 était prise en charge par la voie de présentation d'antigène par les molécules du CMH de classe I. Il a été montré *in vitro* que le vecteur AAV recombinant n'était pas efficace pour transduire des DCs car il n'a pas été possible d'y détecter la présence de transgène (Jooss et al., 1998), ce qui suggère que la voie de présentation directe est essentielle, et que donc l'absence de transduction des DCs par les vecteurs AAV recombinants est la raison principale de l'induction de réponses cellulaires faibles. La comparaison des réponses induites par les vecteurs AAV recombinants et les adénovirus a initialement suggéré que le faible potentiel de transduction des DCs par les vecteurs AAV recombinants était à la base de leur plus faible capacité à induire des réponses cellulaires. La voie de présentation croisée semble donc être spécifiquement sollicitée dans le cas de l'utilisation des vecteurs AAV recombinants, et pourrait être la clé pour l'initiation de réponses cytotoxiques contre le produit du transgène véhiculé. Enfin, il est important de noter que des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires spécifiques du transgène peuvent aussi être activés et « collaborer » avec les CTLs pour leur permettre d'accroître leur efficacité à supprimer le produit du transgène au sein des cellules ou du tissu ciblés par le vecteur AAV recombinant (Wang et al., 2005a).

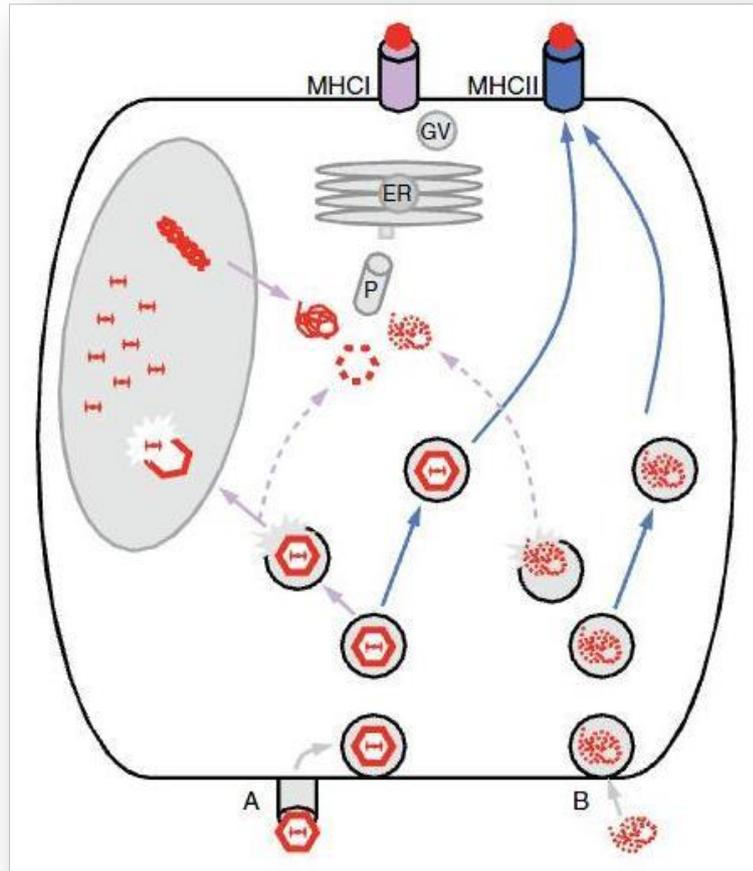


Figure 23 : Mécanismes d’apprêtement et de présentation des antigènes dérivés d’un vecteur AAV recombinant au sein d’une CPA.

A. Le vecteur AAV recombinant transduit la CPA qui l’internalise au niveau d’un de ces récepteurs spécifiques. Le vecteur va se retrouver dans des vésicules d’endocytose puis va pouvoir s’échapper du trafic endosomal afin que le transgène soit décapsidé pour être libéré au niveau du noyau et permettre la production endogène de la protéine correspondante. Au niveau du cytoplasme, la protéine va être prise en charge par le protéasome (P) et réduite en peptides antigéniques qui sont ensuite véhiculés par le transporteur d’antigènes TAP (transporter associated with antigen processing) jusqu’au réticulum endoplasmique (ER) pour être apprêtés et chargés sur les molécules du CMH de classe I. Puis le complexe ainsi formé va passer ensuite par l’appareil de Golgi et va atteindre la surface cellulaire via des vésicules golgiennes (GV), ce parcours décrit la voie de présentation directe. En parallèle, la capside de l’AAV ayant échappé aux endosomes peut également se retrouver prise en charge par le protéasome, et les fragments issus sont ensuite chargés sur les molécules du CMH de classe I pour être présentés à la surface de la cellule. Ce chemin emprunté par les molécules de la capside décrit la voie de présentation croisée. Enfin, le vecteur AAV peut suivre le trafic endosomal et des morceaux de sa capside peuvent se retrouver chargés sur les molécules du CMH de classe II pour être présentés directement. **B.** Les produits de la phagocytose de cellules transduites par le vecteur AAV recombinant ou les antigènes sécrétés par les cellules transduites préalablement, sont captés par la CPA. Une fois dans le trafic endosomal ces antigènes exogènes sont directement présentés à la surface cellulaire via les molécules du CMH de classe II. Ils peuvent également sortir des endosomes et se retrouver chargés sur des molécules du CMH de classe I pour être présentés de manière croisée. N.B. : Les lignes violettes pleines correspondent à la présentation directe d’antigène par les molécules du CMH de classe I, les lignes violettes pointillées correspondent à la présentation croisée d’antigène par les molécules du CMH de classe I, les lignes bleues correspondent à la présentation d’antigène par les molécules du CMH de classe II. D’après *Mays and Wilson, Molecular Therapy, 2011.*

Une étude intéressante basée sur l'utilisation de vecteurs AAV « self-complementary » montra leur capacité à générer des réponses à la fois humorales et cellulaires contre le produit du transgène beaucoup plus fortes que lors de l'utilisation de vecteurs AAV recombinants classiques (Wu et al., 2012). Le potentiel offert par ce type de vecteur en termes de rapidité de production et de rendement semblerait donc avoir un impact sur l'intensité des réponses immunitaires induites à l'encontre du produit du transgène ce qui dans le cadre de transfert de gènes en thérapie génique pourrait devenir très limitant, et au contraire serait un atout en vaccination dans la prophylaxie quaternaire.

Une autre étude démontra la capacité des réponses cellulaires induites par le vecteur AAV recombinant à éliminer un transgène fortement immunogène. Chez des souris exprimant un TCR transgénique spécifique de l'épitope HA (protéine de l'hémagglutinine du virus de la grippe), un vecteur AAV2-HA recombinant fut transféré par voie intramusculaire et quatre semaines après l'injection les fibres musculaires transduites furent complètement détruites par les réponses cellulaires (Sarukhan et al., 2001b). Les auteurs comparèrent l'efficacité à générer des réponses cellulaires entre le vecteur AAV2-HA recombinant et un vecteur adénovirus recombinant exprimant HA, et ils observèrent une différence de cinétique d'activation des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de HA. En effet, le vecteur adénovirus transduit très bien les DCs et donc celles-ci peuvent présenter directement sur les molécules du CMH de classe I les antigènes endogènes HA pour activer à terme les lymphocytes T CD8⁺ responsables de l'élimination du transgène. Au final, l'immunisation par vecteur adénovirus déclenche les deux types de voies de présentation d'antigène par les molécules du CMH de classe I ce qui explique la rapidité d'initiation des réponses cellulaires ; contrairement au vecteur AAV recombinant dont l'injection ne déclenche majoritairement que la voie de présentation croisée des antigènes.

La nature du sérotype d'AAV utilisé a aussi été montrée comme critique dans l'induction de réponses humorales et cellulaires spécifiques du produit du transgène. Ainsi, l'utilisation d'un vecteur AAV1 recombinant *in vitro* montra que celui-ci était beaucoup plus efficace dans la transduction des DCs par rapport à un vecteur AAV8 recombinant (Lu and Song, 2009). De plus, le vecteur AAV1 recombinant de par cette faculté, permettait de générer de fortes réponses humorales et cellulaires contre le produit du transgène qu'il véhiculait. De même, une autre étude montra que le vecteur AAV5 recombinant était beaucoup plus efficace que les vecteurs AAV1, AAV2, AAV7 et AAV8 recombinants, dans la génération de réponses humorales et cellulaires contre le produit du transgène (Xin et al., 2006). Donc la nature de la

capside du vecteur AAV recombinant impacte indéniablement le potentiel de celui-ci à déclencher une réponse immunitaire adaptative, et conditionne également sa capacité à faire s'exprimer l'antigène via la voie de présentation directe, voie montrée précédemment comme essentielle à l'initiation des réponses notamment cellulaires.

Enfin très récemment, une étude menée au sein de notre laboratoire montra l'impact du pouvoir immunogène d'un transgène véhiculé par un vecteur AAV1 recombinant injecté par voie intramusculaire (Carpentier et al., 2015). Les auteurs mirent en évidence la participation des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires dans l'initiation des réponses T CD8⁺ contre le produit du transgène. De plus, les anticorps spécifiques contre le produit du transgène apparaissent comme nécessaires à l'activation des lymphocytes T CD8⁺ anti-transgène par la voie de présentation croisée des molécules du CMH de classe I. Enfin la localisation cellulaire du produit du transgène, comme évoqué précédemment, fut montrée comme critique pour l'initiation de réponses T CD8⁺ car l'utilisation d'un vecteur AAV1 recombinant permettant l'expression de la forme cytoplasmique de l'OVA et régulé par un miR (microARN) endogène au lignage hématopoïétique (voir Partie Résultats pour plus de détails), s'avéra ne pas déclencher de réponses cytotoxiques et permit le maintien du transgène au sein des fibres musculaires. Une telle absence de réponses ne put être évitée lors de l'utilisation d'un même vecteur AAV1 recombinant exprimant la forme membranaire de l'OVA, ce qui conduit à la destruction du muscle et à l'apparition de nouvelles fibres musculaires.

Pour conclure, bien que les vecteurs AAV recombinants soient des outils très prometteurs pour la vectorisation de transgènes dans le cadre de la thérapie génique et ce notamment dû à leur absence de pathogénicité, il a bien été établi qu'ils étaient aussi générateurs de réponses immunitaires spécifiques contre leur capsid mais aussi, et c'est ce qui nous intéresse le plus dans notre étude, contre le produit du transgène. En effet, si ces réponses immunitaires adaptatives sont une barrière forte à l'établissement à long terme d'un transgène au sein d'un tissu cible, elles deviennent primordiales et indispensables à l'établissement d'une mémoire immunologique spécifique dans le cadre de la vectorisation de vaccins par le vecteur AAV recombinant. Le niveau de protection conférée par cette mémoire immunologique déclenchée par l'immunisation avec des vecteurs AAV recombinants représente un enjeu majeur dans les futurs protocoles de vaccination.

4. Utilisations en vaccination

L'utilisation des vecteurs AAV recombinants en vaccination s'est fortement développée à la suite des premières observations de réponses immunitaires générées contre le produit du transgène (Manning et al., 1997). Il est alors devenu évident que vectoriser à l'aide d'un vecteur AAV recombinant un antigène en vue d'établir une mémoire immunologique protectrice, était une stratégie intéressante. De nombreuses études se sont donc intéressées à établir une protection contre différents pathogènes en vectorisant des antigènes d'agents infectieux avec différents types de vecteurs AAV recombinants et selon différentes voies d'injection (voir tableau ci-dessous).

Une des caractéristiques remarquables des vecteurs AAV recombinants mise en relief lors de plusieurs études, est leur capacité à induire de fortes réponses humorales qui subsistent au cours du temps (Kuck et al., 2006; Li et al., 2012; Manning et al., 1997; Nieto et al., 2009; Ploquin et al., 2013). Certaines études révélèrent même que cette voie d'induction de réponses humorales était meilleure que d'autres types de vaccination tels que l'utilisation d'ADN, de protéines recombinantes ou de virus inactivés (Liu et al., 2005a; Manning et al., 1997). Cette capacité à maintenir dans le temps une telle quantité d'anticorps serait liée au fait que le transgène soit exprimé de manière continue et en grande quantité (Li et al., 2012; Lin et al., 2007a, 2007b; Ploquin et al., 2013). Pour autant, lorsque l'on souhaite établir une vraie protection telle qu'elle est définie dans le cadre de la vaccination contre des maladies infectieuses, le fait de générer une réponse humorale forte et qui se prolonge dans le temps n'est pas toujours suffisant. En effet, l'appui de la réponse cellulaire cytotoxique est indispensable pour éradiquer définitivement certains pathogènes intracellulaires en stoppant leur propagation et via la suppression des cellules infectées.

Deux études ont véritablement investigué les réponses cellulaires T CD8⁺ spécifiques de transgènes véhiculés par des vecteurs AAV recombinants en termes de qualité des réponses ainsi qu'en nombre de cellules générées (Lin et al., 2007a, 2007b). Ces études ont établi une incapacité des lymphocytes T CD8⁺ à s'amplifier après un boost avec un vecteur adénovirus et donc une absence de protection vaccinale. Les analyses phénotypiques montrèrent des marqueurs d'épuisement cellulaire corrélant avec une expression continue du transgène. Cependant, l'utilisation d'un autre sérotype d'AAV, l'AAVrh32.33, permit d'induire des réponses T CD8⁺ fonctionnelles capables de s'amplifier lors d'un boost avec un vecteur adénovirus chez les souris et les primates non humains, suggérant que le sérotype d'AAV

joue un rôle important dans l'établissement d'une mémoire cellulaire fonctionnelle (Lin et al., 2009). De plus de manière intéressante, ce sérotype a été montré comme étant le seul chez la souris à générer une réponse T CD4⁺ anti-capside (Mays et al., 2009). L'AAVrh32.33 a aussi été caractérisé comme transduisant très bien les DCs et ayant une capacité inflammatoire (Mays et al., 2013).

Une autre méthode basée sur l'utilisation des vecteurs AAV recombinants consiste à faire produire des protéines solubles telles que les immunoglobulines capables de former un complexe immun avec un antigène donné, cette méthode est appelée l'immunothérapie passive. Ici, le produit exprimé n'est pas destiné à être la cible d'une réponse immunitaire cellulaire et/ou humorale, mais au contraire à être un acteur de l'éradication d'un pathogène précis. Quelques études ont mis en avant l'utilisation des vecteurs AAV recombinants dans un contexte d'immunothérapie passive (Balazs et al., 2011, 2013; Johnson et al., 2009; Lewis et al., 2002; Limberis et al., 2013; Skaricic et al., 2008). Néanmoins, une limitation à cette méthode peut en diminuer le potentiel vaccinal car pour une utilisation optimale d'une thérapie basée sur la production d'anticorps il faut pouvoir s'assurer d'exprimer la totalité de l'immunoglobuline avec des quantités équivalentes de chaînes lourdes et légères produites (Fang et al., 2005).

A l'heure actuelle, deux essais cliniques, un de phase I (Mehendale et al., 2008) et un de phase II (Vardas et al., 2010), utilisant le transfert de gène par un vecteur AAV recombinant dans un contexte d'induction de réponses immunitaires ont été réalisés chez l'homme.

La faible immunogénicité des vecteurs AAV dérivés de sérotypes naturels soulignée par une expression continue du transgène et une absence de fonctionnalité des réponses cellulaires, doivent être des champs d'investigation principaux dans l'amélioration de ces outils de vaccination. De plus, la présence d'un peptide immunogène au sein de la capsid est également un paramètre à prendre en considération (Mays et al., 2009).

L'existence de plusieurs capsides d'AAV permet notamment la mise en place de stratégies d'activation et de boost utilisées en laboratoire qui s'apparentent à l'injection primaire et au rappel en vaccination, tout en évitant une capture de la particule d'AAV par des anticorps neutralisants spécifiques d'une capsid donnée. Bien entendu, il faut tenir compte de la capacité de réaction croisée de certains anticorps générés contre des sérotypes d'AAV ayant des séquences en acides aminés de capsid proches.

De manière intéressante, il a été montré chez la souris que même dans le cadre d'une immunité préexistante, il était possible de réadministrer par voie intranasale certains sérotypes

d'AAV capables d'induire de bonnes réponses immunitaires contre le transgène qu'ils véhiculaient en évitant leur capture par des anticorps neutralisants qui leur sont spécifiques (Limberis and Wilson, 2006).

Chez la souris, le changement de sérotype d'AAV lors d'une seconde injection permet d'éviter l'action des anticorps neutralisants générés pendant la première injection avec un sérotype différent. Cependant, chez l'homme les anticorps anti-AAV neutralisants ont une forte capacité de réaction croisée ne permettant pas une telle échappatoire. Comme vu précédemment, le sérotype AAVrh32.33 affiche la séroprévalence en anticorps neutralisants la plus faible (< 2 % de la population positive mondiale), caractéristique avantageuse dans un contexte de vaccination humaine.

Enfin, les doses de vecteurs AAV recombinants injectées font également partie des paramètres à contrôler. En effet, de trop fortes doses peuvent avoir une incidence sur l'amplitude des réponses immunitaires d'une part, mais également peuvent conduire à une fuite d'expression du transgène dans un compartiment différent du tissu cible d'autre part.

La figure ci-dessous regroupe l'ensemble des études impliquant les vecteurs AAV recombinants en tant qu'outils vaccinaux, études décrites selon les sérotypes d'AAV utilisés, les voies d'administration et les hôtes, ainsi que la nature des réponses générées. Il est important de noter que les voies intramusculaire et intranasale ont été jusqu'à présent les voies d'immunisation les plus investiguées, conférant ainsi à mon projet de thèse un intérêt tout particulier puisque se focalisant sur une voie d'injection décrite jusqu'ici dans une seule et unique étude, la voie intradermique.

Antigène	Sérotypes d'AAV	Voie d'injection / Hôte	Nature des réponses	Référence
HSV-1 (gB and gD)	AAV2	IM/mice	cellulaire / humorale	[1]
HPV (E7, E7/hsp70 L1)	AAV2	IM/mice	cellulaire	[2]
	AAV2	IM/mice	humorale	[3]
	AAV5	IN/mice	cellulaire / humorale	[4]
	AAV5, 8, 9	IN/mice	cellulaire / humorale	[5]
	AAV1, 2	IM/mice	cellulaire	[6]
	AAV5, 9	IN/macaques	humorale	[7]
HIV (env, tat, rev)	AAV2	IM, SC, IN, IP/mice	cellulaire / humorale	[8]
	AAV2	Oral/mice	cellulaire / humorale	[9]
	AAV1, 3, 4, 5, 7, 8	IM/mice	cellulaire / humorale	[10]
	AAV1, 2, 5, 7, 8, 9	IM/mice	cellulaire / humorale	[11]
			cellulaire	[12]
		AAV8, rh32-33	IM/mice	cellulaire / humorale
	scAAV2, 7, 8	IM/mice	cellulaire / humorale	[14]
SIV	AAV2	IM/macaque	cellulaire / humorale	[15]
SARS-CoV (S protein)	AAV2	IM/mice	humorale	[16]
Malaria (MSP4, 4/5)	AAV1, 3	IM/mice	humorale	[17]
Influenza (NP, H1, M1)	AAV8, rh32.33	IM/mice	cellulaire / humorale	[13]
	AAV9	IM/mice	cellulaire / humorale	[18]
DEV (Env)	AAV8, rh32.33	IM/mice	humorale	[19]
TB (Ag85A)	Modified AAV2	IM/mice	humorale	[20]
NIV (G protein)	AAV1, 8, rh32.33	IM, ID/mice	humorale	[21]

Figure 24 : Tableau récapitulatif des études basées sur l'utilisation des vecteurs AAV recombinants en vaccination.

IM : intramusculaire, IN : intranasale, ID : intradermique, IP : intraportale, SC : sous-cutanée, HIV : VIH, SIV : virus de l'immunodéficience simienne, SARS-CoV : coronavirus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère, DEV : virus de la dengue, TB : *Mycobacterium tuberculosis*, NIV : virus Nipah. Adapté de Nieto and Salvetti, *Frontiers in Immunology*, 2014. Voir annexe 3 pour les références.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Dans les études expérimentales menées en vaccination, l'utilisation de vecteurs est devenue de plus en plus répandue depuis que l'on connaît leur potentiel à pouvoir véhiculer et faire s'exprimer un transgène de manière spécifique dans des tissus cibles, et ainsi moduler l'intensité et la qualité des réponses immunitaires adaptatives spécifiques au produit de ce transgène. Dans ce domaine, et plus particulièrement en ce qui concerne l'induction de réponses cellulaires par ces vecteurs, deux études ont montré que la vaccination avec des vecteurs AAV recombinants ne conduisait pas à générer des réponses mémoires T CD8⁺ efficaces capables de conférer une protection telle qu'elle est définie dans un contexte de vaccination (Lin et al., 2007a, 2007b). De plus, il est important de souligner que dans ces deux études la voie intramusculaire fut choisie comme voie modèle d'administration des vecteurs AAV recombinants, et que donc l'appréciation de ces résultats doit être restreinte à ce type d'injection. Au sein du laboratoire, nous avons donc souhaité comprendre quels pourraient être les mécanismes qui régissent la génération de lymphocytes T CD8⁺ mémoires fonctionnels et protecteurs contre un antigène véhiculé par un vecteur AAV recombinant. Le laboratoire possède une expertise dans l'utilisation des vecteurs AAV recombinants dont celle de deux constructions qui me permirent de réaliser les travaux de mon projet de thèse. Comme évoqué précédemment, jusqu'à présent seule la voie d'injection intramusculaire des vecteurs AAV recombinants avait été investiguée dans l'évaluation des capacités fonctionnelles des réponses cellulaires. Ainsi, nous nous sommes intéressés à une autre voie d'injection, la voie intradermique, décrite depuis longtemps comme ciblant un site naturel d'immunisation, la peau, qui est le lieu de résidence de différents types de CPAs suggérant un très fort potentiel de cette voie à générer des réponses cellulaires fortes et fonctionnelles. Les deux constructions de vecteurs AAV recombinants sur lesquelles repose mon projet de thèse permirent d'apporter des modulations quant à la nature et la fonctionnalité des réponses T CD8⁺ mémoires induites.

Basé sur ce modèle unique, je me suis attelé à évaluer :

- 1.** L'impact de la voie d'injection sur les réponses cellulaires induites par un vecteur AAV recombinant et dirigées contre le transgène, en menant l'étude en parallèle au sein du tissu musculaire et de la peau.
- 2.** L'impact de la voie de présentation d'antigène, en analysant les réponses générées par une construction régulée par le microARN miR-142-3p, dont la particularité est d'inhiber l'expression du transgène dans les CPAs (voir Partie Résultats pour la caractérisation en détails de ces outils).

3. L'impact d'un apport sélectif d'effet auxiliaire par les lymphocytes T CD4⁺, et cela aussi bien pour la construction sauvage que pour la construction régulée par le microARN miR-142-3p.

Enfin, après avoir caractérisé les différentes populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires générées dans les différentes conditions listées ci-dessus, les souris immunisées issues des groupes les plus intéressants furent soumises à un test ultime de protection vaccinale *in vivo* en les challengeant avec une bactérie à fort pouvoir pathogénique.

Le schéma ci-dessous représente une vue d'ensemble de mon projet de thèse ainsi que les objectifs définis pour sa réalisation.

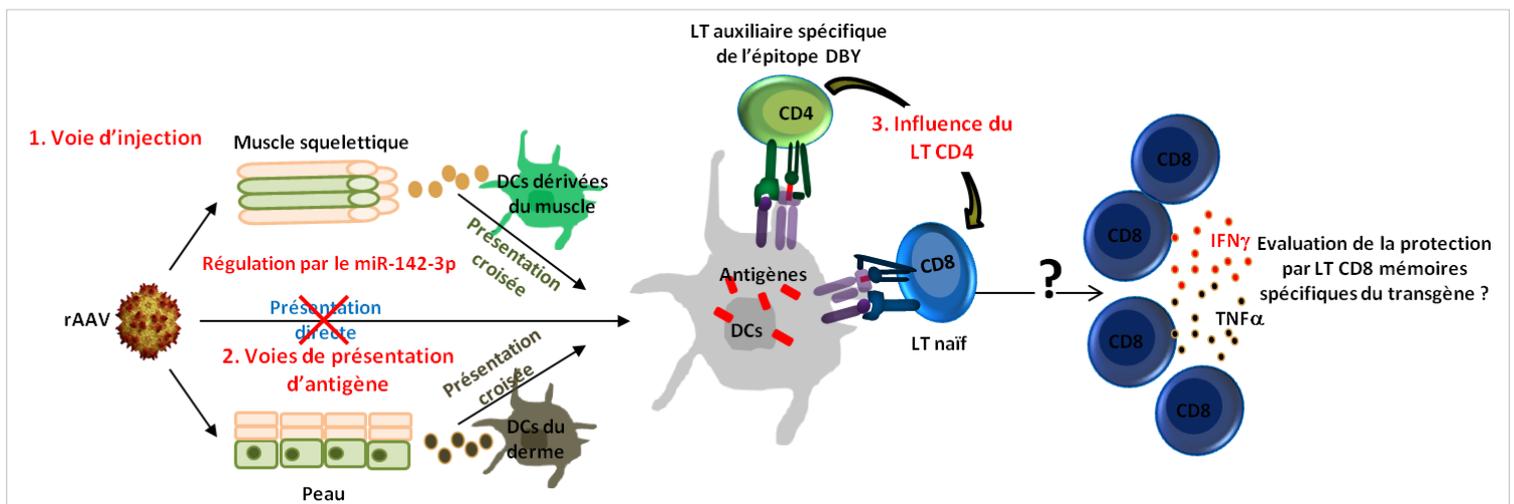


Figure 25 : Un modèle unique d'étude des paramètres cellulaires et moléculaires régulant l'induction de lymphocytes T CD8⁺ mémoires à long terme suite à une vaccination par des vecteurs AAV recombinants.

RESULTATS

Contexte de l'étude

La genèse de ce travail de thèse repose sur l'expertise du laboratoire dans le domaine de la thérapie génique et de la régulation des réponses immunitaires suite à l'utilisation du vecteur AAV recombinant en tant qu'outil majeur dans le transfert de gène. En effet, l'utilisation d'un tel vecteur dans le cadre d'applications en biothérapie permet la transduction de cellules déficientes pour un gène dans l'espoir de rétablir l'expression et la fonctionnalité de celui-ci. Le laboratoire s'intéresse notamment à la vectorisation de transgène par la voie intramusculaire, voie permettant un accès direct aux cellules atteintes dans un type particulier de myopathies génétiques appelées dystrophies musculaires. Les travaux menés dans le domaine de la thérapie génique sur ces dystrophies musculaires, dont une des formes les plus connues est celle de Duchenne, représentent un enjeu majeur qui est avant tout thérapeutique car on estime aujourd'hui qu'un garçon sur 3500 est atteint de la dystrophie musculaire de Duchenne dès la naissance (Kieny et al., 2013).

Dans le cadre des travaux de recherche menés dans le laboratoire, l'équipe s'intéresse de près à l'obstacle principal conditionnant l'établissement ou non à long terme d'un transgène au sein d'un tissu : la réponse immunitaire adaptative contre ce transgène. Lorsqu'une cellule transduite se met à exprimer la protéine provenant du transgène inséré dans le vecteur AAV recombinant, elle devient la cible des cellules immunitaires et est rapidement éliminée ne permettant pas le maintien du transgène. Ce mécanisme est l'assurance de l'intégrité cellulaire par le système immunitaire en vue de supprimer tout élément étranger à l'organisme.

Préalablement à mon arrivée dans le laboratoire, une étude fut réalisée dont le but premier était d'essayer d'éviter les réponses immunitaires spécifiques contre un transgène, vectorisé par un vecteur AAV recombinant, en vue de la greffe de celui-ci au sein d'un tissu cible défini dans cette étude comme étant le muscle squelettique. En sélectionnant ce tissu, l'intérêt était évidemment de se placer dans les conditions d'une pathologie telle que la dystrophie musculaire de Duchenne. A travers un tel challenge, le laboratoire espérait induire un mécanisme immunologique fondamental et indispensable en thérapie génique : la tolérance au transgène. Ce travail s'est appuyé sur la construction et l'utilisation *in vivo* d'un vecteur AAV recombinant pseudotypé ayant un fort tropisme pour le tissu musculaire et contenant le gène permettant l'expression de la forme membranaire de l'OVA suivi de la séquence contenant l'antigène mâle H-Y, expressions contrôlées sous le promoteur ubiquitaire du gène PGK (phosphoglycerate kinase) ; ce vecteur fut nommé rAAV2/1-mOVA-HY. Au sein de cette construction ont été identifiés deux épitopes à forte immunogénicité : un épitope de classe I

OVA₂₅₇ capable d'activer les lymphocytes T CD8⁺ et un épitope de classe II DBY₆₀₈ capable quant à lui d'activer les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires. Les avantages de ce modèle de vecteur reposent donc sur le fait d'avoir un ciblage du muscle ainsi qu'une réponse immunitaire détectable et facile à suivre, le transgène OVA étant aujourd'hui très bien caractérisé grâce à de nombreux outils disponibles. Afin de pouvoir utiliser cet outil dans le but d'induire une tolérance à un transgène modèle, le laboratoire s'est intéressé aux résultats pionniers de deux études. Tout d'abord, au début des années 2000 l'équipe de Lodish et Bartel démontra la capacité de certains miRs à moduler l'expression de gènes au sein du lignage hématopoïétique et donc à conditionner sa différenciation (Chen et al., 2004). Le fait que les miRs soient capables d'interférer sur la régulation de l'expression d'un gène au niveau post-transcriptionnel n'était en soi pas nouveau car ils avaient été identifiés au sein des plantes et des animaux comme ayant une telle fonction depuis environ dix ans (Lee et al., 1993). Le plus remarquable dans cette étude fut de mettre en évidence que certains de ces miRs n'étaient présents qu'au sein du lignage hématopoïétique et nulle part ailleurs offrant ainsi un potentiel considérable dans la régulation de l'activation des cellules du système immunitaire issues de ce lignage. Puis deux ans après cette découverte, l'équipe de Naldini fit la caractérisation d'un miR endogène au système hématopoïétique, le miR-142-3p. En utilisant une construction reposant sur un vecteur lentiviral et permettant l'expression de la GFP, l'équipe de Naldini démontra *in vivo* que l'utilisation de séquences cibles de ce miR ajoutées au vecteur permettait de réduire jusqu'à cent fois l'expression de la GFP au sein des cellules hématopoïétiques telles que les cellules de Kupffer tout en maintenant de manière significative son expression au sein des autres lignages et notamment dans les hépatocytes et les cellules endothéliales (Brown et al., 2006). Ce constat ouvrait donc le champ à la possibilité d'établir à long terme un transgène dans des cellules non hématopoïétiques tout en évitant son expression dans les cellules immunitaires présentatrices d'antigène capables d'activer de manière directe la réponse immunitaire adaptative. Forts de ces observations, il fut d'abord décidé au sein du laboratoire d'utiliser les caractéristiques du miR-142-3p dans la régulation d'un vecteur AAV recombinant codant pour la protéine humaine sarcoglycane du muscle en lui ajoutant quatre séquences cibles répétées du miR-142-3p (Boisgerault et al., 2013). Puis de la même manière, le vecteur AAV recombinant préalablement décrit (rAAV2/1-mOVA-HY) fut modifié en lui ajoutant quatre séquences cibles répétées du miR-142-3p ; ce vecteur fut alors nommé rAAV2/1-mOVA-HY-miR. Ce vecteur fut administré par voie intramusculaire à des souris mâles et femelles de type C57BL/6 afin 1) soit de ne focaliser la réponse immunitaire qu'envers le transgène principal à savoir le gène codant pour

OVA et d'éviter un effet auxiliaire de la réponse contre l'antigène mâle H-Y chez les souris mâles ; 2) soit de pouvoir visualiser une réponse immunitaire contre OVA supplémentée par la réponse auxiliaire contre H-Y chez les souris femelles.

Les résultats de ces travaux sont présentés dans la figure ci-dessous.

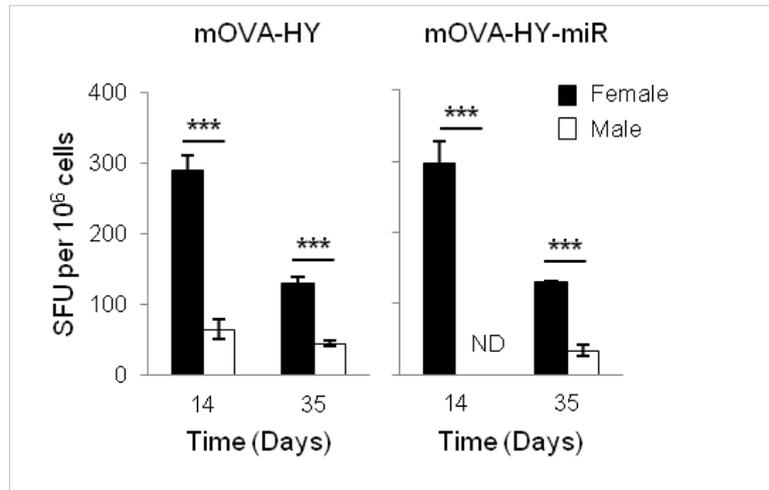


Figure 26 : La réponse des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires contre l'antigène H-Y conditionne l'amplitude de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ contre le transgène OVA et son apparition précoce au cours de sa régulation par le miR-142-3p.

(Carpentier et al., 2015)

Ces résultats mirent en évidence trois points : 1) En absence concomitante de présentation directe de l'antigène par les DCs ainsi que de réponses T CD4⁺ auxiliaires, la régulation par le miR-142-3p permet d'éviter une réponse des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques contre le transgène OVA et ce jusqu'à 14 jours après immunisation intramusculaire. 2) Pour autant à partir de 35 jours, des réponses T CD8⁺ cytotoxiques deviennent à nouveau détectables et équivalentes à celles observées lors de la présentation directe ne permettant pas la greffe à long terme du transgène au sein du tissu cible. 3) L'effet des réponses T CD4⁺ auxiliaires sur les réponses T CD8⁺ cytotoxiques contre l'OVA permet à lui seul d'amplifier ces réponses indépendamment de la régulation par le miR-142-3p et ce quel que soit le délai après l'injection.

Ces travaux permirent d'estimer la relevance à utiliser notre construction régulée par le miR-142-3p pour faire du transfert de gène et permettre son établissement à long terme au sein du tissu tel que cela est souhaité en thérapie génique. Il est apparu que la voie de présentation croisée d'antigène tissulaire favorisée par la régulation de la voie de présentation directe par le miR-142-3p permet certes, de retarder l'induction de réponses spécifiques T CD8⁺ contre le transgène OVA, mais à terme conduit à son élimination.

Intradermal immunization with rAAV2/1 vector induces potent memory CD8⁺ T cell responses.

Alexandre Ghenassia¹, David-Alexandre Gross¹, Stéphanie Lorain², Fabiola Tros¹, Alain Charbit¹, Jean Davoust¹, Pascal Chappert¹.

¹ Institut Necker Enfants Malades, INSERM U1151, CNRS, UMR8253, Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ² Myology Research Center, UM76, INSERM U974, CNRS FRE 3617, Institut de Myologie, UPMC Université Paris 6, Sorbonne Universités, Paris, France.

Correspondence should be addressed to: Pascal Chappert or Jean Davoust, INEM Inserm U1151 – Team 8, Hôpital Necker - Enfants Malades, 149 rue de Sèvres, 75743 PARIS cedex 15. Phone: (33)1 44 49 53 65; E-mail: pascal.chappert@inserm.fr or jean.davoust@inserm.fr.

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

ABSTRACT

Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors exhibit interesting properties as vaccine carriers for their ability to induce long-lasting antibody responses. However, rAAV-based vaccines have been suggested to trigger functionally impaired long-term memory CD8⁺ T cell responses, in part due to poor dendritic cell (DCs) transduction. Such results, albeit limited to intramuscular immunization, undermined the use of rAAV as vaccine vehicles against intracellular pathogens. We report here that intradermal immunization with a model rAAV2/1-based vaccine drives the development of bona fide long-term memory CD8⁺ T cell responses. The intradermal route of immunization and the presence of potent MHC Class II responses showed synergistic effects on the overall quantity and quality of both tissue-resident and systemic long-term effector-memory transgene-specific CD8⁺ T cells being generated. Of key interest, we further found that the phenotype and protective potential of memory CTLs induced following intradermal immunization were fully preserved in the absence of transgene expression in DCs, as cross-presentation appeared highly enhanced for skin-expressed transgenes. Overall our results provide rationale for the use of a novel intradermal administration route and for carefully considering the availability of MHC-II epitopes within transgenes in the future design of rAAV-based vaccines aimed at inducing potent memory CD8⁺ T cell responses.

INTRODUCTION

Since the initial reports showing that recombinant vectors derived from the singled-stranded DNA parvovirus Adeno-Associated Virus (rAAV) could generate adaptive immune responses against the encoded transgene (1-3), rAAV have progressively drawn interest as potential vaccine vehicles. rAAV can transduce both dividing and non-dividing cells, leading to high and sustained level of transgene expression in target tissue, while exhibiting an excellent safety profile in humans. The wild type AAV is naturally non-pathogenic in humans and engineered recombinant vectors are devoid of any encoded viral gene and have been well tolerated in clinical trials so far (1-5). Numerous serotypes and capsid variants have further been characterized, allowing both heterologous prime/boost regimens as well as broad tissue-tropism, of particular interest for the induction of local immunity. Experiments conducted in various animal models have confirmed the ability of rAAV to drive sustained protective humoral immunity through a variety of injection routes (6). However, reports of functionally impaired memory CD8⁺ T cell responses induced following intramuscular immunization led to the current paradigm that rAAV vectors are poorly suited for the induction of cellular immunity (7, 8), a key requirement for protective immunity against intracellular pathogens.

Sub-cellular localization of the transgene product (9, 10); presence of MHC-II epitopes (10); vector dose; capsid serotype; route of immunization (2, 11) and target tissue inflammatory status (12, 13) have all been shown to influence the generation of adaptive immunity following rAAV injection (14). A key limitation of rAAV vectors in generating potent cytotoxic T cell (CTL) responses notably resides in the limited triggering of local inflammation and poor transduction of tissue-resident antigen-presenting cells achieved by most common rAAV serotypes (15-17). The later most probably impose an enhanced reliance

on efficient cross-presentation of tissue-expressed transgene products by tissue-resident dendritic cells (DCs) for efficient T-cell priming following rAAV-mediated vaccination (18).

While muscles harbor few macrophages and dendritic cells at the steady state (19-21), the skin houses an extensive network of residing dendritic cells (22) and represents a very well-characterized tissue for vaccine delivery (23). Efficient cross-presentation capacity from defined subsets of skin dendritic cells have been reported (24, 25). More importantly, experimental data obtained in the context of vaccinia virus immunization suggest that the direct presentation pathway is dispensable in the context of intradermal, but not intramuscular, immunization (26). In spite of clear interest for potential rAAV-based vaccines, scarce data exist regarding adaptive immune responses induced following rAAV intradermal immunization, with, to our knowledge, only one report so far further focused on anti-transgene humoral responses (27).

We report in this study that, in synergy with CD4⁺ T cell help, targeting the skin with rAAV2/1 vectors expressing a model ovalbumin transgene leads to increased numbers and quality of all main anti-transgene memory CD8⁺ T cell subsets, including the generation of skin-resident memory CD8⁺ T cells. Most importantly, this process led to a state of transgene-specific protective systemic immunity and appeared to solely rely on the efficient cross-presentation of skin-expressed transgene products, eliminating the need for additional strategies aiming at enhancing rAAV-mediated DC transduction.

RESULTS

Intradermal immunization with rAAV2/1 vector induces robust primary CD8⁺ T cell responses.

Robust anti-transgene B cell responses following intradermal (i.d.) immunization with rAAV2/1 or rAAV2/8 vectors have recently been described (27). However, no study so far has analyzed in detail the generation of CD8⁺ T cell responses. We thus first assessed whether intradermal immunization with rAAV would indeed induce significant CD8⁺ T cell responses. We wished in this study to compare intradermal and intramuscular (i.m.) immunization routes as well as the impact of CD4⁺ T cell help on the intensity and quality of rAAV-induced CD8⁺ T cell responses. We thus decided to focus our investigation on the rAAV2/1 vector, shown to be very efficient at targeting muscle cells (28, 29). We additionally chose doses compatibles with the inductions of CD8⁺ T cells responses following intramuscular immunization in our hands, both in the presence and in the absence of CD4⁺ T cell help (10). Finally, we made use of an OVA-based model transgene, which encodes the full-length membrane-bound ovalbumin fused to UTY₂₄₆ and DBY₆₀₈ male HY antigen epitopes (rAAV2/1-mOVA-HY) (Figure 1A). The natural tolerance of male mice to the male-derived epitopes allows us to efficiently track the establishment of rAAV-induced CD8⁺ T cell responses in the presence (female) or absence of anti-DBY₆₀₈ CD4⁺ T cell responses (male), without potential interferences from CD4-depleting treatments (10).

Following intramuscular immunization in the tibialis anterior, strong effector OVA₂₅₇-specific CD8⁺ T cell responses could be observed by day 14 in the blood of immunized C57Bl/6 female mice. This response was strongly curtailed in male individuals (Figure 1B-C), confirming our previous observation regarding the impact of CD4⁺ T cell help on the regulation of primary CD8⁺ T cell responses induced by intramuscular immunization with

rAAV2/1 vectors (10). Similar responses were obtained in female mice following intradermal immunization in the ear and these response also appeared dependent on CD4⁺ T cell help, albeit to a lesser extent (Figure 1B-C). Similar results were obtained from the spleen and ear draining lymph nodes of intradermally immunized individuals (data not shown). In line with the robust anti-transgene cellular responses observed following intradermal rAAV2/1 immunization, such response led to strong CD8⁺ T cell infiltration in both dermis and epidermis of injected ear (Supplemental Figure 1).

Potent intradermal-induced CD8⁺ T cell responses are generated in the absence of direct presentation of the transgene.

We have previously shown that, in the absence of CD4⁺ T cell help, T cell priming following intramuscular immunization of an rAAV2/1 vector is partially dependent on the direct presentation of the transgene product (10). This may represent a limiting factor for rAAV serotypes less prone to transducing DCs (15, 18). Given the known cross-presentation capacity of skin APCs (24-26), we wished to investigate whether these limitations hold true following intradermal immunization. To test this, we made use of a previously described miR-142-3p-regulated rAAV2/1-mOVA-HY construct in which the addition of four target sequences of the endogenous microRNA miR142-3p (miR-142-3pT) were added in 3' of the original mOVA-HY expression cassette (10) (Figure 2A). The miR142-3p is naturally expressed in all cells of the hematopoietic lineage, leading to a robust suppression of transgene expression in all DC populations (30).

In agreement with our previous observations, intramuscular immunization with a miR142-3p-regulated-mOVA-HY expressing rAAV2/1 vector led to a much-reduced CD8⁺ T cell responses (Figure 2B-C). This response appeared further delayed in time, with a peak around day 21 as compared to day 14 for the regular mOVA-HY construct. In marked contrast, the sole cross-presentation of skin-expressed transgene was sufficient to induced potent long-

lasting anti-transgene CD8⁺ T cell responses, with only a mild reduction of the intensity of the response at day 14 (Figure 2B-C). This confirmed that direct priming is dispensable for the induction of CD8⁺ T cell responses following intradermal immunization with a rAAV2/1 vector, as previously observed with a recombinant vaccinia vector (26).

This clear difference in the intensity of the response observed between an intramuscular and an intradermal immunization with the miR142-3p-regulated-mOVA-HY expressing rAAV2/1 vector suggested that skin-expressed transgene products are efficiently cross-presented. To directly monitor cross-presentation events *in vivo*, we transferred naïve OVA-specific TCR transgenic OT-1 T cells, which recognize the MHC class-I bound OVA257 epitope, at different time point following the initial challenge and assessed their propensity to up-regulate CD69 and CD25, two early T-cell activation markers, in hosts immunized with rAAV2/1-OVA-HY±miR (Supplemental Figure 2A). In individuals immunized with rAAV2/1-mOVA-HY via the intramuscular route, robust activation of transferred OT-1 was detected by day 5 in muscle-draining lymph nodes (Supplemental Figure 2B-C). Intramuscular immunization with the miR142-3p-regulated construct, however, led to a reduced and delayed presentation of OVA257 to the transferred OT-1, in line with the observed reduced CD8⁺ T cell responses (Figure 2D-E). This confirmed that cross-presentation of muscle-expressed transgene products only accounts for a fraction of the overall antigen-presentation following intramuscular immunization with rAAV2/1 vectors. In contrast, cross-presentation events of skin-expressed transgene products appeared at earlier time points and were enhanced, with robust activation of transferred OT-1 as early as day 5 and continuously higher levels of OT-1 activation than the intramuscular control group up to day 9 (Figure 2F-G).

Interestingly, the dependency of intramuscular-induced CD8⁺ T cell responses on the direct presentation pathway was not observed in female mice, in the presence of a strong CD4⁺ T helper response (Figure 3A-B). CD4⁺ T cell help, however, only had a limited impact on the

cross-presentation of transgene-derived products (Supplemental Figure 3), suggesting that CD4⁺ T cell help and route of immunization might act at different levels to control primary CD8⁺ T cell responses in the context of rAAV immunization.

CD4⁺ T cell help and route of immunization synergize in regulating the induction of anti-transgene central and effector/memory CD8⁺ T cells following rAAV2/1 immunization.

To further assess whether the route of immunization and the availability of CD4⁺ T cell help also impact the formation of memory CD8⁺ T cells following rAAV-mediated immunization, we next analyzed the phenotype of memory CD8⁺ T cells generated following a single prime with this model rAAV-based vaccine. By day 60, intramuscular immunization with rAAV2/1, in the absence of help, mostly induced low number of splenic OVA-specific (OVA₂₅₇⁺) terminally-differentiated effector (CD44^{hi}KLRG1⁺CD62L⁻ long-lived T_{eff}) and effector memory (CD44^{hi}KLRG1⁻CD62L⁻ T_{em}) CD8⁺ T cells (Figure 4A-C), as well as a population of draining lymph nodes-resident OVA₂₅₇⁺ CD8⁺ T_{em} (Supplemental Figure 4). No significant frequency of central memory (CD44^{hi}KLRG1⁻CD62L⁺ T_{cm}) CD8⁺ T cells could be detected in the lymphoid organs of most of the analyzed individuals. Simply changing the route of administration (Male i.d. group) or adding CD4⁺ T cell help (Female i.m; group) had no significant impact on the generation of central memory (T_{cm}) and effector memory (T_{em}) CD8⁺ T cells (Figure 4D-H and Supplemental Figure 4). While CD4⁺ T cell help did increase the overall number of OVA-specific CD8⁺ T cell recovered, it mostly induced splenic KLRG1⁺ long-lived effector CD8⁺ T cells, as previously reported in the context of several anti-pathogen CD8⁺ T cell responses (31). Enhanced frequencies and numbers of T_{cm} and T_{em}, however, were clearly observed in all lymphoid organs analyzed following intradermal immunization in the presence of CD4⁺ T cell help (Female i.d. group) (Figure 4D-H, Supplemental Figure 4 and data not shown). In line with our observation regarding the

primary phase of the anti-transgene CTL response, the impact of targeting the skin or adding CD4⁺ T cell help alone was evident with the miR142-3p-regulated mOVA-HY construct, with notably enhanced splenic long-lived effector CD8⁺ T_{eff} and T_{em} in intramuscularly immunized female mice and enhanced splenic and dLN-resident T_{em} in intradermally immunized male mice (Figure 4D-H and Supplemental Figure 4). Most importantly, and similar to the WT construct, optimal differentiation of all three subtypes of memory T cells induced by the sole presence of cross-presentation of an vaccinal rAAV-transgene was systematically observed following intradermal immunization in the presence of CD4⁺ T cell help.

Re-expression of receptors involved in receiving survival signals from the environment is an additional key step for long-term memory T cell generation. IL-7R α (CD127) - naturally expressed by naïve T cells, down-regulated upon activation and re-expressed upon memory differentiation (32) - is a prototype example of such receptor. In the context of an intramuscular immunization in the absence of help, IL-7R α was weakly re-expressed by both anti-transgene long-lived effector and effector memory populations generated (Figure 4I). In the spleen, simply switching from an intramuscular to an intradermal route of immunization was sufficient to restore IL-7R α re-expression on OVA₂₅₇⁺ T_{em}, to levels even higher than on naïve CD8⁺ T cells, and partial re-expression on long-lived T_{eff} generated with both constructs (Figure 4J and data not shown). CD4⁺ T cell help alone had little to no-impact. In draining lymph nodes, maximal re-expression of IL-7R α , however, did require the combination of an intradermal immunization and a concomitant CD4⁺ T cell response (Supplemental Figure 4). Interestingly, OVA₂₅₇⁺ T_{cm} generated in this context bore even higher level of IL-7R α , regardless of the antigen presentation pathway being targeted or of the tissue being analyzed (Figure 4K and Supplemental Figure 4).

Overall these results demonstrate a key synergy between CD4⁺ T cell help and the route of administration in controlling the full acquisition of a bona fide central and effector/memory phenotype on anti-transgene CD8⁺ T cells following rAAV immunization.

CD4⁺ T cell help and route of immunization synergize in regulating the induction of functional memory CD8⁺ T cell responses following rAAV2/1 immunization.

A key property of memory CD8⁺ T cells, and predictive marker of protective immunity (33, 34), is their capacity to rapidly perform multiple effector functions, including the production of various effector cytokines. Intramuscular immunization in the absence of CD4⁺ T cell help, with or without direct presentation, led to OVA-specific CD8⁺ T cells mostly capable of producing IFN γ , with respectively less than 30% and 5% capable of producing TNF α and IL-2 (Figure 5A-D). CD4⁺ T cell help or skin targeting independently enhanced the overall polyfunctionality of generated memory T cells against the wild type construct, with intradermal immunization having the highest impact on IL-2 production (Figure 5B-D). CD4⁺ T cell help alone, however, was insufficient to restore maximal CTL polyfunctionality in the absence of direct presentation after intramuscular immunization and targeting the skin proved indispensable in this context (Figure 5D).

To further test whether these enhanced responses would indeed confer protective advantage to immunized mice in the context of a secondary pathogen encounter, we challenged mice intraperitoneally (i.p.) with lethal doses of 10⁶ CFU of OVA-expressing *Listeria monocytogenes* (Lm-OVA). Protective immunity against this model pathogen has been shown to rely mostly on Lm-specific CTL (35). Given the strong effector/memory CD8⁺ T cell responses detected in our experimental setting, we chose to focus here solely on a single intradermal rAAV prime regimen. The miR142-3p-regulated construct was further used as it mimics best conditions under which rAAV might not efficiently transduce DCs. Female mice previously immunized with a control rAAV2/1 vector gradually lost weight up to day 3

(Figure 6A), at which time point mice analyzed harbored up to 10^8 CFU of Lm-OVA in the spleen (Figure 6B), in line with the known kinetic of pathogenesis associated with Lm infection (36). In contrast, intradermal cross-priming induced by a single rAAV2/1-mOVA-HY-miR immunization was sufficient to achieve clear protection with lower weight loss (Figure 6A) and, most importantly, complete clearance of the bacterial load by day 3 in 90% of mice analyzed (Figure 6B). Moreover, infection appeared best controlled in rAAV2/1-mOVA-HY-miR immunized female mice (Figure 6A), with weight loss being curtailed as early as day 2. This observation is in line with the quantitatively and qualitatively enhanced effector/memory $CD8^+$ T cell responses observed in these individuals in the presence of $CD4^+$ T cell help (Figures 4 and 5).

Overall our results demonstrate that rAAV2/1 vector, when infused intradermally, have the potency to generate protective systemic effector/memory anti-transgene $CD8^+$ T cells, and this independently from direct transgene expression in dendritic cells.

Transgene-specific skin-resident memory $CD8^+$ T cells accumulate after intradermal rAAV2/1 immunization.

In parallel to the systemic memory $CD8^+$ T cell responses being generated, a key aspect to consider for future vaccine is the induction of an additional local line of defense, at the site of immunization, consisting of non-recirculating resident memory T cell (T_{rm}) (37). The induction of T_{rm} in the skin or other non-lymphoid tissues (NLT) has now been documented following several viral infection or viral vectors immunization (38-42) but such a potential has not been reported so far for rAAV vectors.

Based on our observations regarding the systemic memory $CD8^+$ T cell response induced following rAAV2/1-mOVA-HY immunization, we first analyzed the induction of skin T_{rm} in the presence of $CD4^+$ T cell help. 60 days post-immunization, a significant T cell population

could still be detected in both dermis and epidermis of intradermally, but not intramuscularly, rAAV2/1-mOVA-HY immunized female mice and a majority of infiltrating T cell appeared OVA specific (Figure 7A and data not shown). An average of 10^4 OVA₂₅₇⁺ CD8⁺ T cells could be recovered per injected ear, of which a majority resided in the epidermis ($57 \pm 3.6\%$) (Figure 7B). This represented a 200-fold increase in OVA₂₅₇⁺ CD8⁺ T cells number as compared to ears of mice injected intramuscularly or of control vector-injected ears. Interestingly, similar numbers of OVA₂₅₇⁺ CD8⁺ T cells could be recovered from rAAV2/1-mOVA-HY-miR injected ears (Figure 7B).

Epidermal resident OVA₂₅₇⁺ memory CD8⁺ T cell harbored a classical CD69⁺CD103⁺KLRG1⁻CD44^{hi}CD127^{lo/neg}CD62L⁻ resident memory T cell phenotype (Figure 7C-D). Dermal resident OVA₂₅₇⁺ memory CD8⁺ T cell also consisted of a majority of CD69⁺CD103⁺ OVA₂₅₇⁺ CD8⁺ T cells, albeit mixed with higher frequencies of CD69⁺CD103⁻ and circulating effector/memory CD69⁻CD103⁻ OVA₂₅₇⁺ CD8⁺ T cells (Figure 7D). In both cases, recovered OVA₂₅₇⁺ CD8⁺ T cells were polyfunctional effector T cells (Figure 7E), with similar if not enhanced profiles for IL-2, IFN γ and TNF α production as splenic (Figure 4C) or draining lymph node resident effector/memory OVA₂₅₇⁺ CD8⁺ T cells (Figure 7E). Similar phenotype could be observed on skin-resident OVA₂₅₇⁺ CD8⁺ T cells induced by the miR142-3p-regulated OVA construct, further confirming that direct presentation is fully dispensable for the induction of bona fide T_{rm} following rAAV immunization (Figure 7D-E and data not shown).

Finally, we wished to determine the impact of CD4⁺ T cell help on the induction of T_{rm} in the context of rAAV2/1 intradermal immunization. CD4⁺ T cell help has recently been shown to be important for the induction of T_{rm} (42, 43). In line with these observations, and our own observations in the spleen (Figure 4) and draining lymph nodes (Supplemental Figure 4), a 4-fold reduction in the number of recovered epidermal OVA₂₅₇⁺ CD8⁺ T cells could be observed

in immunized male mice (Figure 8A). Absence of CD4⁺ T cell help had a lower impact on the absolute number of dermal-residing OVA₂₅₇⁺ CD8⁺ T cells, albeit this mixed cell population harbored a significantly lower frequency of CD69 and CD103 co-expressers (Figure 8B-C), suggesting that CD4⁺ T cell help could partially regulate the acquisition of the T_{rm} phenotype, as previously shown for lung T_{rm} (43).

DISCUSSION

In this study, we made use of a unique model transgene to address three potential requirements for optimal rAAV-induced CD8⁺ T cell memory in a vaccine setting: CD4⁺ T cell help, direct expression of the transgene in antigen-presenting cell and optimal immunization route. Our results first exemplify a previously unappreciated synergy between CD4⁺ T cell help and skin targeting in regulating optimal differentiation of anti-transgene CTL memory, both local and systemic. Of outmost interest for rAAV vaccines, our results further clearly demonstrate that the requirement for direct DC transduction is highly dependent on the targeted tissue. While clearly important in the context of an intramuscular immunization, as previously observed by us (10) and others (15-18), it appears fully dispensable in the context of intradermal rAAV2/1 immunization.

Several studies have now been able to demonstrate the potential of rAAV vector as vaccines to induce long-lasting protecting antibody responses, alone or in combination with other vectors in prime-boost regimens (6). In sharp contrast, rAAV-induced memory CD8⁺ T cell responses described so far, in the context of intramuscular immunization, have been characterized by a lack of anti-transgene memory CD8⁺ T cell displaying a central and/or effector memory phenotype as well as capable of producing IL-2 (8), a result that we confirm in this study, both in the presence or absence of CD4⁺ T cell help. IL-2 is a key cytokine for secondary proliferation of memory CD8⁺ T cells (44), and the absence of potent IL-2 producers among rAAV-induced memory CTL has been correlated with reduced responses to a secondary boost (7, 8). A number of mechanisms have been considered to explain such results, including rAAV-intrinsic (poor DC transduction ability (15) and insufficient inflammatory responses leading to poor MHC-I upregulation on myocytes (17)) or transgene-intrinsic limitations (lack of potent MHC-II epitope in the construct (7, 8)). Part of these

limitations can be bypassed by using self complementary rAAV vectors (45) or specific AAV serotypes. The AAVrh32.33 serotype, in particular, drives capsid-specific CD4⁺ T cell responses (46) and demonstrated enhanced inflammatory and DC transduction potential (17). Such strategies, however, strongly limits either the size of the transgene that can be packaged or the number of available serotypes that can be used for future rAAV vaccines. We hypothesized instead that the above-mentioned limitations could result from an inadequacy between tissue being targeted, namely the skeletal muscle in previous studies (7, 8), and rAAV for the induction of protective cellular memory. The skeletal muscle notably presents limited numbers of APCs at the steady state (19-21) and poor MHC-class I expression by myocytes in the absence of strong inflammation has been suggested to favor chronic antigen expression and induction of T cell exhaustion following rAAV immunization (17).

A potentiating impact of changing the route of administration on the generation of anti-transgene CTL has been reported early on in the context of gene therapy (2), with subcutaneous rAAV2 immunizations leading to stronger CTL, but not B cell, responses. Of interest, enhanced frequencies of IL-2-producing anti-transgene CD8⁺ T cell responses have also been reported following intranasal immunization (47). In both cases, the precise phenotypes of memory CTL being generated, however, remains to be fully studied. Our results suggest that, at least for the AAV1 serotype, targeting the skin can significantly enhance the frequency of systemic anti-transgene CD62L⁻CD127^{high}KLRG1⁻ T_{cm} and CD62L⁺CD127^{high}KLRG1⁻ T_{cm} CD8⁺ T cells, correlating with enhanced anti-transgene IL-2⁺TNFα⁺IFNγ⁺ triple producers. Importantly, the frequency of anti-transgene CD8⁺ T_{cm} (0.39±0.07% of total CD8⁺ T cells) and triple producers (0.87±0.17%) seen at day 60 in the spleen of rAAV2/1-mOVA-HY i.d. immunized female mice exceeded the frequencies that we routinely obtain following footpad immunization with LPS-matured OVA257-pulsed bone-marrow DCs (unpublished observations).

As an added bonus, we additionally show here for the first time that rAAV vector can induce potent $CD103^+CD69^+KLRG1^-CD62L^-CD8^+$ T_{rm} in the skin, in number similar to previous reports in the skin following herpes simplex virus (HSV) or vaccinia virus (VACV) infection (39, 48) or in the vaginal mucosa following human papillomavirus vector (HPV) immunization (42, 49). T_{rm} represent a novel subset of memory T cells whose main characteristic is to reside in peripheral tissues (37). T_{rm} can be reactivated and divide in situ (42, 50) and provide a direct barrier to incoming pathogen (38, 39, 51, 52), of key interest for the design of future vaccine. While intramuscular rAAV2/1 immunization hardly generated any anti-transgene $CD8^+$ T_{rm} in the skin, long-term anti-transgene $CD8^+$ T cell infiltration could be seen in the injected tibialis anterior (unpublished observations). These cells, however, only presented a partial $CD103^-CD69^+$ T_{rm} phenotype, which could either reflect an intrinsic property of muscle- T_{rm} or an impaired $CD103$ upregulation due to chronic antigen-expression (53, 54). Nonetheless, this should prompt further assessment of the potency of the different pseudotyped rAAV vectors to induce $CD8^+$ T_{rm} in their preferred target tissues.

While $CD4^+$ T cell help was required in both the generation of systemic and local bona fide memory CTL, $CD4^+$ T cell help alone - in the context of an intramuscular immunization - only promoted the enhanced induction and long-term survival of terminally differentiated $CD62L^-CD127^{int}KLRG1^+$ long-lived effector $CD8^+$ T cells. This appears in line with results obtained by Obar and colleagues in the context of immune responses to several pathogens (31). The exact nature of the mechanism(s) driving enhanced memory $CD8^+$ T cell differentiation following intradermal immunization, however, remains to be investigated. Differences in DC subsets (55) or environmental cues (56-58) are among the numerous mechanisms already proposed for the regulation of effector/memory $CD8^+$ T cells fate. One can hypothesize that the skin, which naturally harbors a very large and diverse DC population

(22) in direct contact with the commensal flora (59), might be less dependent on vector-intrinsic inflammatory properties for the recruitment and activation of memory CD8⁺ T cell.

Such hypothesis is further supported by our own results, and those by Shen et al in the context of vaccinia virus (26), regarding the requirements for direct presentation following intradermal and intramuscular immunization. Using here a previously described, miR142-3p-based, strategy to inhibit transgene expression in all DC subsets (10, 30), we demonstrate that skin-expressed transgene are more efficiently cross-presented than muscle-expressed transgene, and that this nicely correlates with the fact that intradermally-induced T cell responses do not rely on direct presentation following rAAV2/1 immunization. Such results suggest that CTL responses induced by skin targeting of any given rAAV serotype would solely depends on the ability of this given serotype to efficiently drive transgene expression in skin cells, other than DCs.

While classical rAAV serotypes have been described for their potency to target various tissues, very limited studies have addressed their ability to efficiently transduce keratinocytes. Interestingly, the receptor for AAV binding, heparan sulfate proteoglycan (60), is highly expressed by keratinocytes (61). In line with this observation, human keratinocytes transduction by rAAV2 has been described in vitro (62, 63). rAAV2/1, 3 and 6, but not rAAV2/8 and 9, appeared to bear similar potential (64). In vivo transduction of keratinocytes in the epidermis and hair follicles has also been reported for rAAV2 in swine (65) and for rAAV2, 5 and 8 in mice (66), with rAAV2/5 providing the best level of transduction. In vivo studies also reported transgene expression in yet uncharacterized cells in the dermis as well as in the underlying layer of smooth muscle – the panniculus carnosus – naturally found beneath the mouse skin (66). Such targeting of muscle cells was dependent on the serotype (66) and represented the majority of transgene expression in the context of subcutaneous rAAV2 immunizations (67). In our study, we were thus particularly careful to perform all our

intra-dermal immunization in the ear, which, like most of the human skin, is naturally devoid of panniculus carnosus. It would nevertheless be interesting to explore whether similar results can be obtained using other injection techniques designed to better target the various layers of the skin, such as micro-needles (68), patches and skin surface stripping (23) or transcutaneous vaccination via laser microporation (69).

Overall, our study highlights the skin as a promising target site for future rAAV vaccines. Adding to the dose-sparing potential of intra-dermal immunization (70), we believe that these results will prompt for a more global assessment of the potential of individual rAAV serotype to induce strong adaptive immune responses and protective memory following intra-dermal immunization.

METHODS

Mice.

Six- to 8-week old C57BL/6JRj mice were purchased from JANVIER LABS (Le Genest Saint Isle, France), housed under specific pathogen-free conditions in our animal facility and handled in accordance with French and European directives. For intramuscular or intradermal injection, mice were anesthetized and 25µl of indicated rAAV vector diluted in 1X phosphate-buffered saline (1X PBS) was injected into the tibialis anterior or the ear dermis, respectively, using a 30G RN Hamilton syringe. For OT-I cell transfer experiments, recipient CD45.1 C57BL/6 Foxp3^{EGFP} (B6.Cg-Foxp3^{tm1Mal}/J) mice (71) and donor Rag1^{-/-} OT-I (CD45.2) mice carrying a TCR specific for OVA₂₅₇ bound to H2-K^b were bred in our animal facility.

Plasmid construction and recombinant AAV vector production.

mOVA-HY-expressing constructs and recombinant AAV2/1-pseudotyped vectors were prepared as previously described (10). Briefly, the mOVA cDNA (72) was fused to DBY₆₀₈ and UTY₂₄₆ epitopes encoding sequences encompassed respectively by 5 Nter and 15 Cter amino acids, and 4 Nter and 4 Cter amino acids of their original protein sequence to ensure normal processing. This construct was further inserted in a pSMD2 AAV2 plasmid between the hPGK promoter and a polyA signal to create the pSMD2-mOVA-HY construct. For the pSMD2-mOVA-HY-miR construct, 4 repeats of the miR-142-3p target sequence (30) were additionally inserted in the 3' untranslated region of the pSMD2-mOVA-HY plasmid. The control vectors used throughout this study were AAV2/1-pseudotyped vector coding for the

Cre recombinase with (Figures 6 and 7) or without (All other figures) 4 repeats of the miR-142-3p target sequence.

Cell isolation and analysis of cytokine production by T cells.

Lymphoid-organ-cell suspensions were prepared from immunized recipients by mechanically dissociating spleen; pooled popliteal and inguinal (muscle-draining) or superficial cervical (parotid and mandibular; ear-draining) LNs in sterile 1X PBS containing 0.1% HSA. 2×10^6 cells per organ were then directly stained or re-stimulated for 5h *in vitro* in 2mL complete RPMI medium containing 2 μ g/mL Brefeldin A (Sigma-Aldrich) and 1 μ g/mL OVA₂₅₇ peptide (SIINFEKL)(ProteoGenix).

Skin-cell suspensions were prepared by separating the ventral and dorsal sheets of immunized ears and incubating them dermal side down in 0.5% Trypsin/EDTA (Gibco) for 45min at 37°C. The epidermis layer was then separated from the dermis layer and both were cut into small piece and further incubated for 2h30 at 37°C in complete RPMI containing 2.5mg/mL Collagenase D (Roche) and 10 μ g/ml DNase-I (Sigma-Aldrich). The resulting cell suspensions were then filtered on a 40 μ m cell strainer (BD Biosciences) prior to staining.

OT-1 cell suspensions were prepared by mechanically dispersing pooled spleen, inguinal, axillary, cervical and mesenteric lymph nodes of donor Rag1^{-/-} OT-I mice in sterile 1X PBS containing 0.1% HSA. Cell suspensions were further stained in 1X PBS containing 2 μ g/mL Violet Proliferation Dye 450 (VPD) (BD Biosciences) for 8min at 37°C followed by two washes in 1X PBS containing 2% HSA and 0.1% HSA respectively. 2×10^6 VPD-labeled cells were then injected into the retro-orbital venous sinus of previously immunized mice in a final volume of 200 μ l of 1X PBS.

Flow cytometry analysis.

For PBL staining, erythrocytes were first eliminated by hypotonic shock with BD Pharm Lyse™ buffer (BD Biosciences). PE H2-K^b/OVA₂₅₇ (SIINFEKL) tetramer (Clinisciences) staining was then performed in 1X PBS containing 0.1% HSA for 40min at room temperature. Cell suspensions were further blocked with anti-CD16/CD32 antibody (2.4G2, BioXcell) for 10min at 4°C, followed by membrane staining for 15min at 4°C using a combination of BV605 or eFluor450 anti-CD8 α (53-6.7), FITC anti-CD44 (IM7), PE-Cy7 anti-CD62L (MEL-14) and anti-CD69 (H1-2F3), PerCP-Cy5.5 anti-CD127 (A7R34), APC anti-KLRG1 (2F1/KLRG1) and anti-CD103 (2E7), APC or biotinylated anti-TCR β (H57-597) and Alexa Fluor® 770 anti-I-A/I-E (M5/114.15.2). When necessary, a secondary staining step was performed for 15min at 4°C with Qdot® 605-coupled streptavidin (Life Technologies). Dead cell were excluded using the LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (Life Technologies). For OT-I cell transfer experiments, transferred cell were tracked using a combination of PE-Cy7 anti- CD8 α (53-6.7), PerCP-Cy5.5 anti-CD45.1 (A20), PE anti-CD69 (H1.2F3) and APC anti-CD25 (PC61). For intracellular staining of cytokines, cells were further fixed using BD Bioscience Cytofix/Cytoperm™ buffer (BD Biosciences) according to manufacturer's instructions and subsequent staining was performed in eBioscience Permeabilization buffer (eBioscience) for 30 min at 4°C using a combination of PE anti-IL-2 (JES6-5H4), PE-Cy7 anti-TNF α (MP6-XT22) and APC anti-IFN γ (XMG1.2). Data were collected on a FACSCanto II or LSR-II Fortessa flow cytometer and further analyzed using FlowJo software (Treestar). All antibodies were purchased from BioLegend unless stated otherwise.

Lm-OVA challenges.

Mice were challenged i.p. with 10^6 CFU of a recombinant strain of *Listeria monocytogenes* expressing OVA and an erythromycin-resistance marker (73). 3 days after the challenge, spleen were homogenized and lysed in 0.9% NaCl and bacterial titers were assessed by plating dilutions on brain-heart infusion agar supplemented with 5 μ g/ml erythromycin, and grown for 2-3 days at 37°C. The lowest dilution used was a 1/16 dilution of the original solution, given us a limit of detection <100 CFU/spleen.

Statistics.

All data are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM). All statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software version 6 (GraphPad, San Diego, California, USA). When indicated, non-parametric Wilcoxon tests (2 groups); Kruskal-Wallis/Dunn's test or repeated measured (RM)-one way ANOVA (3 or more groups) or two-way ANOVA followed by Sidak's post-test analysis (2 variables such as CD4⁺ T cell help and route of immunization) were performed for selected pairwise comparisons. The minimal level of confidence at which the result was considered significant was P<0.05. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 and **** P<0.0001.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

A.G. and P.C. designed and conducted all experiments and analyzed all ensuing data, with help from F.T. and A.C. regarding the Lm-OVA experiments. P.C. wrote the manuscript. J.D. and D.A.G. provided funding, helped design the experiments and write the manuscript. S.L. provided essential reagents and expertise regarding rAAV production.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Loredana Saveanu (CRI, Université Paris 7, Paris, France) for helpful discussions, Nicolas Cuburu (NCI/NIAID, Bethesda, MD, USA) for helpful comments on the manuscript, Vincenzo Di Bartolo and Matthew Albert (Institut Pasteur, Paris, France) for the kind gift of Lm-OVA. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM) and Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-JSV3). A.G. and P.C. were respectively supported by the French Ministry of Research and the AFM.

REFERENCES

1. Manning WC et al. Genetic immunization with adeno-associated virus vectors expressing herpes simplex virus type 2 glycoproteins B and D. *Journal of Virology* 1997;71(10):7960–7962.
2. Brockstedt DG et al. Induction of immunity to antigens expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration. *Clin Immunol* 1999;92(1):67–75.
3. Sarukhan A et al. Successful interference with cellular immune responses to immunogenic proteins encoded by recombinant viral vectors. *Journal of Virology* 2001;75(1):269–277.
4. Mingozi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther* 2011;11(4):321–330.
5. Vardas E et al. A phase 2 study to evaluate the safety and immunogenicity of a recombinant HIV type 1 vaccine based on adeno-associated virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2010;26(8):933–942.
6. Nieto K, Salvetti A. AAV Vectors Vaccines Against Infectious Diseases. *Front Immunol* 2014;5:5.
7. Lin S-W, Hensley SE, Tatsis N, Lasaro MO, Ertl HCJ. Recombinant adeno-associated virus vectors induce functionally impaired transgene product-specific CD8⁺ T cells in mice. *J Clin Invest* 2007;117(12):3958–3970.
8. Lin J, Zhi Y, Mays L, Wilson JM. Vaccines based on novel adeno-associated virus vectors elicit aberrant CD8⁺ T-cell responses in mice. *Journal of Virology* 2007;81(21):11840–11849.

9. Sarukhan A, Soudais C, Danos O, Jooss K. Factors influencing cross-presentation of non-self antigens expressed from recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Gene Med.* 2001;3(3):260–270.
10. Carpentier M et al. Intrinsic transgene immunogenicity gears CD8(+) T-cell priming after rAAV-mediated muscle gene transfer. *Molecular Therapy* [published online ahead of print: December 10, 2014]; doi:10.1038/mt.2014.235
11. Ge Y, Powell S, Van Roey M, McArthur JG. Factors influencing the development of an anti-factor IX (FIX) immune response following administration of adeno-associated virus-FIX. *Blood* 2001;97(12):3733–3737.
12. Yuasa K et al. Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product. *Gene Ther.* 2002;9(23):1576–1588.
13. Ferrand M, Galy A, Boisgerault F. A dystrophic muscle broadens the contribution and activation of immune cells reacting to rAAV gene transfer. *Gene Ther.* 2014;21(9):828–839.
14. Mays LE, Wilson JM. The complex and evolving story of T cell activation to AAV vector-encoded transgene products. *Mol. Ther.* 2011;19(1):16–27.
15. Jooss K, Yang Y, Fisher KJ, Wilson JM. Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *Journal of Virology* 1998;72(5):4212–4223.
16. Xin K-Q et al. Induction of robust immune responses against human immunodeficiency virus is supported by the inherent tropism of adeno-associated virus type 5 for dendritic cells. *Journal of Virology* 2006;80(24):11899–11910.

17. Mays LE et al. AAV8 Induces Tolerance in Murine Muscle as a Result of Poor APC Transduction, T Cell Exhaustion, and Minimal MHC I Upregulation on Target Cells. [Internet]. *Mol. Ther.* 2013;22(1):28–41.
18. Lu Y, Song S. Distinct immune responses to transgene products from rAAV1 and rAAV8 vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(40):17158–17162.
19. Hartigan-O'Connor D, Kirk CJ, Crawford R, Mulé JJ, Chamberlain JS. Immune evasion by muscle-specific gene expression in dystrophic muscle. *Mol. Ther.* 2001;4(6):525–533.
20. Calabro S et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 2011;29(9):1812–1823.
21. Langlet C et al. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *The Journal of Immunology* 2012;188(4):1751–1760.
22. Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat Rev Immunol* [published online ahead of print: 2014]; doi:10.1038/nri3683
23. Combadière B, Liard C. Transcutaneous and intradermal vaccination. *Hum Vaccin* 2011;7(8):811–827.
24. Bedoui S et al. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells [Internet]. *Nature immunology* 2009;10(5):488–495.
25. Henri S et al. CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med* 2010;207(1):189–206–S1–6.

26. Shen X, Wong SBJ, Buck CB, Zhang J, Siliciano RF. Direct priming and cross-priming contribute differentially to the induction of CD8⁺ CTL following exposure to vaccinia virus via different routes. *J. Immunol.* 2002;169(8):4222–4229.
27. Ploquin A et al. Protection against henipavirus infection by use of recombinant adeno-associated virus-vector vaccines. *J INFECT DIS* 2013;207(3):469–478.
28. Xiao W et al. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *Journal of Virology* 1999;73(5):3994–4003.
29. Louboutin J-P, Wang L, Wilson JM. Gene transfer into skeletal muscle using novel AAV serotypes. *J. Gene Med.* 2005;7(4):442–451.
30. Brown BD, Venneri MA, Zingale A, Sergi L, Naldini L. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med* 2006;12(5):585–591.
31. Obar JJ et al. CD4⁺ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8⁺ T cells in primary and secondary responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(1):193–198.
32. Kaech SM et al. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature immunology* 2003;4(12):1191–1198.
33. Sun Y, Santra S, Schmitz JE, Roederer M, Letvin NL. Magnitude and quality of vaccine-elicited T-cell responses in the control of immunodeficiency virus replication in rhesus monkeys. *Journal of Virology* 2008;82(17):8812–8819.
34. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2008;8(4):247–258.

35. Pamer EG. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol* 2004;4(10):812–823.
36. Berche P. Bacteremia is required for invasion of the murine central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Microb. Pathog.* 1995;18(5):323–336.
37. Schenkel JM, Masopust D. Tissue-Resident Memory T Cells. *Immunity* 2014;41(6):886–897.
38. Gebhardt T et al. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nature immunology* 2009;10(5):524–530.
39. Jiang X et al. Skin infection generates non-migratory memory CD8⁺ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* 2012;483(7388):227–231.
40. Wakim LM, Woodward-Davis A, Bevan MJ. Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(42):17872–17879.
41. Masopust D et al. Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J Exp Med* 2010;207(3):553–564.
42. Cuburu N et al. Intravaginal immunization with HPV vectors induces tissue-resident CD8⁺ T cell responses. *J Clin Invest* 2012;122(12):4606–4620.
43. Laidlaw BJ et al. CD4(+) T Cell Help Guides Formation of CD103(+) Lung-Resident Memory CD8(+) T Cells during Influenza Viral Infection. *Immunity* [published online ahead of print: October 8, 2014]; doi:10.1016/j.immuni.2014.09.007
44. Feau S, Arens R, Togher S, Schoenberger SP. Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells. *Nature immunology* 2011;12(9):908–913.

45. Wu T et al. Self-complementary AAVs Induce More Potent Transgene Product-specific Immune Responses Compared to a Single-stranded Genome. *Molecular Therapy* 2009;20(3):572–579.
46. Mays LE et al. Adeno-associated virus capsid structure drives CD4-dependent CD8⁺ T cell response to vector encoded proteins. *The Journal of Immunology* 2009;182(10):6051–6060.
47. Du L et al. Intranasal vaccination of recombinant adeno-associated virus encoding receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) spike protein induces strong mucosal immune responses and provides long-term protection against SARS-CoV infection. *J. Immunol.* 2008;180(2):948–956.
48. Mackay LK et al. The developmental pathway for CD103(+)CD8⁺ tissue-resident memory T cells of skin. *Nature immunology* 2013;14(12):1294–1301.
49. Cuburu N et al. Topical Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2) Vaccination with Human Papillomavirus Vectors Expressing gB/gD Ectodomains Induces Genital-Tissue-Resident Memory CD8⁺ T Cells and Reduces Genital Disease and Viral Shedding after HSV-2 Challenge. *Journal of Virology* 2014;89(1):83–96.
50. Wakim LM, Waithman J, Van Rooijen N, Heath WR, Carbone FR. Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science* 2008;319(5860):198–202.
51. Schenkel JM et al. T cell memory. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. [Internet]. *Science* 2014;346(6205):98–101.
52. Ariotti S et al. T cell memory. Skin-resident memory CD8⁺ T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science* 2014;346(6205):101–105.

53. Mackay LK et al. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(18):7037–7042.
54. Casey KA et al. Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues. *The Journal of Immunology* 2012;188(10):4866–4875.
55. Kim TS, Gorski SA, Hahn S, Murphy KM, Braciale TJ. Distinct Dendritic Cell Subsets Dictate the Fate Decision between Effector and Memory CD8(+) T Cell Differentiation by a CD24-Dependent Mechanism. *Immunity* 2014;40(3):400–413.
56. Joshi NS et al. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 2007;27(2):281–295.
57. Obar JJ et al. Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8+ T cell differentiation. *The Journal of Immunology* 2011;187(10):4967–4978.
58. Plumlee CR, Sheridan BS, Cicek BB, Lefrançois L. Environmental cues dictate the fate of individual CD8(+) T cells responding to infection. *Immunity* 2013;39(2):347–356.
59. Naik S et al. Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature* [published online ahead of print: January 5, 2015]; doi:10.1038/nature14052
60. Summerford C, Samulski RJ. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *Journal of Virology* 1998;72(2):1438–1445.
61. Jalkanen M, Rapraeger A, Bernfield M. Mouse mammary epithelial cells produce basement membrane and cell surface heparan sulfate proteoglycans containing distinct core proteins. *J Cell Biol* 1988;106(3):953–962.

62. Braun-Falco M, Doenecke A, Smola H, Hallek M. Efficient gene transfer into human keratinocytes with recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* 1999;6(3):432–441.
63. Roedl D, Oji V, Buters JTM, Behrendt H, Braun-Falco M. rAAV2-mediated restoration of LEKTI in LEKTI-deficient cells from Netherton patients. *Journal of Dermatological Science* 2011;61(3):194–198.
64. Melo SP et al. Somatic correction of junctional epidermolysis bullosa by a highly recombinogenic AAV variant. *Molecular Therapy* 2014;22(4):725–733.
65. Hengge UR, Mirmohammadsadegh A. Adeno-associated virus expresses transgenes in hair follicles and epidermis. *Mol. Ther.* 2000;2(3):188–194.
66. Keswani SG et al. Pseudotyped adeno-associated viral vector tropism and transduction efficiencies in murine wound healing. *Wound Repair Regen* 2012;;n/a–n/a.
67. Donahue BA et al. Selective uptake and sustained expression of AAV vectors following subcutaneous delivery. *J. Gene Med.* 1999;1(1):31–42.
68. Kim Y-C, Park J-H, Prausnitz MR. Microneedles for drug and vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012;64(14):1547–1568.
69. Weiss R et al. Transcutaneous vaccination via laser microporation. *J Control Release* 2012;162(2):391–399.
70. Kenney RT, Frech SA, Muenz LR, Villar CP, Glenn GM. Dose sparing with intradermal injection of influenza vaccine. *N Engl J Med* 2004;351(22):2295–2301.
71. Carpentier M et al. Extrathymic induction of Foxp3(+) regulatory T cells declines with age in a T-cell intrinsic manner. *Eur. J. Immunol.* 2013;43(10):2598–2604.

72. Calbo S et al. Functional tolerance of CD8⁺ T cells induced by muscle-specific antigen expression. *J. Immunol.* 2008;181(1):408–417.
73. Pope C et al. Organ-specific regulation of the CD8 T cell response to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 2001;166(5):3402–3409.
74. Roederer M, Nozzi JL, Nason MC. SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry A* 2011;79(2):167–174.

FIGURES AND FIGURE LEGENDS

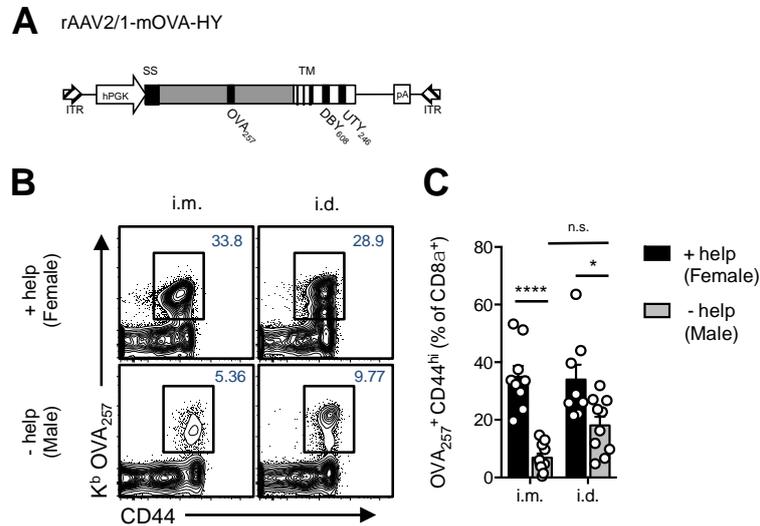


Figure 1: Intradermal immunization with rAAV2/1 vector induces robust primary CD8⁺ T cell responses:

(A-C) Female or male mice were immunized in the tibialis anterior (i.m.) or ear dermis (i.d.) with 3×10^{10} vg of rAAV2/1-mOVA-HY (mOVA-HY). (A) Representation of the mOVA-HY construct. SS, signal sequence; TM, transmembrane domain. (B) Representative dot-plots and (C) frequencies of CD44^{hi} K^b/OVA₂₅₇ Tetramer⁺ (OVA₂₅₇⁺) in CD8⁺ T cells at day 14 in the blood of immunized individuals. Mean \pm SEM (n=8-11 mice per group, pooled from at least 3 independent experiments). * P<0.05 and **** P<0.0001 (2-way ANOVA/Sidak's test).

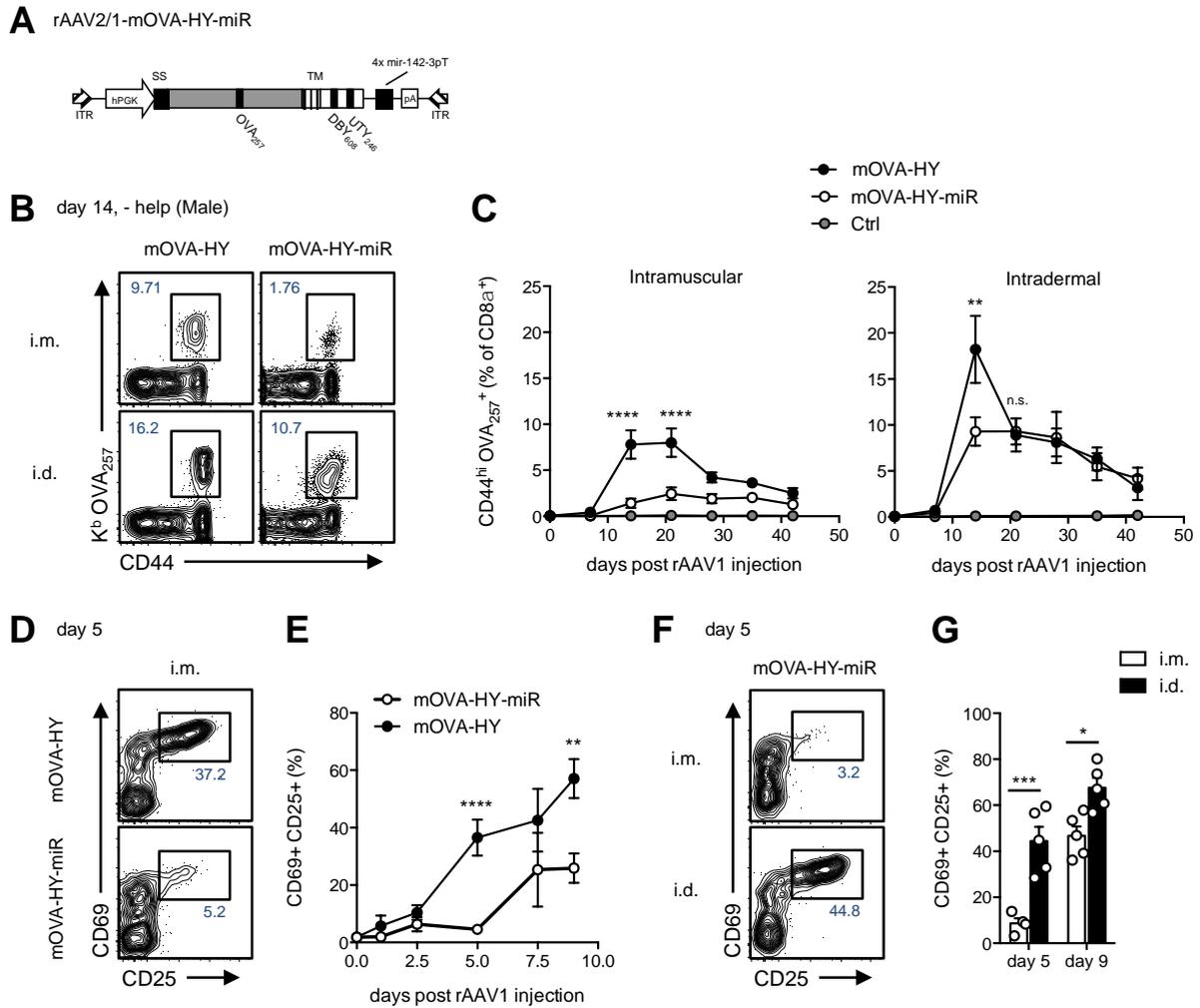


Figure 2: Potent intradermal-induced CD8⁺ T cell responses are generated in the absence of direct presentation of the transgene:

To analyze the requirements for direct presentation in rAAV-induced CD8⁺ T cell responses, male mice were immunized in the tibialis anterior (i.m.) or ear dermis (i.d.) with 3×10^{10} vg of rAAV2/1-mOVA-HY (mOVA-HY); rAAV2/1-mOVA-HY-miR142-3pT (mOVA-HY-miR) or a control rAAV2/1 vector (Ctrl).

(A) Representation of the mOVA-HY-miR construct. SS, signal sequence; TM, transmembrane domain; miR-142-3pT, miR-142-3p target sequence. (B) Representative dot-plots at day 14 and (C) frequencies of OVA-specific CD44^{hi}OVA₂₅₇⁺CD8⁺ T cells at indicated

time points in the blood of immunized individuals. Mean±SEM (n=4-11 mice per group and per time point, pooled from at least 2 independent experiments). ** P<0.01 and **** P<0.0001 (2-way ANOVA/Sidak's test, P<0.0001 and P=0.46 respectively for the overall impact of the miR142-3p-mediated regulation on the rAAV-induced CD8⁺ T cell response following i.m. or i.d. immunization).

(D-G) Male mice were immunized in the tibialis anterior (i.m.) with 10¹⁰ vg of rAAV2/1-mOVA-HY or rAAV2/1-mOVA-HY-miR142-3pT (D-E) or in the ear dermis (i.d.) with 10¹⁰ vg of rAAV2/1-mOVA-HY-miR142-3pT (F-G). At indicated time points after rAAV2/1 immunization, mice were infused with 2x10⁶ VPD-labeled OVA-specific TCR transgenic OT-1 T cells. (D and F) Representative dot-plots for CD69 and CD25 expression and (E and G) frequencies of CD25⁺CD69⁺ in live VPD⁺OT-1 T cells recovered from muscle or ear draining lymph nodes 18h after transfer. Mean±SEM ((D-E) n=3-6 mice per group and per time point, pooled from at least 2 independent experiments, except for day 7.5 and 9, n=3 mice per group from 1 experiment only; (F-G) n=5 mice per group and per time point, pooled from 2 independent experiments). * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 and **** P<0.0001 (2-way ANOVA/Sidak's test).

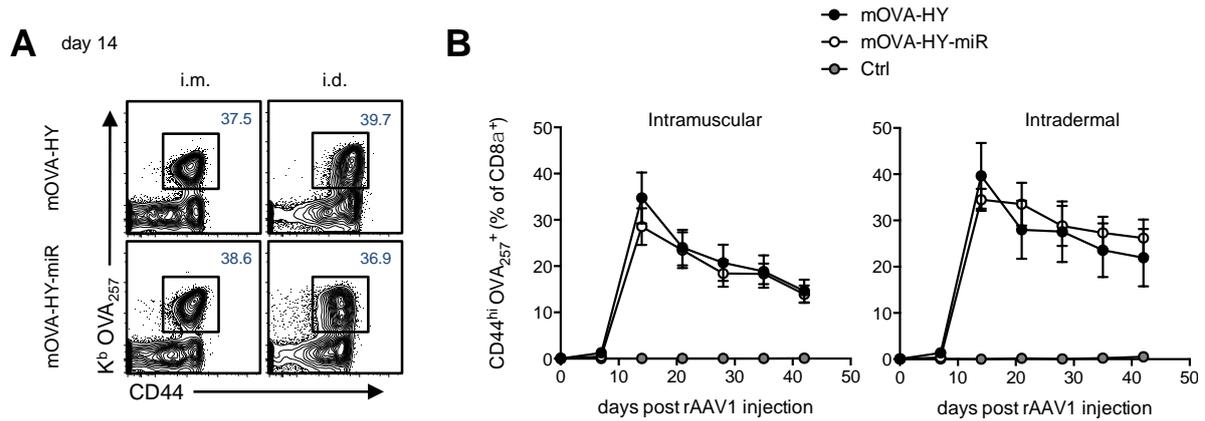


Figure 3: Availability of CD4⁺ T cell help potentiates CD8⁺ T cell responses generated in the absence of direct presentation of the transgene:

(A-B) Female mice were immunized in the tibialis anterior (i.m.) or ear dermis (i.d.) with 3×10^{10} vg of rAAV2/1-mOVA-HY (mOVA-HY); rAAV2/1-mOVA-HY-miR142-3pT (mOVA-HY-miR) or a control rAAV2/1 vector (Ctrl). (A) Representative dot-plots at day 14 and (B) frequencies of OVA-specific CD44^{hi} OVA₂₅₇⁺ CD8⁺ T cells at indicated time points in the blood of immunized individuals. Mean \pm SEM (n=4-11 mice per group and per time point, pooled from at least 2 independent experiments).

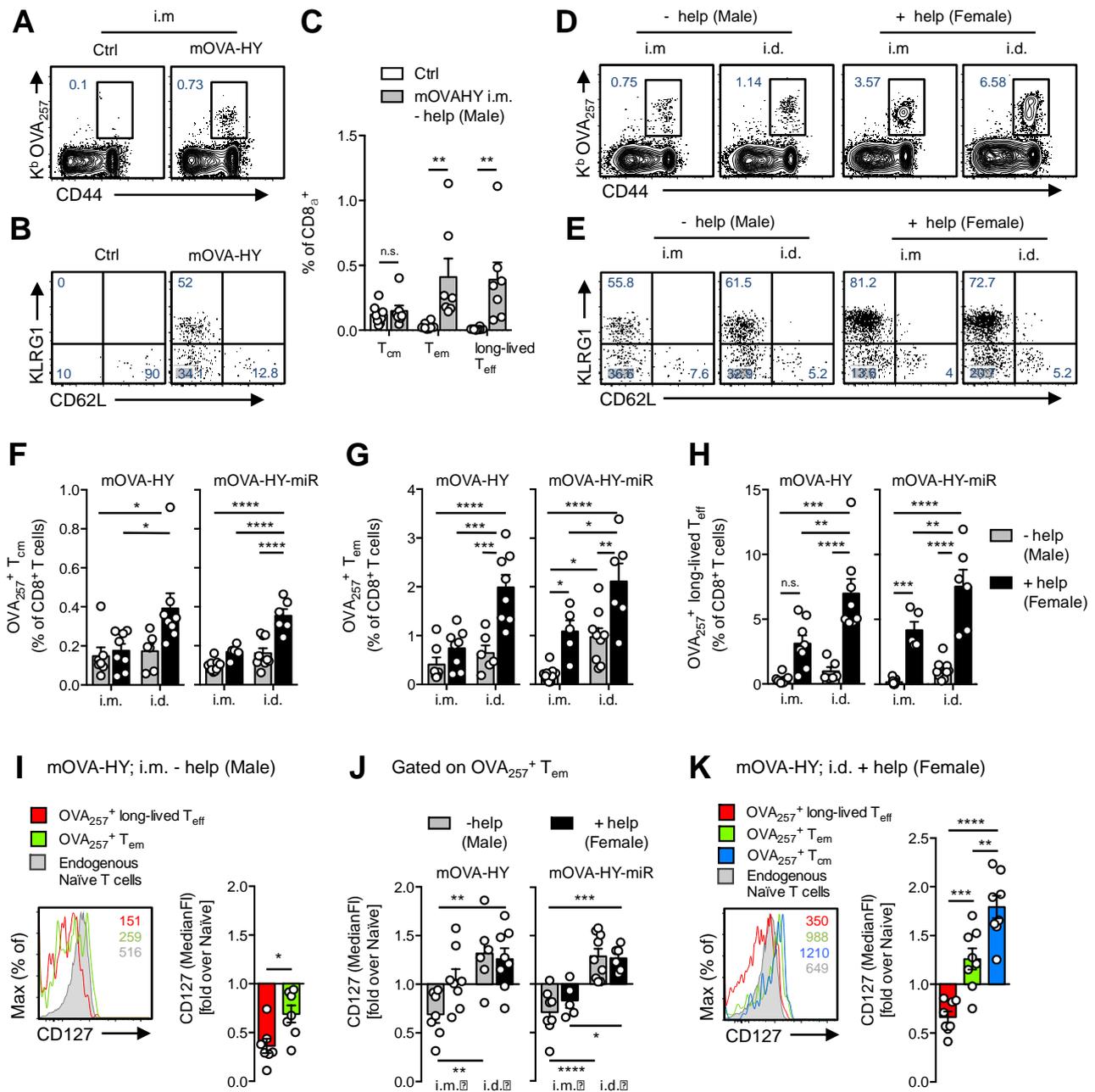


Figure 4: CD4⁺ T cell help and route of immunization synergize in regulating the generation of anti-transgene effector/memory CD8⁺ T cells:

Anti-OVA memory CD8⁺ T cell responses were analyzed between day 60 and day 80-post immunization in the spleen of male or female mice immunized in the tibialis anterior (i.m.) or ear dermis (i.d.) with 3×10^{10} vg of rAAV2/1-mOVA-HY (mOVA-HY), rAAV2/1-mOVA-HY-miR142-3pT (mOVA-HY-miR) or a control rAAV2/1 vector (Ctrl).

(A and D) Representative dot-plots for CD44 and K^b/OVA₂₅₇ tetramer staining in live splenic CD8⁺ T cells; (B and E) representative dot-plots for CD62L and KLRG1 staining in live splenic CD44^{hi}OVA₂₅₇⁺CD8⁺ T cells and (C and F-H) frequencies of CD44^{hi}OVA₂₅₇⁺CD62L⁺KLRG1⁻ (OVA₂₅₇⁺ T_{em}), CD62L⁻KLRG1⁻ (OVA₂₅₇⁺ T_{em}) or CD62L⁻KLRG1⁺ (OVA₂₅₇⁺ long-lived T_{eff}) in total live splenic CD8⁺ T cells from indicated individuals.

(I) Representative histograms for IL-7R α (CD127) expression and absolute Median fluorescence intensity (MedianFI) values (left) and graph for relative IL-7R α expression (right) in live splenic OVA₂₅₇⁺ long-lived T_{eff} (red), OVA₂₅₇⁺ T_{em} (green) and endogenous naïve CD8⁺ T cells (grey) from rAAV2/1-mOVA-HY i.m. immunized male. (J) Relative IL-7R α expression in live splenic OVA₂₅₇⁺ T_{em} from indicated individuals. (K) Same as I, in OVA₂₅₇⁺CD8⁺ T cells subsets from rAAV2/1-mOVA-HY i.d. immunized female. (I-K) relative IL-7R α expression is represented as the ratio of indicated cell population MedianFI over the MedianFI of the endogenous naïve CD8⁺ T cell population of the same individual to account for potential inter-experiments variations in the CD127 staining. Only mice with significant levels of each OVA₂₅₇⁺ T memory subset of interest (above mean+3SD of control vector) were included in the analysis.

(A-K) Mean \pm SEM (n=5-11 mice per group, pooled from at least 3 independent experiments). n.s. non significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 and **** P<0.0001 (2-way ANOVA/Sidak's test, except (I) Wilcoxon test and (K) RM one-way ANOVA/Sidak's test).

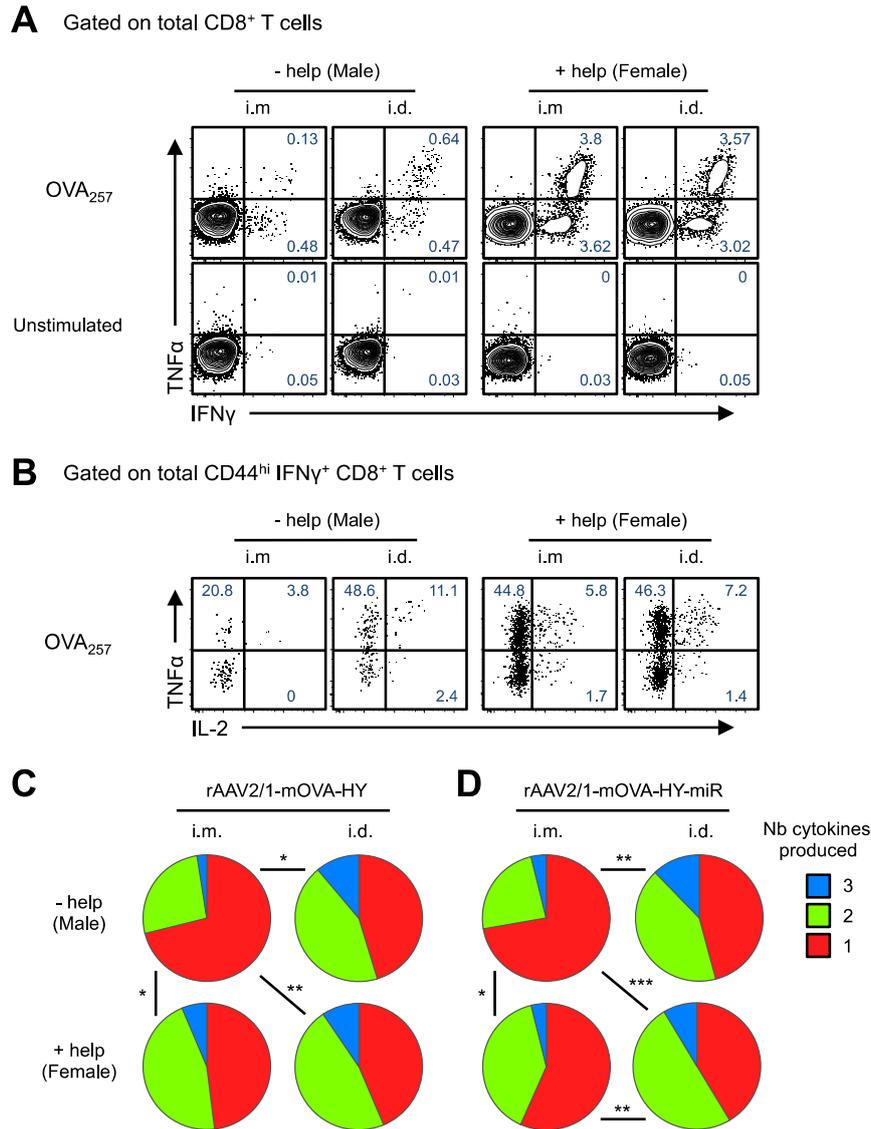


Figure 5: CD4⁺ T cell help and route of immunization synergize in regulating the quality of anti-transgene effector/memory CD8⁺ T cells:

The cytokine production potential of anti-OVA memory CD8⁺ T cell responses was analyzed between day 60 and day 80 post immunization in the spleen of male or female mice immunized in the tibialis anterior (i.m.) or ear dermis (i.d.) with 3×10^{10} vg of rAAV2/1-mOVA-HY (mOVA-HY) (A-C) or rAAV2/1-mOVA-HY-miR142-3pT (mOVA-HY-miR) (D). The production of IFN γ , TNF α and IL-2 was measured after OVA₂₅₇ peptide (1 μ g/mL) in vitro re-stimulation of splenic cell suspensions.

(A) Representative dot-plots for IFN γ and TNF α expression in OVA₂₅₇-stimulated (top) or unstimulated (bottom) live splenic CD8⁺ T cells. (B) Representative dot-plots for IL-2 and TNF α expression in OVA₂₅₇-stimulated live splenic CD44^{hi}IFN γ ⁺CD8⁺ T cells.

(C-D) Relative proportion of single- (red), double- (green) and triple- (blue) cytokine-producing OVA₂₅₇ stimulated live splenic CD8⁺ T cells. Only mice with significant levels of OVA₂₅₇⁺ memory T in the spleen (above mean+3SD of control vector) were included in this analysis (n=5-8 mice per group, pooled from at least 3 independent experiments). Analysis and presentation of distributions was performed using SPICE version 5.1 on background (unstimulated) corrected data. Comparison of distributions was performed using a Student's T test and a partial permutation test as described (74). * P<0.05, ** P<0.01 and *** P<0.001.

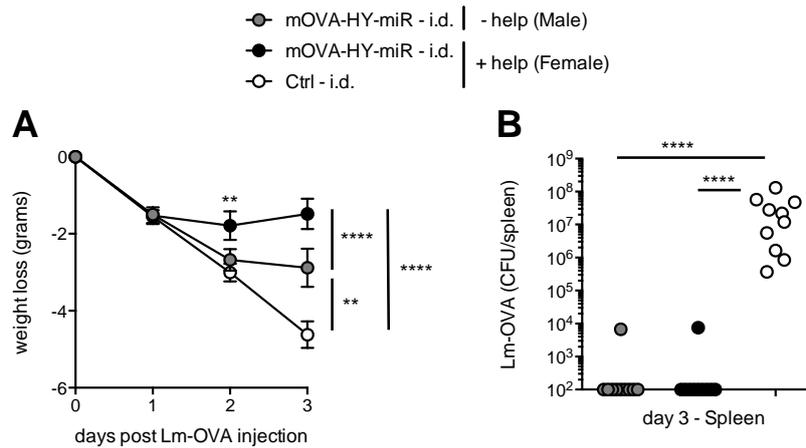


Figure 6: Cross-presentation of skin-expressed transgene induces protective memory responses:

The protective potential of anti-OVA memory CD8⁺ T cell responses induced by the sole cross-presentation of tissue-expressed rAAV transgene was analyzed at day 60 after primary immunization by challenging i.p. with 10⁶ CFU of OVA-expressing recombinant *Listeria monocytogenes* (Lm-OVA) male or female mice previously immunized in the tibialis anterior (i.m.) or ear dermis (i.d.) with 3x10¹⁰ vg of rAAV2/1-mOVA-HY-miR142-3pT (mOVA-HY-miR) vector. (A) Weight loss over time and (B) Recombinant Lm-OVA titer at day 3 after challenge expressed as CFU/spleen for individual mice. n=10 mice per group, pooled from 2 independent experiments. ** P<0.01 and **** P<0.0001 ((A) two-way ANOVA/Sidak's test, (B) Kruskal-Wallis/Dunn's test).

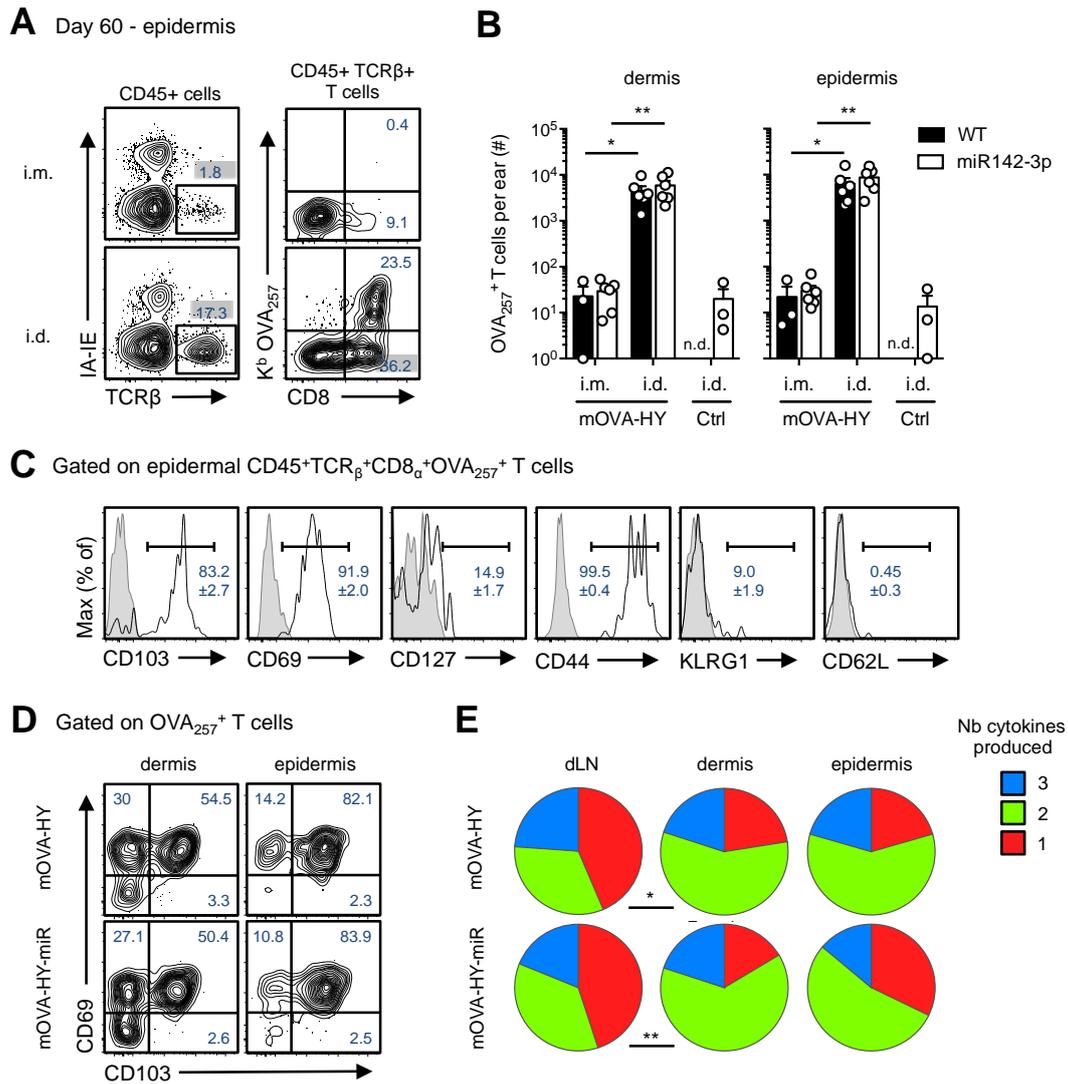


Figure 7: Transgene-specific skin-resident memory CD8⁺ T cells accumulate after intradermal rAAV2/1 immunization:

Skin resident anti-OVA memory CD8⁺ T cells were analyzed between day 60 and day 70 post immunization in the ears of female mice immunized in the tibialis anterior (i.m.) or ear dermis (i.d.) with 3×10^{10} vg of rAAV2/1-mOVA-HY (mOVA-HY), rAAV2/1-mOVA-HY-miR142-3pT (mOVA-HY-miR) or a control rAAV2/1 vector (Ctrl).

(A) Representative dot-plots for MHC-II (IA-IE) and TCR β staining in live epidermal CD45⁺ cells (left) and CD8 α and K^b/OVA₂₅₇ tetramer staining in live epidermal IA-IE⁻ TCR β ⁺ T cells (right) from female mice immunized i.m. (top) or i.d. (bottom) with rAAV2/1-mOVA-HY.

(B) Absolute numbers of live dermal or epidermal $CD45^{+}IA-IE^{-}TCR\beta^{+}OVA_{257}^{+}CD8^{+}$ T cells of indicated individuals. Mean \pm SEM (n=3-6 mice per group, pooled from 2 independent experiments). n.d. not done * P<0.05, ** P<0.01, (two-way ANOVA/Sidak's test).

(C) Representative histograms for CD103, CD69, CD127, CD44, KLRG1 and CD62L expression in live epidermal $CD45^{+}IA-IE^{-}TCR\beta^{+}OVA_{257}^{+}CD8^{+}$ T cells from female mice immunized i.d. with rAAV2/1-mOVA-HY. Frequencies of expressing cells for each individual marker are displayed as mean \pm SEM.

(D) Representative dot-plots for CD103 and CD69 staining in live $CD45^{+}IA-IE^{-}TCR\beta^{+}OVA_{257}^{+}CD8^{+}$ T cells from dermis or epidermis cell suspensions of female mice immunized i.d. with indicated vector. (E) The production of IFN γ , TNF α and IL-2 was further measured after OVA₂₅₇ peptide (1 μ g/mL) in vitro re-stimulation of draining lymph nodes (dLN), epidermal and dermal cell suspensions. Relative proportion of single- (red), double- (green) and triple- (blue) cytokine-producing OVA₂₅₇ stimulated live CD8⁺ (dLN) and $CD45^{+}IA-IE^{-}TCR\beta^{+}CD8^{+}$ T cells (dermis and epidermis) are displayed. Analysis and presentation of distributions was performed as described in Figure 4. * P<0.05, ** P<0.01 ((C) n=3 mice per group, (D and E) n=3-6 mice per group, pooled from 2 independent experiments).

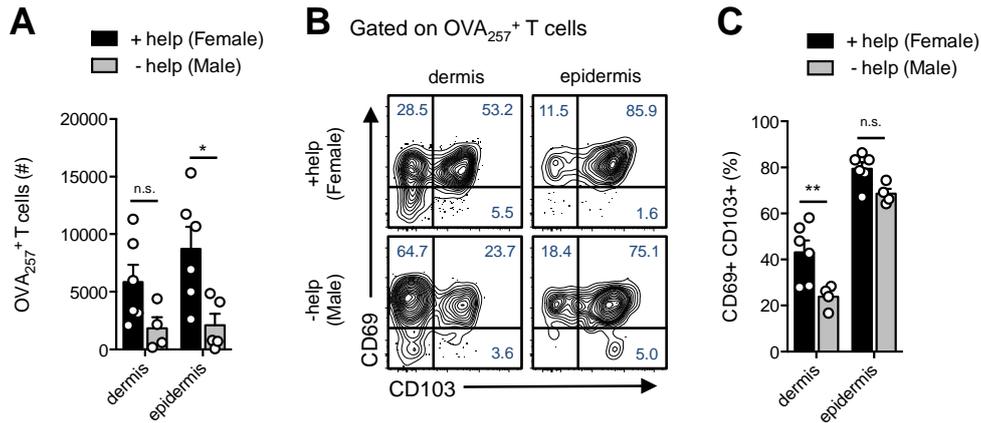


Figure 8: Induction of skin T_{RM} following rAAV2/1 immunization is dependent on CD4⁺ T cell help:

To analyze the impact of CD4⁺ T cell help on the induction of skin resident anti-OVA memory CD8⁺ T cells, male and female mice, immunized in the ear dermis with 3×10^{10} vg of rAAV2/1-mOVA-HY-miR142-3pT (mOVA-HY-miR), were analyzed between day 60 and day 70 post immunization.

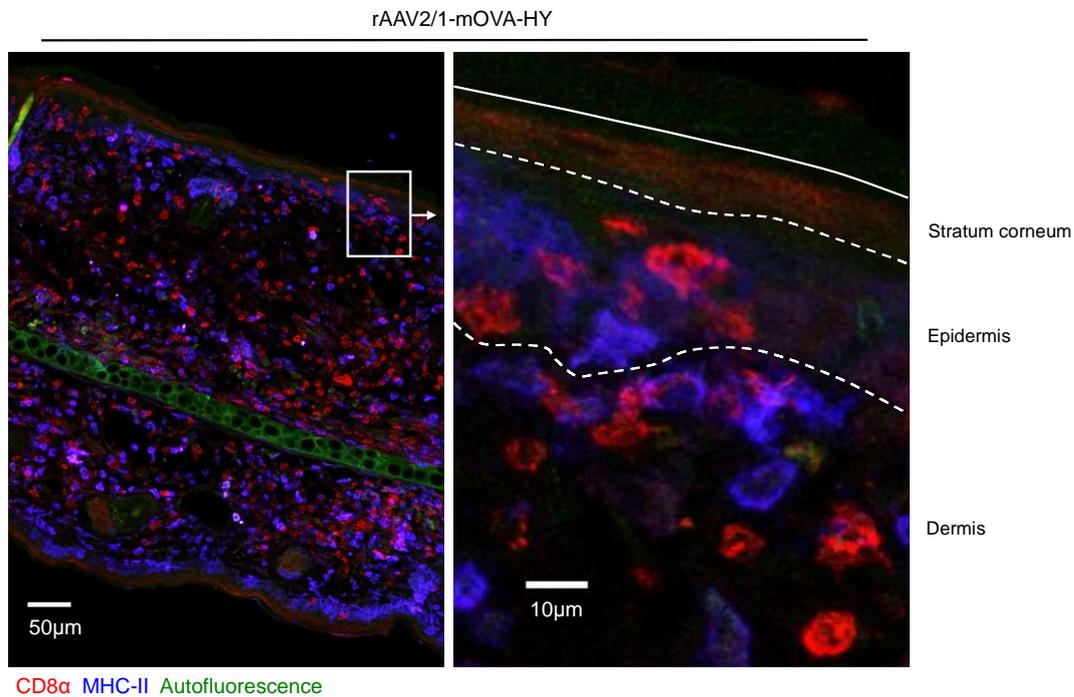
(A) Absolute numbers of live CD45⁺IA-IE⁻TCRβ⁺OVA₂₅₇⁺ CD8⁺ T cells from dermis or epidermis cell suspensions of indicated individuals. (B) Representative dot-plots for CD103 and CD69 staining and (C) frequencies of CD69⁺CD103⁺ in live CD45⁺IA-IE⁻TCRβ⁺OVA₂₅₇⁺ CD8⁺ T cells from dermis or epidermis cell suspensions of indicated individuals. Mean±SEM (n=4-6 mice per group pooled from 2 independent experiments). n.s. non significant, * P<0.05, ** P<0.01 and *** P<0.001 (2-way ANOVA/Sidak's test).

Supplemental Materials:

Intradermal immunization with rAAV2/1 vector induces potent memory CD8⁺ T cell responses.

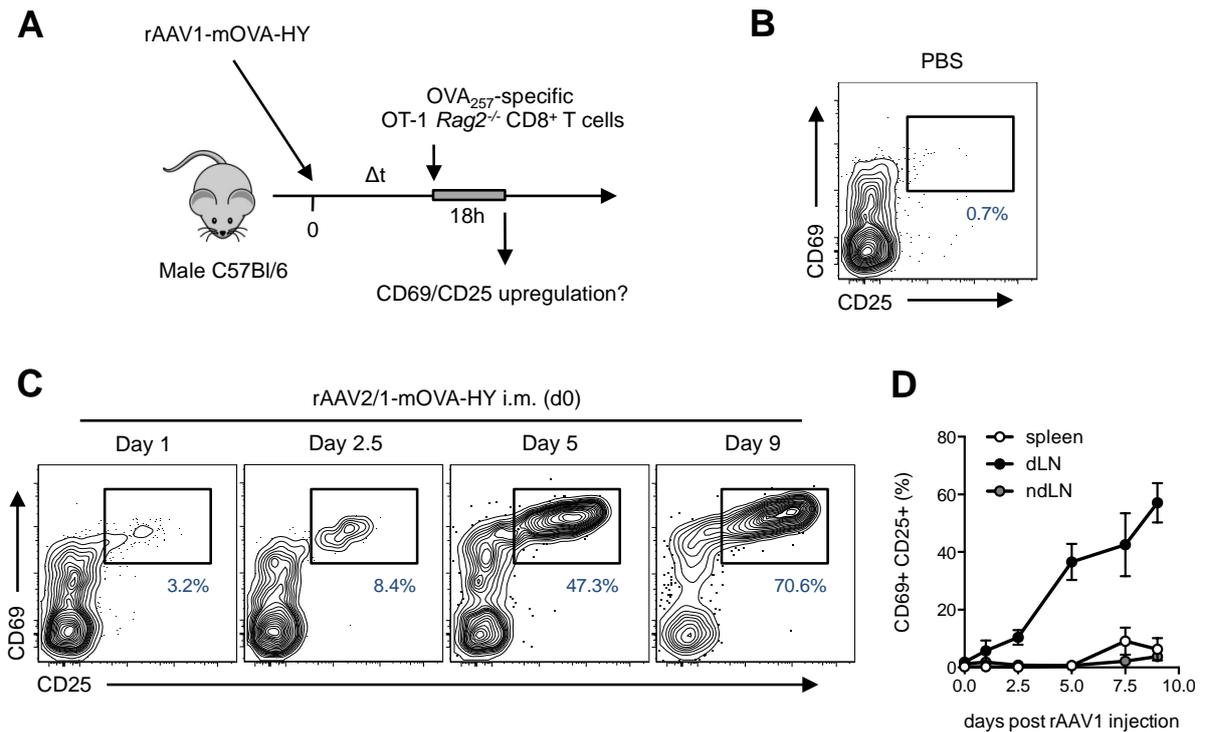
Alexandre Ghenassia, David-Alexandre Gross, Stéphanie Lorain, Fabiola Tros, Alain Charbit, Jean Davoust, Pascal Chappert.

Supplemental Figures:



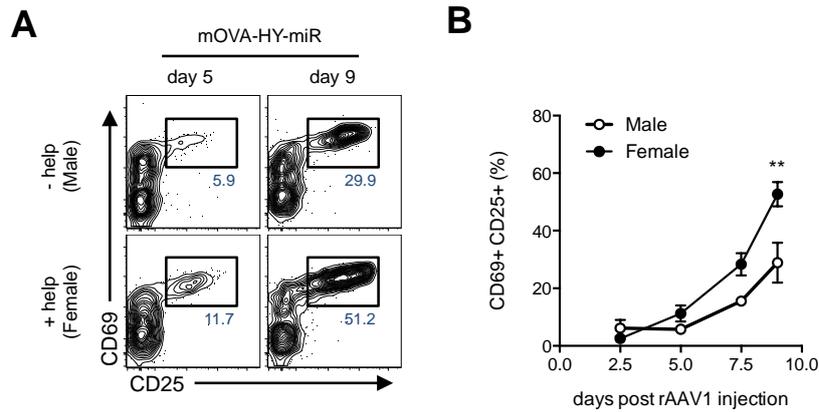
Supplemental Figure 1: CD8⁺ T cell infiltrates dermis and epidermis of immunized ear.

Female mice were immunized in ear dermis (i.d.) with 5×10^{10} vg of rAAV2/1-mOVA-HY (mOVA-HY). Injected ear were collected at day 14 after immunization and 20µm ear sections were stained with anti-CD8 (red) and anti-MHC-II (Blue) antibodies. Left image shows the Z-project (max intensity) of an original 1345µm x 852µm x 8µm mosaic image acquired on a LEICA SP8 confocal microscope using a 40x/1.30 Oil CS2 PL APO objective. Right image shows an enlargement of the region of interest depicted in the top right corner of the Left image. Images analysis was performed using ImageJ software.



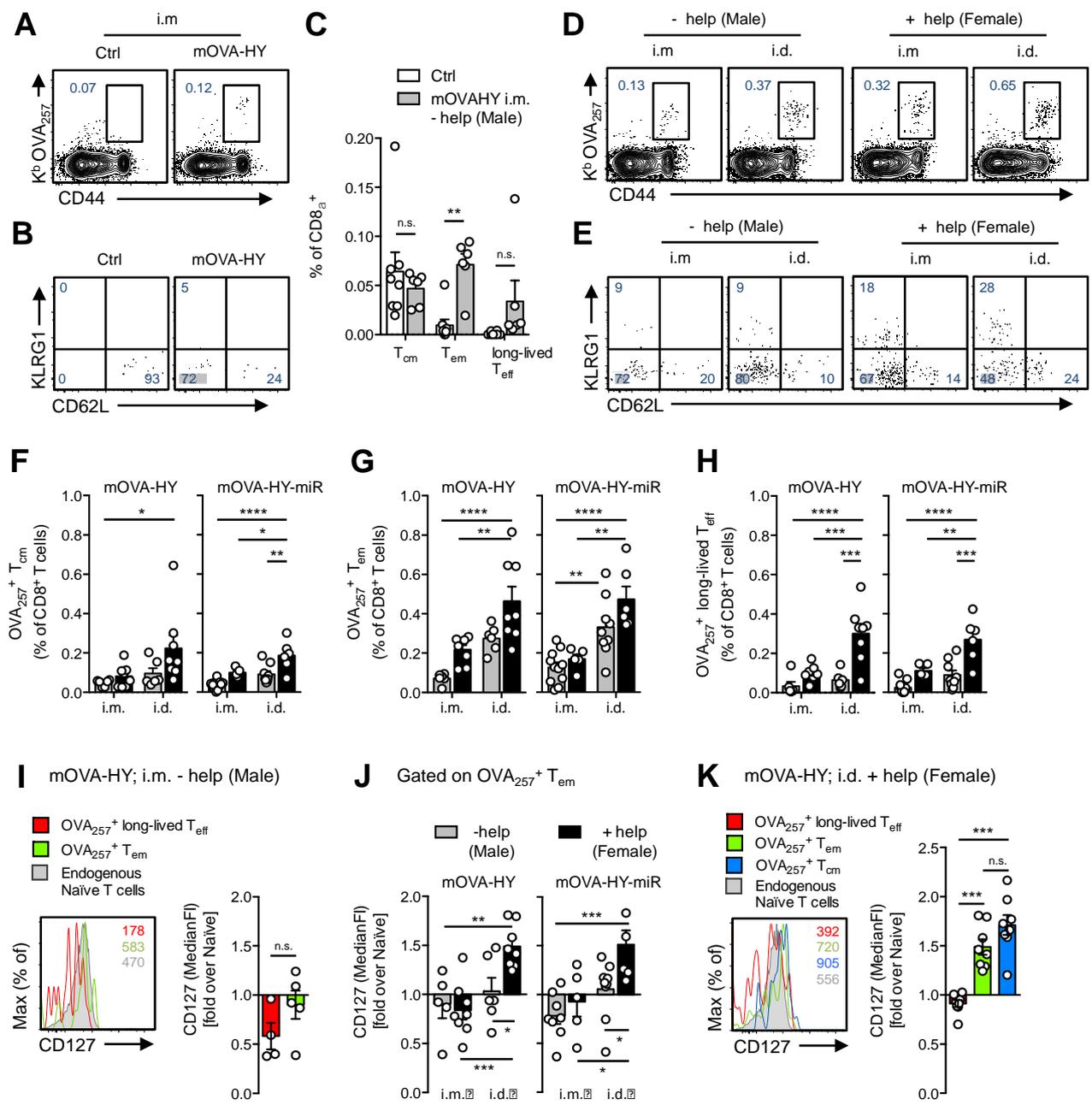
Supplemental Figure 2: Kinetic of transgene product presentation following intramuscular immunization:

Male mice were immunized in the tibialis anterior (i.m.) with 10^{10} vg of rAAV2/1-mOVA-HY (mOVA-HY) or 1x PBS. At indicated time points after immunization, mice were infused with 2×10^6 VPD-labeled OVA-specific TCR transgenic OT-1 T cells (A). (B-C) Representative dot-plots for CD69 and CD25 expression and (D) frequencies of CD25⁺CD69⁺ in live VPD⁺OT-1 T cells recovered from spleen, muscle draining lymph nodes (pooled inguinal and popliteal) or contralateral lymph nodes 18h after transfer. Mean \pm SEM, n=3-6 mice per group and per time point pooled from at least 2 independent experiments, except for day 7.5 and 9, n=3 mice per group and per time point from 1 experiment only.



Supplemental Figure 3: Limited impact of CD4⁺ T cell help on the cross-presentation of muscle-expressed transgene products:

(A-B) Male or female mice were immunized in the tibialis anterior (i.m.) with 10^{10} vg of rAAV2/1-mOVA-HY-miR142-3pT (mOVA-HY-miR). At indicated time points after rAAV2/1 immunization, mice were infused with VPD-labeled 2×10^6 OVA-specific TCR transgenic OT-1 T cells. (C) Representative dot-plots for CD69 and CD25 expression and (D) frequencies of CD25⁺CD69⁺ in live VPD⁺OT-1 T cells recovered from muscle or ear draining lymph nodes 18h after transfer. Mean \pm SEM (n=3-6 mice per group and per time point, pooled from at least 2 independent experiments). ** P<0.05 (2-way ANOVA/Sidak's test).



Supplemental Figure 4: CD4⁺ T cell help and route of immunization synergize in regulating the generation of anti-transgene effector/memory CD8⁺ T cells in draining LNs:

Anti-OVA memory CD8⁺ T cell responses were analyzed between day 60 and day 80 post immunization in the muscle (pooled inguinal and popliteal) or ear (cervicals) draining lymph nodes of male or female mice immunized in the tibialis anterior (i.m.) or ear dermis (i.d.) with

3×10^{10} vg of rAAV2/1-mOVA-HY (mOVA-HY), rAAV2/1-mOVA-HY-miR142-3pT (mOVA-HY-miR) or a control rAAV2/1 vector (Ctrl).

(A and D) Representative dot-plots for CD44 and K^b/OVA₂₅₇ tetramer staining in live splenic CD8⁺ T cells; (B and E) representative dot-plots for CD62L and KLRG1 staining in live splenic CD44^{hi}OVA₂₅₇⁺CD8⁺ T cells and (C and F-H) frequencies of CD44^{hi}OVA₂₅₇⁺CD62L⁺KLRG1⁻ (OVA₂₅₇⁺ T_{cm}), CD62L⁻KLRG1⁻ (OVA₂₅₇⁺ T_{em}) or CD62L⁻KLRG1⁺ (OVA₂₅₇⁺ long-lived T_{eff}) in total live dLN-resident CD8⁺ T cells from indicated individuals.

(I) Representative histograms for IL-7R α (CD127) expression and absolute Median fluorescence intensity (MedianFI) values (left) and graph for relative IL-7R α expression (right) in live dLN-resident OVA₂₅₇⁺ long term T_{eff} (red), OVA₂₅₇⁺ T_{em} (green) and endogenous naïve CD8 α ⁺ T cells (grey) from rAAV2/1-mOVA-HY i.m. immunized male. (J) Relative IL-7R α (CD127) expression in live dLN-resident OVA₂₅₇⁺ T_{em} from indicated individuals. (K) Same as I, in OVA₂₅₇⁺CD8⁺ T cells subsets from rAAV2/1-mOVA-HY i.d. immunized female. (I-K) relative IL-7R α expression is represented as the ratio of indicated cell population MedianFI over the MedianFI of the endogenous naïve CD8 α ⁺ cell population of the same individual to account for potential inter-experiments variations in the CD127 staining. Only mice with significant levels of each OVA₂₅₇⁺ T memory subset of interest (above mean+3SD of control vector) were included in the analysis. (A-K) Mean \pm SEM (n=5-11 mice per group, pooled from at least 3 independent experiments). n.s. non significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 and **** P<0.0001 (2-way ANOVA/Sidak's test, except (I) Wilcoxon test and (K) RM one-way ANOVA/Sidak's test).

DISCUSSION

Ce travail de thèse a permis d'apporter des évidences nouvelles quant à l'intérêt de bien choisir la voie d'immunisation dans l'optique d'utiliser les vecteurs AAV recombinants dans le transfert de gènes afin d'établir une mémoire immunologique à médiation cellulaire forte dans le cadre d'un processus de vaccination. Nos constructions de vecteurs AAV recombinants nous ont de plus donné l'opportunité d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes fins et régulateurs de la mémoire immunologique induite par ces vecteurs à travers la modulation des voies de présentation d'antigène et de l'impact d'un effet auxiliaire apporté par les lymphocytes T CD4⁺ aux lymphocytes T CD8⁺ anti-transgène.

Contrairement à ce qui avait pu être démontré auparavant concernant l'incapacité fonctionnelle des réponses cellulaires générées à la suite d'immunisations par des vecteurs AAV recombinants (Lin et al., 2007a, 2007b), nous avons pu montrer que la polyfonctionnalité de ces réponses cellulaires reposait à la fois sur la nature de la voie d'administration des vecteurs AAV recombinants et sur la nature du tissu cible, mais également sur les propriétés intrinsèques du transgène. En effet, un des facteurs limitants à l'utilisation des vecteurs AAV recombinants en vaccination est leur faible capacité de transduction des DCs, mécanisme sur lequel repose principalement la voie intramusculaire et qui comme décrit, est génératrice de réponses cellulaires faibles et peu efficaces. En administrant nos constructions de vecteurs AAV recombinants par voie intradermique nous avons pu faire la démonstration pour la toute première fois que le vecteur AAV2/1 recombinant, naturellement optimisé pour cibler le tissu musculaire, était capable de faire s'exprimer un transgène au sein de la peau et d'engager des réponses cellulaires fortes contre celui-ci. Grâce à la présence d'un épitope de classe II au sein du transgène véhiculé par nos vecteurs AAV2/1 recombinants, nous avons montré que le faible potentiel de la voie intramusculaire dans l'induction des réponses cellulaires pouvait être compensé par la présence de lymphocytes T CD4⁺ prompts à exercer leur effet auxiliaire sur la réponse spécifique des lymphocytes T CD8⁺. La peau étant un tissu capable de déclencher de fortes réponses immunitaires grâce à la présence de nombreuses DCs spécialisées notamment dans la présentation croisée d'antigène, nous avons montré qu'à elle seule cette voie de présentation d'antigène lors de l'injection intradermique de notre vecteur AAV2/1 recombinant régulé par le miR-142-3p, était capable de générer une forte réponse primaire T CD8⁺.

1. Potentialité de la voie intradermique pour l'utilisation des vecteurs AAV recombinants en vaccination

Jusqu'à présent la plupart des études menées en vaccination et reposant sur l'utilisation des vecteurs AAV recombinants pour effectuer du transfert de gènes s'étaient principalement intéressées à les administrer par voie intramusculaire ou intranasale (Nieto and Salvetti, 2014). Seule une étude reposant sur l'injection de vecteurs AAV recombinants par voie intradermique rapporta la génération de fortes réponses humorales contre le produit du transgène véhiculé (Ploquin et al., 2013). Pour autant, et c'est ce qui a focalisé notre investigation tout au long de mon travail de thèse, aucune étude ne s'est jamais intéressée à évaluer le potentiel de la voie intradermique, et des voies autres qu'intramusculaire en général, à générer des réponses cellulaires suite à l'injection de vecteurs AAV recombinants. Comme vu précédemment (voir Chapitre 2 Partie C. de l'Introduction), l'AAV1 possède un tropisme intrinsèque préférentiel pour le muscle squelettique (Arruda and Xiao, 2007; Brantly et al., 2009; Mingozzi et al., 2009; Wang et al., 2010), et ses capacités de transduction de la peau n'ont été que peu étudiées.

A l'heure actuelle, aucun sérotype naturel d'AAV n'a été identifié comme ayant un tropisme intrinsèque lui permettant d'atteindre la peau et d'y transduire les cellules résidentes. De ce fait, la stratégie de ciblage des vecteurs AAV recombinants vers la peau a notamment pu être investiguée cette fois-ci *in vitro* en modifiant les séquences peptidiques de la capsid de d'un AAV2 pour les remplacer par des peptides cibles capables d'être engagés dans la liaison avec un récepteur cutané spécifique identifié sur les kératinocytes humains, l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ (Sallach et al., 2014). Les auteurs montrèrent une efficacité accrue de ce vecteur AAV2 modifié dans la transduction de kératinocytes humains mais également de kératinocytes murins. Cette étude fit écho à des travaux réalisés 15 ans auparavant où des vecteurs AAV2-lacZ et AAV2-GFP recombinants avaient montré un fort potentiel dans la transduction *in vitro* de kératinocytes humains (Braun-Falco et al., 1999). De manière intéressante, un vecteur AAV2-lacZ recombinant fut utilisé *in vivo* et injecté par voie intradermique, et montra une capacité à transduire les kératinocytes mais également les cellules épithéliales de follicules pileux (Hengge, 2000). Donc la volonté de vouloir cibler la peau en tant que site privilégié de transfert de gènes par les vecteurs AAV recombinants prit tout son sens à la lumière des résultats obtenus dans les expériences *in vitro*.

Nous avons tout d'abord pu montrer que lorsqu'on administrait par voie intramusculaire notre construction rAAV2/1-mOVA-HY dans des souris femelles, celle-ci générerait environ 30 % de lymphocytes T CD8⁺ du sang circulants et spécifiques de l'épitope OVA₂₅₇ 14 jours après l'immunisation, période correspondant au pic de la réponse primaire. Ceci nous permit de confirmer la capacité intrinsèque de l'AAV1 à cibler spécifiquement le muscle et à y induire l'expression d'un transgène. A la connaissance de ce résultat, nous avons décidé d'évaluer en parallèle quel pourrait être le potentiel du vecteur rAAV2/1-mOVA-HY injecté par voie intradermique à induire une réponse primaire anti-OVA₂₅₇ chez des souris femelles. L'injection intradermique du vecteur rAAV2/1-mOVA-HY conduit à des taux de lymphocytes T CD8⁺ du sang circulants et spécifiques de l'épitope OVA₂₅₇ similaires à ceux observés par la voie intramusculaire au pic de la réponse primaire. De plus, nous avons constaté que la présentation d'antigène via la voie intradermique se faisait bien au niveau des ganglions lymphatiques drainants le derme de l'oreille seulement quelques jours après l'immunisation, ce qui démontre l'assimilation de l'antigène par des CPAs professionnelles de la peau capables de migrer au niveau des organes lymphoïdes secondaires adjacents. Ces résultats établirent la première démonstration connue à ce jour de l'efficacité d'un vecteur AAV1 recombinant injecté par voie intradermique à générer des réponses cellulaires fortes.

De plus, une étude réalisée *in vivo* dans un modèle de plaies cicatricielles de la peau chez la souris et se basant sur l'utilisation de vecteurs AAV recombinants pseudotypés démontra l'efficacité de transduction des cellules épidermiques et dermiques par des vecteurs AAV2/5 et AAV2/8 recombinants injectés par voie intradermique au niveau des plaies, conduisant à la cicatrisation cutanée de la souris (Keswani et al., 2012). Puis, les mêmes vecteurs furent utilisés dans la transduction *in vitro* de fibroblastes humains et murins, et tout comme *in vivo*, ils s'avèrent être plus efficaces que le vecteur AAV2/2 recombinant classique.

Dans notre étude nous avons choisi comme site d'injection intradermique l'oreille de la souris qui ne contient que des couches d'épiderme et de derme afin d'être certains de la réussite de notre vaccination. En effet, la souris possède une couche de muscles spécifique, appelée panniculus carnosus et mentionnée dans l'étude de Keswani *et al.* précédemment, sous la peau et non retrouvée chez l'homme et il est très facile de réaliser une injection hypodermique dans cette couche qui s'apparenterait à une injection intramusculaire dans le muscle tibial antérieur.

Pour conclure, nos résultats viennent renforcer les résultats des études citées précédemment apportant de véritables preuves quant à l'efficacité des vecteurs AAV recombinants pour le

transfert de gènes au sein de la peau. Enfin, et c'est certainement l'un des résultats le plus remarquable de nos travaux, nous avons pour la première fois mis à jour le potentiel d'un vecteur AAV2/1 recombinant administré par voie intradermique dans le déclenchement d'une immunité adaptative cellulaire robuste.

Néanmoins, et plus que de simplement démontrer l'aspect fonctionnel d'une immunisation intradermique pour le vecteur AAV1 recombinant, les résultats générés au cours de ma thèse ont de plus pu montrer que la sollicitation de la voie intradermique dans la vectorisation de vaccins par les vecteurs AAV recombinants, ou tout au moins par le vecteur AAV1 recombinant, a un impact majeur dans l'édification d'une réponse cellulaire robuste.

2. La peau, un site privilégié pour la présentation croisée de transgènes vaccinaux ?

Hormis la construction rAAV2/1-mOVA-HY, nous disposions également au sein du laboratoire de la construction rAAV2/1-mOVA-HY-miR. L'utilisation de ce vecteur recombinant permet d'éviter la présentation directe du transgène par les DCs. Utilisant ce mécanisme nous avons pu montrer que lorsque l'on injectait le vecteur rAAV2/1-mOVA-HY-miR par la voie intramusculaire chez des souris mâles, la réponse primaire T CD8⁺ induite était significativement beaucoup plus faible qu'avec le vecteur rAAV2/1-mOVA-HY confirmant ainsi les résultats précédemment obtenus dans notre laboratoire (Carpentier et al., 2015). De plus, nous avons pu mettre en évidence qu'il existait un délai dans les cinétiques de présentation d'antigène et d'activation des lymphocytes T CD8⁺ anti-OVA₂₅₇ avec l'utilisation de la construction rAAV2/1-mOVA-HY-miR ; décalant ainsi le pic de la réponse primaire à 21 jours et non plus à 14 jours comme observé avec la construction rAAV2/1-mOVA-HY.

Donc dans le cadre d'une immunisation intramusculaire non modulée par un effet auxiliaire des lymphocytes T CD4⁺, le vecteur AAV2/1 recombinant ne semble déclencher de réponse primaire T CD8⁺ notable que s'il est capable de délivrer le transgène au sein de CPAs compétentes à le présenter directement. Dans un tel contexte, cela confère une limitation non négligeable à l'utilisation des vecteurs AAV recombinants puisque comme déjà évoqué précédemment dans leurs caractéristiques, ils ne sont pas efficaces dans la transduction des DCs qui sont les spécialistes de la présentation directe d'antigène en vue de l'activation lymphocytaire (Jooss et al., 1998).

La dissection des différentes populations de DCs au sein de la peau chez la souris a, au contraire du muscle, pu montrer qu'une partie d'entre elles, les DCs CD103⁺, affichait une capacité de présentation croisée d'antigène accrue menant à une forte activation des lymphocytes T CD8⁺ (voir Chapitre 2 Partie B. 2. b.) (Bedoui et al., 2009; Henri et al., 2010; Shen et al., 2002). Nous avons pu montrer que l'immunisation intradermique avec le vecteur AAV2/1 recombinant permettait d'améliorer considérablement la réponse primaire T CD8⁺ en absence de présentation directe du transgène vaccinal. Cette démonstration souligna la forte efficacité de cette voie de présentation d'antigène après transfert de gènes par le vecteur AAV2/1 recombinant au sein de la peau dans l'initiation de fortes réponses effectrices T CD8⁺; révélant ainsi la participation facultative de la voie de présentation directe d'antigène dans un tel contexte. A noter qu'une telle observation avait déjà pu être faite lors de l'utilisation d'un vecteur recombinant dérivé de VV (Shen et al., 2002).

En résumé, la voie intradermique semble tout à fait être une voie propice à l'utilisation du vecteur AAV2/1 en vaccination puisque pour obtenir une réponse primaire T CD8⁺ robuste cela ne requiert pas la transduction de CPAs professionnelles, faculté limitante chez les vecteurs AAV.

3. Impact des réponses lymphocytaires T CD4⁺ dans la régulation des réponses primaires T CD8⁺ induites par un vecteur AAV recombinant vaccinal

Une fois établies ces relations de dépendances entre la voie intramusculaire et la voie de présentation directe d'antigène d'une part, et entre la voie intradermique et la voie de présentation croisée d'antigène d'autre part, nous avons voulu connaître l'impact de l'apport d'un effet auxiliaire des lymphocytes T CD4⁺ sur la régulation de la réponse primaire T CD8⁺ selon la modulation de la présentation d'antigène. Pour cela, nous avons immunisé par voie intramusculaire des souris femelles avec le vecteur rAAV2/1-mOVA-HY-miR et nous avons observé une réponse primaire avec une cinétique et une intensité quasi-équivalentes à celles obtenues avec le vecteur rAAV2/1-mOVA-HY. Un tel résultat remet en perspective cette notion de dépendance entre la voie intramusculaire et la voie de présentation directe d'antigène dès lors que des DCs sont capables d'activer des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires pourvoyeurs de signaux effecteurs à la réponse primaire T CD8⁺. Dans ce contexte d'immunisation par un vecteur AAV2/1 recombinant, on peut donc parler d'un « sauvetage » de la réponse primaire croisée T CD8⁺ dans le muscle grâce à l'effet auxiliaire.

Comme évoqué dans le **1.**, à la suite d'une administration par la voie intramusculaire de notre construction rAAV2/1-mOVA-HY chez des souris femelles environ 30 % de lymphocytes T CD8⁺ du sang circulants étaient spécifiques de l'antigène OVA₂₅₇ 14 jours après l'immunisation, alors que seulement environ 7 % l'étaient chez des souris mâles. Cet impact de la présence de l'antigène mâle H-Y observé chez les souris femelles traduisant un effet auxiliaire des lymphocytes T CD4⁺ sur la réponse primaire orchestrée par les lymphocytes T CD8⁺ anti-OVA₂₅₇, venait renforcer et confirmer les observations préalablement faites au sein du laboratoire à propos de la régulation de la réponse primaire T CD8⁺ par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires lors d'une immunisation intramusculaire avec la même construction (Carpentier et al., 2015). L'injection intradermique du vecteur rAAV2/1-mOVA-HY mit en lumière un contraste certes moins prononcé (30 % versus 15 %), mais pour autant significatif entre les niveaux de réponses primaires T CD8⁺ induits chez des souris femelles et chez des souris mâles, concluant ainsi à l'importance de la participation des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires lors de la mise en place d'une réponse primaire T CD8⁺. Nous avons donc pu démontrer qu'à travers les injections de notre vecteur rAAV2/1-mOVA-HY via deux types de voies d'administration vaccinales, les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires étaient impliqués notamment dans le rendement cellulaire des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs obtenus en fin de phase d'amplification clonale. S'il semble désormais établi de par notre modèle expérimental que l'effet auxiliaire à la réponse primaire T CD8⁺ anti-OVA₂₅₇ ait un rôle quantitatif, ceci pourrait dans le cadre de notre étude correspondre à une implication précoce des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires au moment de l'activation des lymphocytes T CD8⁺, ce qui serait en accord avec les arguments avancés dans la littérature au sujet de leur timing d'intervention (Janssen et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003). Contrairement à ce qui a pu être observé avec une infection par LCMV, il semblerait que l'amplification primaire des cellules T CD8⁺ due à l'infection par le vecteur rAAV2/1-mOVA-HY repose sur la présence de réponses de type Th, ce qui apporte un nouvel élément de compréhension de la régulation des réponses cellulaires liées aux vecteurs AAV recombinants.

4. Impact des réponses auxiliaires T CD4⁺ et du choix de la voie d'injection sur les réponses T CD8⁺ mémoires induites à l'aide d'un vecteur AAV recombinant vaccinal

Dans le but de réaliser l'objectif principal de mon projet de thèse, je me suis surtout attaché à évaluer la nature des lymphocytes T CD8⁺ anti-transgène ayant survécu à la contraction clonale des effecteurs et se trouvant désormais au stade de la mémoire tardive de la réponse immunitaire suite à une immunisation avec une de nos deux constructions de vecteurs AAV recombinants. Nous avons pu observer qu'environ 70 jours après une vaccination primaire par le vecteur rAAV2/1-mOVA-HY via la voie intramusculaire chez des souris mâles, les lymphocytes T CD8⁺ anti-OVA₂₅₇ de la rate se répartissaient en deux populations quasi-identiques en termes de nombre : les T_{EM} CD8⁺ (CD44^{fort} KLRG1⁻ CD62L⁻) et les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs de longue durée de vie très différenciés (CD44^{fort} KLRG1⁺ CD62L⁻). De manière intéressante, nous avons pu montrer que ni l'injection intradermique du vecteur rAAV2/1-mOVA-HY toujours en absence d'effet auxiliaire ni l'injection intramusculaire avec ce même vecteur cette fois-ci en présence d'effet auxiliaire ne permettaient d'accroître significativement le nombre de T_{EM} CD8⁺ voire même de générer une fréquence significative de T_{CM} CD8⁺ (CD44^{fort} KLRG1⁻ CD62L⁺), autre population attendue pour faire partie du pool de cellules mémoires spécifiques se trouvant au sein des organes lymphoïdes secondaires. Ainsi, tout comme ce qui a déjà été décrit à la suite d'immunisations avec Lm, VSV et VV en présence de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (Obar et al., 2010), nous avons pu démontrer qu'une immunisation en présence d'une réponse lymphocytaire T CD4⁺ auxiliaire avec l'un ou l'autre de nos vecteurs AAV2/1 recombinants tendait surtout à générer en plus grand nombre des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs de longue durée de vie exprimant fortement KLRG1.

En ce qui concerne les deux autres populations retrouvées au stade de la mémoire tardive, les T_{EM} CD8⁺ et les T_{CM} CD8⁺, leur fréquence se trouva significativement élevée à la suite de l'injection intradermique de l'une ou l'autre de nos constructions, pour autant que cela soit combiné à la présence de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires. Nous avons également montré que la régulation de l'expression de CD127 au niveau des T_{EM} CD8⁺ anti-OVA₂₅₇ dépendait majoritairement de la voie d'injection. En effet, dans le cas d'une immunisation intradermique avec l'un ou l'autre de nos vecteurs AAV2/1 recombinants, cette population de lymphocytes T CD8⁺ mémoires était beaucoup plus apte à réexprimer l'IL-7R α et donc à détecter dans son

environnement des signaux promouvant sa survie. Quant à la population de $T_{CM} CD8^+$ anti-OVA₂₅₇, la combinaison de la voie intradermique et de l'effet auxiliaire apporté par les lymphocytes T $CD4^+$ leur conféra le meilleur niveau de réexpression de CD127, et donc un maintien homéostatique à long terme.

Donc faisant le parallèle avec ce qui avait pu être démontré lors d'une infection par LCMV (Kaech et al., 2003), dans notre cas l'immunisation intradermique avec le vecteur AAV2/1 recombinant a permis la génération de cellules précurseurs mémoires réexprimant fortement CD127 et qui sont susceptibles de se différencier en T_{EM} , comme décrit dans la littérature (Badovinac et al., 2007; Marzo et al., 2005; Wherry et al., 2003, 2004), et qui sous l'influence de la présence initiale de lymphocytes T $CD4^+$ auxiliaires semblent pouvoir se convertir en T_{CM} .

La nature des lymphocytes T $CD8^+$ mémoires anti-OVA₂₅₇ ayant pu être établie, nous avons également tenté d'estimer leur aptitude à amorcer rapidement leurs fonctions effectrices en vue de sécréter des cytokines capables d'activer la fonction cytotoxique des CTLs. Nous avons montré que l'injection intramusculaire de l'un ou l'autre de nos vecteurs AAV2/1 recombinants dissociée de la présence de lymphocytes T $CD4^+$ auxiliaires, conduisait à l'expression majoritaire d'une seule cytokine, l'IFN- γ . La polyfonctionnalité de ces lymphocytes T $CD8^+$ mémoires anti-OVA₂₅₇ se trouva nettement améliorée dès que les vecteurs furent injectés soit dans un contexte d'apport d'un effet auxiliaire par les lymphocytes T $CD4^+$ (surtout vrai pour le vecteur rAAV2/1-mOVA-HY), soit par la voie intradermique, ou soit lors de la combinaison des deux. En effet, la proportion de cellules mémoires doubles productrices d'IFN- γ et de TNF- α ainsi que celle de cellules mémoires triples productrices d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-2 augmentèrent significativement. Enfin, grâce à la modulation de la présentation d'antigène apportée par nos constructions de vecteurs AA2/1 recombinants, nous avons pu mettre en évidence que le maintien d'une polyfonctionnalité robuste des lymphocytes T $CD8^+$ mémoires anti-OVA₂₅₇ issus de la différenciation d'effecteurs ayant été activés par la présentation croisée d'antigène, nécessitait une vaccination intradermique couplée à un effet auxiliaire.

Nous avons finalement décidé de tester l'efficacité de protection des lymphocytes T $CD8^+$ mémoires anti-OVA₂₅₇ lors d'un challenge avec des doses létales de Lm-OVA sur des souris préalablement immunisées avec le vecteur rAAV2/1-mOVA-HY-miR via la voie intradermique. Il s'avéra que les souris les mieux protégées furent celles pour lesquelles un

effet auxiliaire avait au préalable impacté la génération des lymphocytes T CD8⁺ mémoires. Cette efficacité de protection est donc à corréler avec le profil polyfonctionnel des lymphocytes T CD8⁺ mémoires anti-OVA₂₅₇ que nous avons pu mettre en évidence auparavant, ce qui corrobore les résultats d'études antérieures ayant caractérisé le profil fonctionnel des lymphocytes T CD8⁺ mémoires associé à leur efficacité protectrice (Seder et al., 2008; Sun et al., 2008).

En conclusion nous avons prouvé que le vecteur AAV2/1 recombinant est capable de générer des réponses cellulaires fortes, polyfonctionnelles et protectrices contre le transgène qu'il véhicule lorsqu'il est utilisé en vaccination. Cette capacité est dépendante de la présence de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires et également de la voie d'injection intradermique qui favorise l'activation lymphocytaire par la voie de présentation croisée d'antigène.

5. Capacité des vecteurs AAV recombinants à induire des lymphocytes T résidents mémoires ?

Jusqu'à présent nos résultats ont montré le potentiel du vecteur AAV2/1 recombinant selon différentes modulations à induire trois populations de cellules mémoires, les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs de longue durée KLRG1⁺, les T_{EM} et les T_{CM}, toutes les trois ayant la capacité de recirculer entre les organes lymphoïdes secondaires et les tissus périphériques infectés et de conférer une protection systémique. Depuis 2009, la caractérisation de T_{RM} spécifiques au sein des tissus périphériques et qui ne recirculent pas contrairement à leurs homologues systémiques, a montré tout leur potentiel dans la protection anti-infectieuse *in situ* (Çuburu et al., 2012; Gebhardt et al., 2009; Jiang et al., 2012; Masopust et al., 2010; Wakim et al., 2010). Ainsi, nous avons souhaité savoir si le vecteur AAV2/1 recombinant pouvait également participer à l'induction d'une telle population de cellules mémoires. Au stade de la mémoire tardive de la réponse immunitaire (environ 60 jours après immunisation), nous avons pu détecter au sein de l'épiderme et du derme des lymphocytes T CD8⁺ mémoires anti-OVA₂₅₇ issus de la vaccination intradermique par l'un ou l'autre de nos vecteurs AAV2/1 recombinants. Une grande partie des lymphocytes T CD8⁺ mémoires anti-OVA₂₅₇ fut retrouvée au niveau de l'épiderme et leur caractérisation phénotypique nous permit de les identifier comme étant de véritables T_{RM} arborant le phénotype CD69⁺ CD103⁺ KLRG1⁻ CD44^{fort} CD127^{faible/-} CD62L⁻. Au sein du derme, nous avons identifié en majorité des T_{RM} anti-OVA₂₅₇ CD69⁺ CD103⁺ conventionnels, mais également des populations de lymphocytes

T CD8⁺ mémoires anti-OVA₂₅₇ CD69⁺ CD103⁻ et CD69⁻ CD103⁻ qui pourraient tout à fait s'apparenter à ces nouvelles sous-populations de T_{RM} récemment décrites (Steinert et al., 2015). L'évaluation des capacités fonctionnelles de ces populations de T_{RM} montra qu'ils étaient dotés de fonctions effectrices diverses et qu'ils étaient tout aussi polyfonctionnels voire même ayant un potentiel prolifératif meilleur que leurs homologues recirculants.

Enfin, nous avons voulu savoir si dans notre modèle de vaccination par le vecteur AAV2/1 recombinant la génération de T_{RM} et son maintien reposaient sur la présence de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires comme ce qui a déjà pu être établi dans des modèles d'infections par le virus de la grippe (Laidlaw et al., 2014) ou par HPV (Çuburu et al., 2012). En absence d'effet auxiliaire, l'immunisation intradermique par le vecteur rAAV2/1-mOVA-HY-miR conduit à une réduction d'environ un facteur 4 du nombre de T_{RM} anti-OVA₂₅₇ présents au niveau de l'épiderme. De plus, la fréquence des T_{RM} anti-OVA₂₅₇ CD69⁺ CD103⁺ du derme se trouva significativement réduite.

En conclusion, la régulation de l'établissement d'une mémoire spécifique et fonctionnelle au sein d'un tissu périphérique tel que la peau dans un contexte de vaccination par le vecteur AAV2/1 recombinant, s'appuie sur la présence et l'aptitude des lymphocytes T CD4⁺ à fournir un effet auxiliaire à la réponse primaire T CD8⁺.

Utilisant la combinaison de la voie intradermique et de la présence de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires, nous avons réussi à définir pour la première fois les paramètres nécessaires, dans le cadre d'une vaccination avec un vecteur AAV recombinant, à l'obtention de lymphocytes T CD8⁺ mémoires polyfonctionnels au niveau systémique, mais également résidents au niveau du site d'injection, et enfin protecteurs face à l'intrusion d'un pathogène virulent.

6. Perspectives

Notre étude est donc véritablement la toute première à s'être intéressée à la nature et la fonction des réponses cellulaires induites suite à une vaccination intradermique avec des vecteurs AAV recombinants. En effet jusqu'à aujourd'hui, seule une étude avait caractérisé la génération de réponses humorales via cette même voie de vaccination en utilisant des vecteurs AAV recombinants (Ploquin et al., 2013). Par ailleurs, l'induction de réponses humorales après une vaccination avec des vecteurs AAV recombinants a longtemps été montrée comme étant une des propriétés de ces vecteurs, laissant de côté l'intérêt d'une investigation au niveau des réponses cellulaires.

Nous espérons donc que nos travaux permettront d'envisager de nouvelles applications vaccinales basées sur l'utilisation des vecteurs AAV recombinants en tant qu'outils vaccinaux capables de transférer efficacement des transgènes promouvant la génération de réponses cellulaires fortes et efficaces au sein de tissus privilégiés tels que la peau, avec de plus une incidence importante sur une protection contre des pathogènes systémiques présents dans d'autres tissus.

De nos jours, les protocoles de vaccination utilisés en médecine humaine se concentrent essentiellement sur l'obtention d'une protection efficace conférée par une mémoire immunologique à médiation humorale. Bien que la preuve de concept de l'immunisation via la peau ait été établie depuis plus de deux siècles, l'administration de vaccins par la voie cutanée n'a pas vraiment évolué (Teunissen et al., 2012). Seuls les vaccins contre la rage et le BCG (Bacille Calmette-Guérin) possèdent actuellement l'autorisation pour être délivrés via la voie intradermique. A ce jour, la plupart des vaccins commercialisés sont administrés par voie intramusculaire dans le but de faciliter leur injection par les praticiens, de minimiser la sensation de douleur chez le patient, et éviter le risque de génération de désordres cutanés visibles à vie tels que ceux liés au processus de scarification dans le cas de la vaccination antivariolique interrompue en 1979. Néanmoins, le choix d'une telle voie d'administration contraste et crée un paradoxe dû au manque d'évidences que le tissu musculaire soit une cible universelle pour tous types de vaccins. Le rôle majeur des DCs dans l'activation du système immunitaire rend d'autant plus intéressant l'utilisation de la voie intradermique car la peau possède un réseau important de DCs. De plus, la peau est très accessible et arbore une organisation des cellules immunitaires bien développée, celles-ci étant prêtes à répondre rapidement et efficacement avec des connexions nombreuses vers les tissus lymphatiques

environnants. Pour ces raisons, la peau représente une alternative intéressante vis-à-vis des tissus du muscle pour la vaccination. L'intérêt de cibler de manière directe ou indirecte les CPAs est donc à la fois double puisqu'il permet d'une part de faire s'exprimer un antigène via la machinerie des voies de présentation d'antigène, et d'autre part d'édifier une réponse primaire cellulaire spécifique. Notre étude a démontré que l'utilisation du vecteur AAV2/1 octroyait tous ces avantages et qu'il était capable de les mettre en œuvre au sein de la peau. A l'avenir, il serait donc intéressant de concentrer le développement de nouveaux protocoles de vaccination sur la capacité des vecteurs AAV recombinants à pouvoir véhiculer différentes sources d'antigènes jusqu'aux CPAs, et ce notamment au niveau des sites où elles sont le plus présentes.

Outre leur emploi en médecine régénérative et pour des transferts de gènes thérapeutiques, l'usage des vecteurs AAV recombinants semble donc prometteur en vaccination, cependant le contexte de leurs utilisations doit être bien défini. En effet chez l'homme, la séroprévalence en termes d'anticorps neutralisants anti-AAV est une limitation à l'utilisation de certains sérotypes par rapports à d'autres (Calcedo et al., 2009; Mingozi and Büning, 2015). Comme vu précédemment, l'efficacité d'un vecteur AAV recombinant réside en sa capacité à faire s'exprimer son transgène, mais s'il est précocement neutralisé par des anticorps il ne pourra pas assurer sa fonction. De plus, la capacité de réaction croisée des anticorps générés contre un sérotype particulier d'AAV ajoute une barrière supplémentaire à l'établissement d'une réponse cellulaire contre le produit du transgène. En vaccination humaine, une seule injection n'est pas considérée comme suffisante pour assurer le maintien définitif de la mémoire immunologique tout au long de la vie d'un individu. Ainsi, des rappels sont nécessaires à la restimulation du système immunitaire et de sa mémoire. Au final, ces immunisations successives pourraient conduire à la neutralisation complète du vecteur AAV recombinant bien avant qu'il ait délivré son transgène, et ce même dans le cas où l'on permuterait le sérotype à cause des fortes réactions croisées des réponses humorales anti-AAV. L'utilisation du vecteur AAVrh32.33 recombinant, variant de l'AAV4, pourrait s'avérer être une bonne stratégie en vaccination humaine. En effet, la séroprévalence en anticorps neutralisants qui caractérise ce sérotype est la plus faible parmi celles de tous les autres sérotypes, ce qui augmenterait les chances de ce vecteur par rapport aux autres d'échapper à cette première barrière humorale, et donc de véhiculer son transgène jusqu'à sa cible. De plus, ce vecteur a été montré comme étant capable de générer des réponses cellulaires fortes équivalentes à celles d'un adénovirus, une des caractéristiques essentielles comme vue dans notre modèle à l'établissement d'une protection anti-infectieuse robuste.

Enfin s'il existe un domaine où ces considérations ne sont pas aussi limitantes pour l'utilisation des vecteurs AAV recombinants en vaccination, c'est celui de la prophylaxie en santé animale. En effet, contrairement à ce qui a pu être décrit chez l'homme, les séroprévalences en anticorps anti-AAV restent plutôt faibles du fait que les animaux ne semblent pas avoir été sujets à une exposition naturelle dès leur naissance aux infections par les AAVs. Ainsi, la capacité de réaction croisée des anticorps générés est beaucoup plus faible, et le changement de sérotype permet des injections répétées tout en évitant la capture du vecteur AAV recombinant. S'ajoutant à ces avantages, un argument de poids vient renforcer l'intérêt d'utiliser les vecteurs AAV recombinants dans les futurs protocoles de développement de vaccins à usage vétérinaire, il s'agit de la courte espérance de vie des animaux destinés à la consommation humaine. La santé de l'homme repose en grande partie sur la capacité à maintenir un état sanitaire irréprochable des élevages destinés à sa consommation, d'où l'importance de campagnes de vaccination auprès des éleveurs. Puisque les animaux d'élevage sont, pour la plupart, consommés très tôt dans leur vie, une vaccination unique suffit à conférer la protection nécessaire sans avoir besoin d'effectuer de rappels ; et c'est là que les vecteurs AAV recombinants pourraient mettre en avant tout leur potentiel. Une absence d'immunité humorale préexistante, une seule injection vaccinale au cours de la vie de l'animal, sont les arguments phares qui pourraient pousser dans le futur les entreprises pharmaceutiques spécialisées dans la santé animale à développer des vaccins véhiculés par les vecteurs AAV recombinants. Les crises sanitaires dans le domaine animal ont par le passé soulevé d'énormes questions quant à la manière la plus efficace de protéger les élevages face à des maladies infectieuses souvent restreintes à leur espèce ; et de ce fait l'utilisation des vecteurs AAV recombinants dans un tel contexte pourrait être la réponse de demain face à de tels enjeux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- van der Aar, A.M.G., Groot, R. de, Sanchez-Hernandez, M., Taanman, E.W.M., van Lier, R.A.W., Teunissen, M.B.M., Jong, E.C. de, and Kapsenberg, M.L. (2011). Cutting Edge: Virus Selectively Primes Human Langerhans Cells for CD70 Expression Promoting CD8+ T Cell Responses. *J. Immunol.* *187*, 3488–3492.
- Akache, B., Grimm, D., Pandey, K., Yant, S.R., Xu, H., and Kay, M.A. (2006). The 37/67-Kilodalton Laminin Receptor Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Serotypes 8, 2, 3, and 9. *J. Virol.* *80*, 9831–9836.
- 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. (2005). 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.
- André, F.E. (2003). Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. *Vaccine* *21*, 593–595.
- Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M.A., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A., et al. (2002). Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.* *8*, 379–385.
- Ariotti, S., Beltman, J.B., Chodaczek, G., Hoekstra, M.E., van Beek, A.E., Gomez-Eerland, R., Ritsma, L., van Rheenen, J., Maree, A.F.M., Zal, T., et al. (2012). Tissue-resident memory CD8+ T cells continuously patrol skin epithelia to quickly recognize local antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 19739–19744.
- Ariotti, S., Hogenbirk, M.A., Dijkgraaf, F.E., Visser, L.L., Hoekstra, M.E., Song, J.-Y., Jacobs, H., Haanen, J.B., and Schumacher, T.N. (2014). Skin-resident memory CD8+ T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science* *346*, 101–105.
- Arnberg, N. (2009). Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev. Med. Virol.* *19*, 165–178.
- Arruda, V.R., and Xiao, W. (2007). It's all about the clothing: capsid domination in the adeno-associated viral vector world. *J. Thromb. Haemost.* *5*, 12–15.
- Asokan, A., Hamra, J.B., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Samulski, R.J. (2006). Adeno-Associated Virus Type 2 Contains an Integrin $\alpha 5\beta 1$ Binding Domain Essential for Viral Cell Entry. *J. Virol.* *80*, 8961–8969.
- Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* *149*, 754–755.
- Awate, S., Wilson, H.L., Singh, B., Babiuk, L.A., and Mutwiri, G. (2014). The adjuvant PCEP induces recruitment of myeloid and lymphoid cells at the injection site and draining lymph node. *Vaccine* *32*, 2420–2427.
- Baba, Y., Satoh, S., Otsu, M., Sasaki, E., Okada, T., and Watanabe, S. (2012). In vitro cell subtype-specific transduction of adeno-associated virus in mouse and marmoset retinal explant culture. *Biochimie* *94*, 2716–2722.

- Babiuk, S., Mookherjee, N., Pontarollo, R., Griebel, P., Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S., Hecker, R., and Babiuk, L. (2004). TLR9^{-/-} and TLR9^{+/+} mice display similar immune responses to a DNA vaccine. *Immunology* *113*, 114–120.
- Bachmann, M.F., Hunziker, L., Zinkernagel, R.M., Storni, T., and Kopf, M. (2004). Maintenance of memory CTL responses by T helper cells and CD40-CD40 ligand: antibodies provide the key. *Eur. J. Immunol.* *34*, 317–326.
- Bachmann, M.F., Wolint, P., Schwarz, K., Jäger, P., and Oxenius, A. (2005). Functional Properties and Lineage Relationship of CD8⁺ T Cell Subsets Identified by Expression of IL-7 Receptor α and CD62L. *J. Immunol.* *175*, 4686–4696.
- Badovinac, V.P., and Harty, J.T. (2003). Memory lanes. *Nat. Immunol.* *4*, 212–213.
- Badovinac, V.P., and Harty, J.T. (2006). Programming, demarcating, and manipulating CD8⁺ T-cell memory. *Immunol. Rev.* *211*, 67–80.
- Badovinac, V.P., Tvinnereim, A.R., and Harty, J.T. (2000). Regulation of Antigen-Specific CD8⁺ T Cell Homeostasis by Perforin and Interferon- γ . *Science* *290*, 1354–1357.
- Badovinac, V.P., Porter, B.B., and Harty, J.T. (2004). CD8⁺ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat. Immunol.* *5*, 809–817.
- Badovinac, V.P., Messingham, K.A.N., Jabbari, A., Haring, J.S., and Harty, J.T. (2005). Accelerated CD8⁺ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat. Med.* *11*, 748–756.
- Badovinac, V.P., Messingham, K.A.N., Griffith, T.S., and Harty, J.T. (2006). TRAIL Deficiency Delays, but Does Not Prevent, Erosion in the Quality of “Helpless” Memory CD8 T Cells. *J. Immunol.* *177*, 999–1006.
- Badovinac, V.P., Haring, J.S., and Harty, J.T. (2007). Initial T Cell Receptor Transgenic Cell Precursor Frequency Dictates Critical Aspects of the CD8⁺ T Cell Response to Infection. *Immunity* *26*, 827–841.
- Balazs, A.B., Chen, J., Hong, C.M., Rao, D.S., Yang, L., and Baltimore, D. (2011). Antibody-based Protection Against HIV Infection by Vectored ImmunoProphylaxis. *Nature* *481*, 81–84.
- Balazs, A.B., Bloom, J.D., Hong, C.M., Rao, D.S., and Baltimore, D. (2013). Broad protection against influenza infection by vectored immunoprophylaxis in mice. *Nat. Biotechnol.* *31*, 647–652.
- Banerjee, A., Gordon, S.M., Intlekofer, A.M., Paley, M.A., Mooney, E.C., Lindsten, T., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2010). Cutting Edge: The Transcription Factor Eomesodermin Enables CD8⁺ T Cells To Compete for the Memory Cell Niche. *J. Immunol.* *185*, 4988–4992.
- Bartel, M., Schaffer, D., and Büning, H. (2011). Enhancing the Clinical Potential of AAV Vectors by Capsid Engineering to Evade Pre-Existing Immunity. *Front. Microbiol.* *2*.
- Bartlett, J.S., Kleinschmidt, J., Boucher, R.C., and Samulski, R.J. (1999). Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab' γ)₂ antibody. *Nat. Biotechnol.* *17*, 181–186.

- Bartoccioni, E., Gallucci, S., Scuderi, F., Ricci, E., Servidei, S., Broccolini, A., and Tonali, P. (1994). MHC class I, MHC class II and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in inflammatory myopathies. *Clin. Exp. Immunol.* *95*, 166–172.
- Basner-Tschakarjan, E., and Mingozzi, F. (2014). Cell-Mediated Immunity to AAV Vectors, Evolving Concepts and Potential Solutions. *Front. Immunol.* *5*.
- Becker, T.C., Wherry, E.J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., and Ahmed, R. (2002). Interleukin 15 Is Required for Proliferative Renewal of Virus-specific Memory CD8 T Cells. *J. Exp. Med.* *195*, 1541–1548.
- Bedoui, S., Whitney, P.G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R.S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F.R., et al. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* *10*, 488–495.
- Belz, G.T., Wodarz, D., Diaz, G., Nowak, M.A., and Doherty, P.C. (2002). Compromised Influenza Virus-Specific CD8+ T-Cell Memory in CD4+ T-Cell-Deficient Mice. *J. Virol.* *76*, 12388–12393.
- Bender, A., Ernst, N., Iglesias, A., Dornmair, K., Wekerle, H., and Hohlfield, R. (1995). T cell receptor repertoire in polymyositis: clonal expansion of autoaggressive CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* *181*, 1863–1868.
- Benlahrech, A., Harris, J., Meiser, A., Papagatsias, T., Hornig, J., Hayes, P., Lieber, A., Athanopoulos, T., Bachy, V., Csomor, E., et al. (2009). Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 19940–19945.
- Bergman, P.J., McKnight, J., Novosad, A., Charney, S., Farrelly, J., Craft, D., Wulderk, M., Jeffers, Y., Sadelain, M., Hohenhaus, A.E., et al. (2003). Long-Term Survival of Dogs with Advanced Malignant Melanoma after DNA Vaccination with Xenogeneic Human Tyrosinase A Phase I Trial. *Clin. Cancer Res.* *9*, 1284–1290.
- Betts, M.R., Nason, M.C., West, S.M., Rosa, S.C.D., Migueles, S.A., Abraham, J., Lederman, M.M., Benito, J.M., Goepfert, P.A., Connors, M., et al. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* *107*, 4781–4789.
- Black, A.P.B., Ardern-Jones, M.R., Kasprovicz, V., Bowness, P., Jones, L., Bailey, A.S., and Ogg, G.S. (2007). Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* *37*, 1485–1493.
- Blacklow, N.R., Hoggan, M.D., and Rowe, W.P. (1967). Isolation of adenovirus-associated viruses from man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *58*, 1410–1415.
- Blaser, C., Kaufmann, M., and Pircher, H. (1998). Cutting Edge: Virus-Activated CD8 T Cells and Lymphokine-Activated NK Cells Express the Mast Cell Function-Associated Antigen, An Inhibitory C-Type Lectin. *J. Immunol.* *161*, 6451–6454.
- Boisgerault, F., Gross, D.-A., Ferrand, M., Poupiot, J., Darocha, S., Richard, I., and Galy, A. (2013). Prolonged Gene Expression in Muscle Is Achieved Without Active Immune Tolerance Using MicroRNA 142.3p-Regulated rAAV Gene Transfer. *Hum. Gene Ther.* *24*, 393–405.

- Boudreau, J.E., Bridle, B.W., Stephenson, K.B., Jenkins, K.M., Brunellière, J., Bramson, J.L., Lichty, B.D., and Wan, Y. (2009). Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Transduction of Dendritic Cells Enhances Their Ability to Prime Innate and Adaptive Antitumor Immunity. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *17*, 1465–1472.
- Bouneaud, C., Garcia, Z., Kourilsky, P., and Pannetier, C. (2005). Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells in vivo. *J. Exp. Med.* *201*, 579–590.
- Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. (2002). A Role for CD40 Expression on CD8+ T Cells in the Generation of CD8+ T Cell Memory. *Science* *297*, 2060–2063.
- Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M.F., and Masurier, C. (2010). Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Hum. Gene Ther.* *21*, 704–712.
- Bowles, D.E., Rabinowitz, J.E., and Samulski, R.J. (2003). Marker Rescue of Adeno-Associated Virus (AAV) Capsid Mutants: a Novel Approach for Chimeric AAV Production. *J. Virol.* *77*, 423–432.
- Brantly, M.L., Chulay, J.D., Wang, L., Mueller, C., Humphries, M., Spencer, L.T., Rouhani, F., Conlon, T.J., Calcedo, R., Betts, M.R., et al. (2009). Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 16363–16368.
- Braun-Falco, M., Doenecke, A., Smola, H., and Hallek, M. (1999). Efficient gene transfer into human keratinocytes with recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* *6*.
- Breman, J.G., and Arita, I. (1980). The Confirmation and Maintenance of Smallpox Eradication. *N. Engl. J. Med.* *303*, 1263–1273.
- Brigitte, M., Schilte, C., Plonquet, A., Baba-Amer, Y., Henri, A., Charlier, C., Tajbakhsh, S., Albert, M., Gherardi, R.K., and Chrétien, F. (2010). Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum.* *62*, 268–279.
- Brockstedt, D.G., Podsakoff, G.M., Fong, L., Kurtzman, G., Mueller-Ruchholtz, W., and Engleman, E.G. (1999). Induction of Immunity to Antigens Expressed by Recombinant Adeno-Associated Virus Depends on the Route of Administration. *Clin. Immunol.* *92*, 67–75.
- Brown, K.E. (2010). The expanding range of parvoviruses which infect humans. *Rev. Med. Virol.* *20*, 231–244.
- Brown, B.D., Venneri, M.A., Zingale, A., Sergi, L.S., and Naldini, L. (2006). Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat. Med.* *12*, 585–591.
- Buchbinder, S.P., Mehrotra, D.V., Duerr, A., Fitzgerald, D.W., Mogg, R., Li, D., Gilbert, P.B., Lama, J.R., Marmor, M., del Rio, C., et al. (2008). Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* *372*, 1881–1893.

- Buchholz, V.R., Flossdorf, M., Hensel, I., Kretschmer, L., Weissbrich, B., Graf, P., Verschoor, A., Schiemann, M., Hofer, T., and Busch, D.H. (2013). Disparate Individual Fates Compose Robust CD8⁺ T Cell Immunity. *Science* 340, 630–635.
- Budd, R.C., Cerottini, J.C., Horvath, C., Bron, C., Pedrazzini, T., Howe, R.C., and MacDonald, H.R. (1987). Distinction of virgin and memory T lymphocytes. Stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. *J. Immunol.* 138, 3120–3129.
- Buller, R.M.L., Janik, J.E., Sebring, E.D., and Rose, J.A. (1981). Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Completely Help Adenovirus-Associated Virus Replication. *J. Virol.* 40, 241–247.
- Büning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadat-Humme, S., and Hallek, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J. Gene Med.* 10, 717–733.
- Büning, H., Bolyard, C.M., Hallek, M., and Bartlett, J.S. (2011). Modification and labeling of AAV vector particles. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 807, 273–300.
- Bursch, L.S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D.H., and Hogquist, K.A. (2007). Identification of a novel population of Langerin⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204, 3147–3156.
- Calabro, S., Tortoli, M., Baudner, B.C., Pacitto, A., Cortese, M., O’Hagan, D.T., De Gregorio, E., Seubert, A., and Wack, A. (2011). Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 29, 1812–1823.
- Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Gao, G., Lin, J., and Wilson, J.M. (2009). Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *J. Infect. Dis.* 199, 381–390.
- Calcedo, R., Morizono, H., Wang, L., McCarter, R., He, J., Jones, D., Batshaw, M.L., and Wilson, J.M. (2011). Adeno-Associated Virus Antibody Profiles in Newborns, Children, and Adolescents ▽. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 18, 1586–1588.
- Carbone, F.R., Mackay, L.K., Heath, W.R., and Gebhardt, T. (2013). Distinct resident and recirculating memory T cell subsets in non-lymphoid tissues. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 329–333.
- Carpentier, M., Lorain, S., Chappert, P., Lalfer, M., Hardet, R., Urbain, D., Peccate, C., Adriouch, S., Garcia, L., Davoust, J., et al. (2015). Intrinsic Transgene Immunogenicity Gears CD8⁺ T-cell Priming After rAAV-Mediated Muscle Gene Transfer. *Mol. Ther.* 23, 697–706.
- Casey, K.A., Fraser, K.A., Schenkel, J.M., Moran, A., Abt, M.C., Beura, L.K., Lucas, P.J., Artis, D., Wherry, E.J., Hogquist, K., et al. (2012). Antigen-Independent Differentiation and Maintenance of Effector-like Resident Memory T Cells in Tissues. *J. Immunol.* 188, 4866–4875.
- Casimiro, D.R., Chen, L., Fu, T.-M., Evans, R.K., Caulfield, M.J., Davies, M.-E., Tang, A., Chen, M., Huang, L., Harris, V., et al. (2003). Comparative Immunogenicity in Rhesus Monkeys of DNA Plasmid, Recombinant Vaccinia Virus, and Replication-Defective

- Adenovirus Vectors Expressing a Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag Gene. *J. Virol.* *77*, 6305–6313.
- Casrouge, A., Beaudoin, E., Dalle, S., Pannetier, C., Kanellopoulos, J., and Kourilsky, P. (2000). Size Estimate of the $\alpha\beta$ TCR Repertoire of Naive Mouse Splenocytes. *J. Immunol.* *164*, 5782–5787.
- Castellino, F., Huang, A.Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., and Germain, R.N. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell–dendritic cell interaction. *Nature* *440*, 890–895.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A., and Banchereau, J. (1997). CD34⁺ Hematopoietic Progenitors From Human Cord Blood Differentiate Along Two Independent Dendritic Cell Pathways in Response to Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Plus Tumor Necrosis Factor α : II. Functional Analysis. *Blood* *90*, 1458–1470.
- Cepek, K.L., Shaw, S.K., Parker, C.M., Russell, G.J., Morrow, J.S., Rimm, D.L., and Brenner, M.B. (1994). Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the $\alpha E\beta 7$ integrin. *Nature* *372*, 190–193.
- Chen, C.-Z., Li, L., Lodish, H.F., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science* *303*, 83–86.
- Chiarella, P., Fazio, V.M., and Signori, E. (2010). Application of electroporation in DNA vaccination protocols. *Curr. Gene Ther.* *10*, 281–286.
- Chin’ombe, N., Bourn, W.R., Williamson, A.-L., and Shephard, E.G. (2009). Oral vaccination with a recombinant Salmonella vaccine vector provokes systemic HIV-1 subtype C Gag-specific CD4⁺ Th1 and Th2 cell immune responses in mice. *Virol. J.* *6*, 87.
- Colella, P., and Auricchio, A. (2012). Gene Therapy of Inherited Retinopathies: A Long and Successful Road from Viral Vectors to Patients. *Hum. Gene Ther.* *23*, 796–807.
- Crotty, S., Johnston, R.J., and Schoenberger, S.P. (2010). Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat. Immunol.* *11*, 114–120.
- Çuburu, N., Graham, B.S., Buck, C.B., Kines, R.C., Pang, Y.-Y.S., Day, P.M., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2012). Intravaginal immunization with HPV vectors induces tissue-resident CD8⁺ T cell responses. *J. Clin. Invest.* *122*, 4606–4620.
- Çuburu, N., Wang, K., Goodman, K.N., Pang, Y.Y., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Cohen, J.I., and Schiller, J.T. (2015). Topical Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2) Vaccination with Human Papillomavirus Vectors Expressing gB/gD Ectodomains Induces Genital-Tissue-Resident Memory CD8⁺ T Cells and Reduces Genital Disease and Viral Shedding after HSV-2 Challenge. *J. Virol.* *89*, 83–96.
- Cui, W., Liu, Y., Weinstein, J.S., Craft, J., and Kaech, S.M. (2011). An Interleukin-21-Interleukin-10-STAT3 Pathway Is Critical for Functional Maturation of Memory CD8⁺ T Cells. *Immunity* *35*, 792–805.

- Curnow, J., Corlett, L., Willcox, N., and Vincent, A. (2001). Presentation by myoblasts of an epitope from endogenous acetylcholine receptor indicates a potential role in the spreading of the immune response. *J. Neuroimmunol.* *115*, 127–134.
- Curnow, S.J., Willcox, N., and Vincent, A. (1998). Induction of primary immune responses by allogeneic human myoblasts: dissection of the cell types required for proliferation, IFN γ secretion and cytotoxicity. *J. Neuroimmunol.* *86*, 53–62.
- Curtsinger, J.M., Johnson, C.M., and Mescher, M.F. (2003). CD8 T Cell Clonal Expansion and Development of Effector Function Require Prolonged Exposure to Antigen, Costimulation, and Signal 3 Cytokine. *J. Immunol.* *171*, 5165–5171.
- Cyster, J.G., and Schwab, S.R. (2012). Sphingosine-1-Phosphate and Lymphocyte Egress from Lymphoid Organs. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 69–94.
- Daar, A.S., Fuggle, S.V., Fabre, J.W., Ting, A., and Morris, P.J. (1984). The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation* *38*, 287–292.
- Dalakas, M.C. (1991). Polymyositis, Dermatomyositis, and Inclusion-Body Myositis. *N. Engl. J. Med.* *325*, 1487–1498.
- Davis, B.S., Chang, G.-J.J., Cropp, B., Roehrig, J.T., Martin, D.A., Mitchell, C.J., Bowen, R., and Bunning, M.L. (2001). West Nile Virus Recombinant DNA Vaccine Protects Mouse and Horse from Virus Challenge and Expresses In Vitro a Noninfectious Recombinant Antigen That Can Be Used in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *J. Virol.* *75*, 4040–4047.
- Daya, S., and Berns, K.I. (2008). Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clin. Microbiol. Rev.* *21*, 583–593.
- DeLong, R.K., Akhtar, U., Sallee, M., Parker, B., Barber, S., Zhang, J., Craig, M., Garrad, R., Hickey, A., and Engstrom, E. (2009). Characterization and performance of nucleic acid nanoparticles combined with protamine and gold. *Biomaterials* *30*, 6451–6459.
- Denis-Mize, K.S., Dupuis, M., Singh, M., Woo, C., Ugozzoli, M., O'Hagan, D.T., Donnelly III, J.J., Ott, G., and McDonald, D.M. (2003). Mechanisms of increased immunogenicity for DNA-based vaccines adsorbed onto cationic microparticles. *Cell. Immunol.* *225*, 12–20.
- Donnelly, J.J., Friedman, A., Martinez, D., Montgomery, D.L., Shiver, J.W., Motzel, S.L., Ulmer, J.B., and Liu, M.A. (1995). Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nat. Med.* *1*, 583–587.
- Donnelly, J.J., Ulmer, J.B., Shiver, J.W., and Liu, M.A. (1997). Dna Vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 617–648.
- Du, L., Kido, M., Lee, D.V., Rabinowitz, J.E., Samulski, R.J., Jamieson, S.W., Weitzman, M.D., and Thistlethwaite, P.A. (2004). Differential Myocardial Gene Delivery by Recombinant Serotype-Specific Adeno-associated Viral Vectors. *Mol. Ther.* *10*, 604–608.
- Du, L., He, Y., Wang, Y., Zhang, H., Ma, S., Wong, C.K.L., Wu, S.H.W., Ng, F., Huang, J.-D., Yuen, K.-Y., et al. (2006). Recombinant adeno-associated virus expressing the receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus S protein elicits neutralizing antibodies: Implication for developing SARS vaccines. *Virology* *353*, 6–16.

- Duan, D., Li, Q., Kao, A.W., Yue, Y., Pessin, J.E., and Engelhardt, J.F. (1999). Dynamin Is Required for Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 Infection. *J. Virol.* *73*, 10371–10376.
- Duan, D., Yue, Y., and Engelhardt, J.F. (2001). Expanding AAV Packaging Capacity with Trans-splicing or Overlapping Vectors: A Quantitative Comparison. *Mol. Ther.* *4*, 383–391.
- Dustin, M.L. (2004). Stop and Go Traffic to Tune T Cell Responses. *Immunity* *21*, 305–314.
- Edwards, L.E., Haluszczak, C., and Kedl, R.M. (2013). Phenotype and function of protective, CD4-independent CD8 T cell memory. *Immunol. Res.* *55*, 135–145.
- Einfeld, D.A., Schroeder, R., Roelvink, P.W., Lizonova, A., King, C.R., Kovesdi, I., and Wickham, T.J. (2001). Reducing the Native Tropism of Adenovirus Vectors Requires Removal of both CAR and Integrin Interactions. *J. Virol.* *75*, 11284–11291.
- Ellis, B.L., Hirsch, M.L., Barker, J.C., Connelly, J.P., Steininger, R.J., and Porteus, M.H. (2013). A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. *Virol. J.* *10*, 74.
- Englund, P., Lindroos, E., Nennesmo, I., Klareskog, L., and Lundberg, I.E. (2001). Skeletal Muscle Fibers Express Major Histocompatibility Complex Class II Antigens Independently of Inflammatory Infiltrates in Inflammatory Myopathies. *Am. J. Pathol.* *159*, 1263–1273.
- Fang, J., Qian, J.-J., Yi, S., Harding, T.C., Tu, G.H., VanRoey, M., and Jooss, K. (2005). Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat. Biotechnol.* *23*, 584–590.
- Fennelly, G.J., Khan, S.A., Abadi, M.A., Wild, T.F., and Bloom, B.R. (1999). Mucosal DNA Vaccine Immunization Against Measles with a Highly Attenuated *Shigella flexneri* Vector. *J. Immunol.* *162*, 1603–1610.
- Ferrari, F.K., Xiao, X., McCarty, D., and Samulski, R.J. (1997). New developments in the generation of Ad-free, high-titer rAAV gene therapy vectors. *Nat. Med.* *3*, 1295–1297.
- Ferrari, G., Kostyu, D.D., Cox, J., Dawson, D.V., Flores, J., Weinhold, K.J., and Osmanov, S. (2000). Identification of Highly Conserved and Broadly Cross-Reactive HIV Type 1 Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes as Candidate Immunogens for Inclusion in *Mycobacterium bovis* BCG-Vectored HIV Vaccines. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *16*, 1433–1443.
- Fletcher, J.M., Vukmanovic-Stejic, M., Dunne, P.J., Birch, K.E., Cook, J.E., Jackson, S.E., Salmon, M., Rustin, M.H., and Akbar, A.N. (2005). Cytomegalovirus-Specific CD4+ T Cells in Healthy Carriers Are Continuously Driven to Replicative Exhaustion. *J. Immunol.* *175*, 8218–8225.
- Flotte, T.R., and Berns, K.I. (2005). Adeno-Associated Virus: A Ubiquitous Commensal of Mammals. *Hum. Gene Ther.* *16*, 401–407.
- Flotte, T.R., Schwiebert, E.M., Zeitlin, P.L., Carter, B.J., and Guggino, W.B. (2005). Correlation Between DNA Transfer and Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cell Correction

After Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 2 Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* 16, 921–928.

Flotte, T.R., Trapnell, B.C., Humphries, M., Carey, B., Calcedo, R., Rouhani, F., Campbell-Thompson, M., Yachnis, A.T., Sandhaus, R.A., McElvaney, N.G., et al. (2011). Phase 2 Clinical Trial of a Recombinant Adeno-Associated Viral Vector Expressing α 1-Antitrypsin: Interim Results. *Hum. Gene Ther.* 22, 1239–1247.

Fouts, T.R., Lewis, G.K., and Hone, D.M. (1995a). Construction and characterization of a *Salmonella typhi*-based human immunodeficiency virus type 1 vector vaccine. *Vaccine* 13, 561–569.

Fouts, T.R., Tuskan, R.G., Chada, S., Hone, D.M., and Lewis, G.K. (1995b). Construction and immunogenicity of *Salmonella typhimurium* vaccine vectors that express HIV-1 gp120. *Vaccine* 13, 1697–1705.

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, 911–917.

Gabitzsch, E.S., Xu, Y., Yoshida, L.H., Balint, J., Amalfitano, A., and Jones, F.R. (2009). Novel Adenovirus type 5 vaccine platform induces cellular immunity against HIV-1 Gag, Pol, Nef despite the presence of Ad5 immunity. *Vaccine* 27, 6394–6398.

Gahan, M.E., Webster, D.E., Wesselingh, S.L., Strugnell, R.A., and Yang, J. (2009). Bacterial Antigen Expression Is an Important Component in Inducing an Immune Response to Orally Administered *Salmonella*-Delivered DNA Vaccines. *PLoS ONE* 4.

Gao, G., Alvira, M.R., Somanathan, S., Lu, Y., Vandenberghe, L.H., Rux, J.J., Calcedo, R., Sanmiguel, J., Abbas, Z., and Wilson, J.M. (2003). Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6081–6086.

Gao, G., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X., and Wilson, J.M. (2004). Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues. *J. Virol.* 78, 6381–6388.

Gao, G., Lu, Y., Calcedo, R., Grant, R.L., Bell, P., Wang, L., Figueredo, J., Lock, M., and Wilson, J.M. (2006). Biology of AAV Serotype Vectors in Liver-Directed Gene Transfer to Nonhuman Primates. *Mol. Ther.* 13, 77–87.

Gao, G.-P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11854–11859.

Gaspari, A.A., and Katz, S.I. (1991). Induction of in vivo hyporesponsiveness to contact allergens by hapten-modified Ia⁺ keratinocytes. *J. Immunol.* 147, 4155–4161.

Gebhardt, T., Wakim, L.M., Eidsmo, L., Reading, P.C., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2009). Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* 10, 524–530.

- Gebhardt, T., Whitney, P.G., Zaid, A., Mackay, L.K., Brooks, A.G., Heath, W.R., Carbone, F.R., and Mueller, S.N. (2011). Different patterns of peripheral migration by memory CD4+ and CD8+ T cells. *Nature* 477, 216–219.
- Gerdts, V., Tsang, C., Griebel, P.J., and Babiuk, L.A. (2004). DNA vaccination in utero: a new approach to induce protective immunity in the newborn. *Vaccine* 22, 1717–1727.
- Gerlach, C., Rohr, J.C., Perie, L., van Rooij, N., van Heijst, J.W.J., Velds, A., Urbanus, J., Naik, S.H., Jacobs, H., Beltman, J.B., et al. (2013). Heterogeneous Differentiation Patterns of Individual CD8+ T Cells. *Science* 340, 635–639.
- Ghosh, A., Yue, Y., and Duan, D. (2006). Viral serotype and the transgene sequence influence overlapping adeno-associated viral (AAV) vector-mediated gene transfer in skeletal muscle. *J. Gene Med.* 8, 298–305.
- Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S.A., et al. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J. Exp. Med.* 206, 3115–3130.
- Ginhoux, F., Ng, L.G., and Merad, M. (2012). Understanding the murine cutaneous dendritic cell network to improve intradermal vaccination strategies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 351, 1–24.
- Goebels, N., Michaelis, D., Wekerle, H., and Hohlfeld, R. (1992). Human myoblasts as antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 149, 661–667.
- Gómez-Román, V.R., Grimes Jr., G.J., Potti, G.K., Peng, B., Demberg, T., Gravlin, L., Treece, J., Pal, R., Lee, E.M., Alvord, W.G., et al. (2006). Oral delivery of replication-competent adenovirus vectors is well tolerated by SIV- and SHIV-infected rhesus macaques. *Vaccine* 24, 5064–5072.
- Grieger, J.C., Snowdy, S., and Samulski, R.J. (2006). Separate Basic Region Motifs within the Adeno-Associated Virus Capsid Proteins Are Essential for Infectivity and Assembly. *J. Virol.* 80, 5199–5210.
- Grimm, D., and Kleinschmidt, J.A. (1999). Progress in Adeno-Associated Virus Type 2 Vector Production: Promises and Prospects for Clinical Use. *Hum. Gene Ther.* 10, 2445–2450.
- Gründemann, C., Bauer, M., Schweier, O., Oppen, N. von, Lässig, U., Saudan, P., Becker, K.-F., Karp, K., Hanke, T., Bachmann, M.F., et al. (2006). Cutting Edge: Identification of E-Cadherin as a Ligand for the Murine Killer Cell Lectin-Like Receptor G1. *J. Immunol.* 176, 1311–1315.
- Guilliams, M., Henri, S., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Schwartz-Cornil, I., Dalod, M., and Malissen, B. (2010). From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *Eur. J. Immunol.* 40, 2089–2094.
- Halbert, C.L., Miller, A.D., McNamara, S., Emerson, J., Gibson, R.L., Ramsey, B., and Aitken, M.L. (2006). Prevalence of Neutralizing Antibodies against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 2, 5, and 6 in Cystic Fibrosis and Normal Populations: Implications for Gene Therapy using AAV Vectors. *Hum. Gene Ther.* 17, 440–447.

- Hamilton, S.E., and Harty, J.T. (2002). Quantitation of CD8⁺ T Cell Expansion, Memory, and Protective Immunity After Immunization with Peptide-Coated Dendritic Cells. *J. Immunol.* *169*, 4936–4944.
- Haniffa, M., Ginhoux, F., Wang, X.-N., Bigley, V., Abel, M., Dimmick, I., Bullock, S., Grisotto, M., Booth, T., Taub, P., et al. (2009). Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J. Exp. Med.* *206*, 371–385.
- Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.-N., Malinarich, F., Malleret, B., et al. (2012). Human Tissues Contain CD141^{hi} Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103⁺ Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity* *37*, 60–73.
- Hanke, T., Corral, L., Vance, R.E., and Raulet, D.H. (1998). 2F1 antigen, the mouse homolog of the rat “mast cell function-associated antigen”, is a lectin-like type II transmembrane receptor expressed by natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* *28*, 4409–4417.
- Hanke, T., McMichael, A.J., Mwau, M., Wee, E.G.-T., Ceberej, I., Patel, S., Sutton, J., Tomlinson, M., and Samuel, R.V. (2002a). Development of a DNA-MVA/HIVA vaccine for Kenya. *Vaccine* *20*, 1995–1998.
- Hanke, T., McMichael, A.J., Samuel, R.V., Powell, L.A.J., McLoughlin, L., Crome, S.J., and Edlin, A. (2002b). Lack of toxicity and persistence in the mouse associated with administration of candidate DNA- and modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based HIV vaccines for Kenya. *Vaccine* *21*, 108–114.
- Hansen, J., Qing, K., and Srivastava, A. (2001). Infection of Purified Nuclei by Adeno-associated Virus 2. *Mol. Ther.* *4*, 289–296.
- Harding, T.C., Dickinson, P.J., Roberts, B.N., Yendluri, S., Gonzalez-Edick, M., Lecouteur, R.A., and Jooss, K.U. (2006). Enhanced Gene Transfer Efficiency in the Murine Striatum and an Orthotopic Glioblastoma Tumor Model, Using AAV-7- and AAV-8-Pseudotyped Vectors. *Hum. Gene Ther.* *17*, 807–820.
- Haring, J.S., Corbin, G.A., and Harty, J.T. (2005). Dynamic Regulation of IFN- γ Signaling in Antigen-Specific CD8⁺ T Cells Responding to Infection. *J. Immunol.* *174*, 6791–6802.
- Haring, J.S., Badovinac, V.P., and Harty, J.T. (2006). Inflaming the CD8⁺ T Cell Response. *Immunity* *25*, 19–29.
- Harro, C.D., Robertson, M.N., Lally, M.A., O’Neill, L.D., Edupuganti, S., Goepfert, P.A., Mulligan, M.J., Priddy, F.H., Dubey, S.A., Kierstead, L.S., et al. (2009). Safety and Immunogenicity of Adenovirus-Vectored Near-Consensus HIV Type 1 Clade B gag Vaccines in Healthy Adults. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *25*, 103–114.
- Hartigan-O’Connor, D., Kirk, C.J., Crawford, R., Mulé, J.J., and Chamberlain, J.S. (2001). Immune Evasion by Muscle-Specific Gene Expression in Dystrophic Muscle. *Mol. Ther.* *4*, 525–533.
- Hauck, B., Chen, L., and Xiao, W. (2003). Generation and Characterization of Chimeric Recombinant AAV Vectors. *Mol. Ther.* *7*, 419–425.

- Hauck, B., Xu, R.R., Xie, J., Wu, W., Ding, Q., Sipler, M., Wang, H., Chen, L., Wright, J.F., and Xiao, W. (2006). Efficient AAV1-AAV2 Hybrid Vector for Gene Therapy of Hemophilia. *Hum. Gene Ther.* *17*, 46–54.
- Hawke, S., Stevenson, P.G., Freeman, S., and Bangham, C.R.M. (1998). Long-Term Persistence of Activated Cytotoxic T Lymphocytes after Viral Infection of the Central Nervous System. *J. Exp. Med.* *187*, 1575–1582.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2001a). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* *1*, 126–134.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2001b). Cross-Presentation, Dendritic Cells, Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 47–64.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2009). Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat. Immunol.* *10*, 1237–1244.
- Helft, J., Ginhoux, F., Bogunovic, M., and Merad, M. (2010). Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunol. Rev.* *234*, 55–75.
- Henckaerts, E., and Linden, R.M. (2010). Adeno-associated virus: a key to the human genome? *Future Virol.* *5*, 555–574.
- Hengge, U. (2000). Adeno-Associated Virus Expresses Transgenes in Hair Follicles and Epidermis. *Mol. Ther.* *2*, 188–194.
- Henri, S., Poulin, L.F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Guilliams, M., Bovis, B. de, Devilard, E., Viret, C., Azukizawa, H., Kissenpfennig, A., et al. (2010). CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* *207*, 189–206.
- Henson, S.M., Franzese, O., Macaulay, R., Libri, V., Azevedo, R.I., Kiani-Alikhan, S., Plunkett, F.J., Masters, J.E., Jackson, S., Griffiths, S.J., et al. (2009). KLRG1 signaling induces defective Akt (ser473) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8+ T cells. *Blood* *113*, 6619–6628.
- Herson, S., Hentati, F., Rigolet, A., Behin, A., Romero, N.B., Leturcq, F., Laforêt, P., Maisonobe, T., Amouri, R., Haddad, H., et al. (2012). A phase I trial of adeno-associated virus serotype 1- γ -sarcoglycan gene therapy for limb girdle muscular dystrophy type 2C. *Brain* *135*, 483–492.
- Hervas-Stubbs, S., Olivier, A., Boisgerault, F., Thieblemont, N., and Leclerc, C. (2007). TLR3 ligand stimulates fully functional memory CD8+ T cells in the absence of CD4+ T-cell help. *Blood* *109*, 5318–5326.
- Hikono, H., Kohlmeier, J.E., Takamura, S., Wittmer, S.T., Roberts, A.D., and Woodland, D.L. (2007). Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* *204*, 1625–1636.
- Hofmann, M., and Pircher, H. (2011). E-cadherin promotes accumulation of a unique memory CD8 T-cell population in murine salivary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 16741–16746.

- Hösel, M., Broxtermann, M., Janicki, H., Esser, K., Arzberger, S., Hartmann, P., Gillen, S., Kleeff, J., Stabenow, D., Odenthal, M., et al. (2012). Toll-like receptor 2–mediated innate immune response in human nonparenchymal liver cells toward adeno-associated viral vectors. *Hepatology* 55, 287–297.
- Huang, H., Wang, Y.-J., White, A.P., Meng, J.-Z., Liu, G.-R., Liu, S.-L., and Wang, Y.-D. (2009). Salmonella expressing a T-cell epitope from Sendai virus are able to induce anti-infection immunity. *J. Med. Microbiol.* 58, 1236–1242.
- Hurlbut, G.D., Ziegler, R.J., Nietupski, J.B., Foley, J.W., Woodworth, L.A., Meyers, E., Bercury, S.D., Pande, N.N., Souza, D.W., Bree, M.P., et al. (2010). Preexisting Immunity and Low Expression in Primates Highlight Translational Challenges for Liver-directed AAV8-mediated Gene Therapy. *Mol. Ther.* 18, 1983–1994.
- Huster, K.M., Busch, V., Schiemann, M., Linkemann, K., Kerksiek, K.M., Wagner, H., and Busch, D.H. (2004). Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5610–5615.
- Huster, K.M., Koffler, M., Stemberger, C., Schiemann, M., Wagner, H., and Busch, D.H. (2006). Unidirectional development of CD8+ central memory T cells into protective Listeria-specific effector memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 36, 1453–1464.
- Hutnick, N.A., Carnathan, D.G., Dubey, S.A., Cox, K., Kierstead, L., Ratcliffe, S.J., Robertson, M.N., Casimiro, D.R., Ertl, H.C.J., and Betts, M.R. (2009). Baseline Ad5 serostatus does not predict Ad5-HIV vaccine-induced expansion of Ad-specific CD4+ T-cells. *Nat. Med.* 15, 876–878.
- Iijima, N., and Iwasaki, A. (2014). A local macrophage chemokine network sustains protective tissue-resident memory CD4 T cells. *Science* 346, 93–98.
- Iijima, N., Linehan, M.M., Zamora, M., Butkus, D., Dunn, R., Kehry, M.R., Laufer, T.M., and Iwasaki, A. (2008). Dendritic cells and B cells maximize mucosal Th1 memory response to herpes simplex virus. *J. Exp. Med.* 205, 3041–3052.
- Inagaki, K., Fuess, S., Storm, T.A., Gibson, G.A., Mctiernan, C.F., Kay, M.A., and Nakai, H. (2006). Robust Systemic Transduction with AAV9 Vectors in Mice: Efficient Global Cardiac Gene Transfer Superior to That of AAV8. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 14, 45–53.
- Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., et al. (2005). Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* 6, 1236–1244.
- Ito, M., Maruyama, T., Saito, N., Koganei, S., Yamamoto, K., and Matsumoto, N. (2006). Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 203, 289–295.
- Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G., and Schoenberger, S.P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421, 852–856.

- Janssen, E.M., Droin, N.M., Lemmens, E.E., Pinkoski, M.J., Bensinger, S.J., Ehst, B.D., Griffith, T.S., Green, D.R., and Schoenberger, S.P. (2005). CD4⁺ T-cell help controls CD8⁺ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434, 88–93.
- Jaski, B.E., Jessup, M.L., Mancini, D.M., Cappola, T.P., Pauly, D.F., Greenberg, B., Borow, K., Dittrich, H., Zsebo, K.M., and Hajjar, R.J. (2009). Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID Trial), a First-in-Human Phase 1/2 Clinical Trial. *J. Card. Fail.* 15, 171–181.
- Jiang, X., Clark, R.A., Liu, L., Wagers, A.J., Fuhlbrigge, R.C., and Kupper, T.S. (2012). Skin infection generates non-migratory memory CD8⁺ TRM cells providing global skin immunity. *Nature* 483, 227–231.
- Johnson, J.E., Nasar, F., Coleman, J.W., Price, R.E., Javadian, A., Draper, K., Lee, M., Reilly, P.A., Clarke, D.K., Hendry, R.M., et al. (2007). Neurovirulence Properties of Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Vectors in Non-Human Primates. *Virology* 360, 36–49.
- Johnson, P.R., Schnepf, B.C., Connell, M.J., Rohne, D., Robinson, S., Krivulka, G.R., Lord, C.I., Zinn, R., Montefiori, D.C., Letvin, N.L., et al. (2005). Novel Adeno-Associated Virus Vector Vaccine Restricts Replication of Simian Immunodeficiency Virus in Macaques. *J. Virol.* 79, 955–965.
- Johnson, P.R., Schnepf, B.C., Zhang, J., Connell, M.J., Greene, S.M., Yuste, E., Desrosiers, R.C., and Clark, K.R. (2009). Vector-mediated gene transfer engenders long-lived neutralizing activity and protection against SIV infection in monkeys. *Nat. Med.* 15, 901–906.
- Jooss, K., Yang, Y., Fisher, K.J., and Wilson, J.M. (1998). Transduction of Dendritic Cells by DNA Viral Vectors Directs the Immune Response to Transgene Products in Muscle Fibers. *J. Virol.* 72, 4212–4223.
- Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hagman, J., Gapin, L., and Kaech, S.M. (2007). Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8⁺ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* 27, 281–295.
- Joshi, N.S., Cui, W., Dominguez, C.X., Chen, J.H., Hand, T.W., and Kaech, S.M. (2011). Increased Numbers of Preexisting Memory CD8 T Cells and Decreased T-bet Expression Can Restrain Terminal Differentiation of Secondary Effector and Memory CD8 T Cells. *J. Immunol.* 187, 4068–4076.
- Kaech, S.M., and Wherry, E.J. (2007). Heterogeneity and Cell-Fate Decisions in Effector and Memory CD8⁺ T Cell Differentiation during Viral Infection. *Immunity* 27, 393–405.
- Kaech, S.M., Tan, J.T., Wherry, E.J., Konieczny, B.T., Surh, C.D., and Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* 4, 1191–1198.
- Kalia, V., Sarkar, S., Subramaniam, S., Haining, W.N., Smith, K.A., and Ahmed, R. (2010). Prolonged Interleukin-2R α Expression on Virus-Specific CD8⁺ T Cells Favors Terminal-Effector Differentiation In Vivo. *Immunity* 32, 91–103.

- Kashiwakura, Y., Tamayose, K., Iwabuchi, K., Hirai, Y., Shimada, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Watanabe, M., Oshimi, K., and Daida, H. (2005). Hepatocyte Growth Factor Receptor Is a Coreceptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Infection. *J. Virol.* 79, 609–614.
- Kawamoto, S., Shi, Q., Nitta, Y., Miyazaki, J., and Allen, M.D. (2005). Widespread and early myocardial gene expression by adeno-associated virus vector type 6 with a β -actin hybrid promoter. *Mol. Ther.* 11, 980–985.
- Kay, M.A., Manno, C.S., Ragni, M.V., Larson, P.J., Couto, L.B., McClelland, A., Glader, B., Chew, A.J., J, S., Herzog, R.W., et al. (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat. Genet.* 24, 257–261.
- Keswani, S.G., Balaji, S., Le, L., Leung, A., Lim, F.-Y., Habli, M., Jones, H.N., Wilson, J.M., and Crombleholme, T.M. (2012). Pseudotyped adeno-associated viral vector tropism and transduction efficiencies in murine wound healing: Pseudotyped AAV vectors in wound healing. *Wound Repair Regen.* n/a – n/a.
- Kieny, P., Chollet, S., Delalande, P., Le Fort, M., Magot, A., Pereon, Y., and Perrouin Verbe, B. (2013). Evolution of life expectancy of patients with Duchenne muscular dystrophy at AFM Yolaine de Kepper centre between 1981 and 2011. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* 56, 443–454.
- Kilshaw, P.J., and Murant, S.J. (1990). A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur. J. Immunol.* 20, 2201–2207.
- Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A.K., et al. (2008). Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells and CD14+ Dermal Dendritic Cells. *Immunity* 29, 497–510.
- Klechevsky, E., Liu, M., Morita, R., Banchereau, R., Thompson-Snipes, L., Palucka, A.K., Ueno, H., and Banchereau, J. (2009). Understanding human myeloid dendritic cell subsets for the rational design of novel vaccines. *Hum. Immunol.* 70, 281–288.
- Knickelbein, J.E., Khanna, K.M., Yee, M.B., Baty, C.J., Kinchington, P.R., and Hendricks, R.L. (2008). Noncytotoxic Lytic Granule-Mediated CD8+ T Cell Inhibition of HSV-1 Reactivation from Neuronal Latency. *Science* 322, 268–271.
- Kolumam, G.A., Thomas, S., Thompson, L.J., Sprent, J., and Murali-Krishna, K. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J. Exp. Med.* 202, 637–650.
- Kotin, R.M., Siniscalco, M., Samulski, R.J., Zhu, X.D., Hunter, L., Laughlin, C.A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., and Berns, K.I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 2211–2215.
- Koup, R.A., Lamoreaux, L., Zarkowsky, D., Bailer, R.T., King, C.R., Gall, J.G.D., Brough, D.E., Graham, B.S., and Roederer, M. (2009). Replication-Defective Adenovirus Vectors with Multiple Deletions Do Not Induce Measurable Vector-Specific T Cells in Human Trials. *J. Virol.* 83, 6318–6322.

- Kuck, D., Lau, T., Leuchs, B., Kern, A., Müller, M., Gissmann, L., and Kleinschmidt, J.A. (2006). Intranasal Vaccination with Recombinant Adeno-Associated Virus Type 5 against Human Papillomavirus Type 16 L1. *J. Virol.* *80*, 2621–2630.
- Kuhn, A.N., Diken, M., Kreiter, S., Selmi, A., Kowalska, J., Jemielity, J., Darzynkiewicz, E., Huber, C., Türeci, Ö., and Sahin, U. (2010). Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. *Gene Ther.* *17*, 961–971.
- Kurath, G. (2005). Overview of recent DNA vaccine development for fish. *Dev. Biol.* *121*, 201–213.
- Lacombe, M.-H., Hardy, M.-P., Rooney, J., and Labrecque, N. (2005). IL-7 Receptor Expression Levels Do Not Identify CD8+ Memory T Lymphocyte Precursors following Peptide Immunization. *J. Immunol.* *175*, 4400–4407.
- Lai, Y., Yue, Y., Liu, M., Ghosh, A., Engelhardt, J.F., Chamberlain, J.S., and Duan, D. (2005). Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Nat. Biotechnol.* *23*, 1435–1439.
- Laidlaw, B.J., Zhang, N., Marshall, H.D., Staron, M.M., Guan, T., Hu, Y., Cauley, L.S., Craft, J., and Kaech, S.M. (2014). CD4+ T Cell Help Guides Formation of CD103+ Lung-Resident Memory CD8+ T Cells during Influenza Viral Infection. *Immunity* *41*, 633–645.
- Langlet, C., Tamoutounour, S., Henri, S., Luche, H., Ardouin, L., Grégoire, C., Malissen, B., and Guilliams, M. (2012). CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 1751–1760.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843–854.
- Lee, Y.-T., Suarez-Ramirez, J.E., Wu, T., Redman, J.M., Bouchard, K., Hadley, G.A., and Cauley, L.S. (2011). Environmental and Antigen Receptor-Derived Signals Support Sustained Surveillance of the Lungs by Pathogen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *J. Virol.* *85*, 4085–4094.
- Lefrançois, L., Barrett, T.A., Havran, W.L., and Puddington, L. (1994). Developmental expression of the α IEL β 7 integrin on T cell receptor $\gamma\delta$ and T cell receptor $\alpha\beta$ T cells. *Eur. J. Immunol.* *24*, 635–640.
- Lehmann, J., Huehn, J., de la Rosa, M., Maszyrna, F., Kretschmer, U., Krenn, V., Brunner, M., Scheffold, A., and Hamann, A. (2002). Expression of the integrin α E β 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 13031–13036.
- Lewis, A.D., Chen, R., Montefiori, D.C., Johnson, P.R., and Clark, K.R. (2002). Generation of Neutralizing Activity against Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Serum by Antibody Gene Transfer. *J. Virol.* *76*, 8769–8775.

- Li, C., He, Y., Nicolson, S., Hirsch, M., Weinberg, M.S., Zhang, P., Kafri, T., and Samulski, R.J. (2013). Adeno-associated virus capsid antigen presentation is dependent on endosomal escape. *J. Clin. Invest.* *123*, 1390–1401.
- Li, X., Cao, H., Wang, Q., Di, B., Wang, M., Lu, J., Pan, L., Yang, L., Mei, M., Pan, X., et al. (2012). Novel AAV-based genetic vaccines encoding truncated dengue virus envelope proteins elicit humoral immune responses in mice. *Microbes Infect.* *14*, 1000–1007.
- Liao, H., Franck, E., Fréret, M., Adriouch, S., Baba-Amer, Y., Authier, F.-J., Boyer, O., and Gherardi, R.K. (2012). Myoinjury transiently activates muscle antigen-specific CD8⁺ T cells in lymph nodes in a mouse model. *Arthritis Rheum.* *64*, 3441–3451.
- Liao, J.C.F., Gregor, P., Wolchok, J.D., Orlandi, F., Craft, D., Leung, C., Houghton, A.N., and Bergman, P.J. (2006). Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer Immun.* *6*, 8.
- Liard, C., Munier, S., Joulin-Giet, A., Bonduelle, O., Hadam, S., Duffy, D., Vogt, A., Verrier, B., and Combadière, B. (2011). Intradermal immunization triggers epidermal Langerhans cell mobilization required for CD8 T-cell immune responses. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 615–625.
- Lichterfeld, M., Yu, X.G., Waring, M.T., Mui, S.K., Johnston, M.N., Cohen, D., Addo, M.M., Zaunders, J., Alter, G., Pae, E., et al. (2004). HIV-1-specific cytotoxicity is preferentially mediated by a subset of CD8⁺ T cells producing both interferon- γ and tumor necrosis factor- α . *Blood* *104*, 487–494.
- Limberis, M.P., and Wilson, J.M. (2006). Adeno-associated virus serotype 9 vectors transduce murine alveolar and nasal epithelia and can be readministered. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 12993–12998.
- Limberis, M.P., Adam, V.S., Wong, G., Gren, J., Kobasa, D., Ross, T.M., Kobinger, G.P., Tretiakova, A., and Wilson, J.M. (2013). Intranasal Antibody Gene Transfer in Mice and Ferrets Elicits Broad Protection Against Pandemic Influenza. *Sci. Transl. Med.* *5*, 187ra72–ra187ra72.
- Lin, J., Zhi, Y., Mays, L., and Wilson, J.M. (2007a). Vaccines Based on Novel Adeno-Associated Virus Vectors Elicit Aberrant CD8⁺ T-Cell Responses in Mice. *J. Virol.* *81*, 11840–11849.
- Lin, J., Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Bell, P., Somanathan, S., and Wilson, J.M. (2009). A New Genetic Vaccine Platform Based on an Adeno-Associated Virus Isolated from a Rhesus Macaque. *J. Virol.* *83*, 12738–12750.
- Lin, S.-W., Hensley, S.E., Tatsis, N., Lasaro, M.O., and Ertl, H.C.J. (2007b). Recombinant adeno-associated virus vectors induce functionally impaired transgene product-specific CD8⁺ T cells in mice. *J. Clin. Invest.*
- Liu, M.A. (2010). Gene-based vaccines: Recent developments. *Curr. Opin. Mol. Ther.* *12*, 86–93.
- Liu, D.-W., Tsao, Y.-P., Kung, J.T., Ding, Y.-A., Sytwu, H.-K., Xiao, X., and Chen, S.-L. (2000). Recombinant Adeno-Associated Virus Expressing Human Papillomavirus Type 16 E7

Peptide DNA Fused with Heat Shock Protein DNA as a Potential Vaccine for Cervical Cancer. *J. Virol.* *74*, 2888–2894.

Liu, D.-W., Chang, J.-L., Tsao, Y.-P., Huang, C.-W., Kuo, S.-W., and Chen, S.-L. (2005a). Co-vaccination with adeno-associated virus vectors encoding human papillomavirus 16 L1 proteins and adenovirus encoding murine GM-CSF can elicit strong and prolonged neutralizing antibody. *Int. J. Cancer* *113*, 93–100.

Liu, X., Luo, M., Zhang, L.N., Yan, Z., Zak, R., Ding, W., Mansfield, S.G., Mitchell, L.G., and Engelhardt, J.F. (2005b). Spliceosome-Mediated RNA Trans-Splicing with Recombinant Adeno-Associated Virus Partially Restores Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function to Polarized Human Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *Hum. Gene Ther.* *16*, 1116–1123.

Liu, X., Broberg, E., Watanabe, D., Dudek, T., DeLuca, N., and Knipe, D.M. (2009). Genetic Engineering of a Modified Herpes Simplex Virus 1 Vaccine Vector. *Vaccine* *27*, 2760–2767.

Logan, G.J., Wang, L., Zheng, M., Cunningham, S.C., Coppel, R.L., and Alexander, I.E. (2007). AAV vectors encoding malarial antigens stimulate antigen-specific immunity but do not protect from parasite infection. *Vaccine* *25*, 1014–1022.

Loiler, S.A., Conlon, T.J., Song, S., Tang, Q., Warrington, K.H., Agarwal, A., Kapturczak, M., Li, C., Ricordi, C., Atkinson, M.A., et al. (2003). Targeting recombinant adeno-associated virus vectors to enhance gene transfer to pancreatic islets and liver. *Gene Ther.* *10*, 1551–1558.

Lu, Y., and Song, S. (2009). Distinct immune responses to transgene products from rAAV1 and rAAV8 vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 17158–17162.

Lux, K., Goerlitz, N., Schlemminger, S., Perabo, L., Goldnau, D., Endell, J., Leike, K., Kofler, D.M., Finke, S., Hallek, M., et al. (2005). Green Fluorescent Protein-Tagged Adeno-Associated Virus Particles Allow the Study of Cytosolic and Nuclear Trafficking. *J. Virol.* *79*, 11776–11787.

Mackay, L.K., Stock, A.T., Ma, J.Z., Jones, C.M., Kent, S.J., Mueller, S.N., Heath, W.R., Carbone, F.R., and Gebhardt, T. (2012). Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 7037–7042.

Mackay, L.K., Rahimpour, A., Ma, J.Z., Collins, N., Stock, A.T., Hafon, M.-L., Vega-Ramos, J., Lauzurica, P., Mueller, S.N., Stefanovic, T., et al. (2013). The developmental pathway for CD103+CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat. Immunol.* *14*, 1294–1301.

Mackowiak, M., Maki, J., Motes-Kreimeyer, L., Harbin, T., and Van Kampen, K. (1999). Vaccination of wildlife against rabies: successful use of a vectored vaccine obtained by recombinant technology. *Adv. Vet. Med.* *41*, 571–583.

Maguire, A.M., Simonelli, F., Pierce, E.A., Pugh, E.N., Mingozzi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K.A., Testa, F., Surace, E.M., et al. (2008). Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis. *N. Engl. J. Med.* *358*, 2240–2248.

- Malissen, B., Tamoutounour, S., and Henri, S. (2014). The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 417–428.
- Manjunath, N., Shankar, P., Wan, J., Weninger, W., Crowley, M.A., Hieshima, K., Springer, T.A., Fan, X., Shen, H., Lieberman, J., et al. (2001). Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* *108*, 871–878.
- Mann, J.F.S., McKay, P.F., Fiserova, A., Klein, K., Cope, A., Rogers, P., Swales, J., Seaman, M.S., Combadiere, B., and Shattock, R.J. (2014). Enhanced Immunogenicity of an HIV-1 DNA Vaccine Delivered with Electroporation via Combined Intramuscular and Intradermal Routes. *J. Virol.* *88*, 6959–6969.
- Manning, W.C., Paliard, X., Zhou, S., Pat Bland, M., Lee, A.Y., Hong, K., Walker, C.M., Escobedo, J.A., and Dwarki, V. (1997). Genetic immunization with adeno-associated virus vectors expressing herpes simplex virus type 2 glycoproteins B and D. *J. Virol.* *71*, 7960–7962.
- Manno, C.S., Glenn F. Pierce, Arruda, V.R., Pierce, G.F., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J.J.E., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., et al. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* *12*, 342–347.
- Manoj, S., Griebel, P.J., Babiuk, L.A., and Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S. (2004). Modulation of immune responses to bovine herpesvirus-1 in cattle by immunization with a DNA vaccine encoding glycoprotein D as a fusion protein with bovine CD154. *Immunology* *112*, 328–338.
- Marino, M., Scuderi, F., Provenzano, C., and Bartoccioni, E. (2011). Skeletal muscle cells: from local inflammatory response to active immunity. *Gene Ther.* *18*, 109–116.
- Marshall, H.D., and Kaech, S.M. (2013). Generating CD8 T Cell Heterogeneity: Attack of the Clones. *Immunity* *39*, 203–205.
- Martino, A.T., Suzuki, M., Markusic, D.M., Zolotukhin, I., Ryals, R.C., Moghimi, B., Ertl, H.C.J., Muruve, D.A., Lee, B., and Herzog, R.W. (2011). The genome of self-complementary adeno-associated viral vectors increases Toll-like receptor 9-dependent innate immune responses in the liver. *Blood* *117*, 6459–6468.
- Marzo, A.L., Vezys, V., Klonowski, K.D., Lee, S.-J., Muralimohan, G., Moore, M., Tough, D.F., and Lefrançois, L. (2004). Fully Functional Memory CD8 T Cells in the Absence of CD4 T Cells. *J. Immunol.* *173*, 969–975.
- Marzo, A.L., Klonowski, K.D., Bon, A.L., Borrow, P., Tough, D.F., and Lefrançois, L. (2005). Initial T cell frequency dictates memory CD8+ T cell lineage commitment. *Nat. Immunol.* *6*, 793–799.
- Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L., and Lefrançois, L. (2001). Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue. *Science* *291*, 2413–2417.
- Masopust, D., Vezys, V., Wherry, E.J., Barber, D.L., and Ahmed, R. (2006). Cutting Edge: Gut Microenvironment Promotes Differentiation of a Unique Memory CD8 T Cell Population. *J. Immunol.* *176*, 2079–2083.

- Masopust, D., Choo, D., Vezys, V., Wherry, E.J., Duraiswamy, J., Akondy, R., Wang, J., Casey, K.A., Barber, D.L., Kawamura, K.S., et al. (2010). Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J. Exp. Med.* *207*, 553–564.
- Mathers, A.R., Janeloins, B.M., Rubin, J.P., Tkacheva, O.A., Shufesky, W.J., Watkins, S.C., Morelli, A.E., and Larregina, A.T. (2009). Differential Capability of Human Cutaneous Dendritic Cell Subsets to Initiate Th17 Responses. *J. Immunol.* *182*, 921–933.
- Matloubian, M., Concepcion, R.J., and Ahmed, R. (1994). CD4⁺ T cells are required to sustain CD8⁺ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J. Virol.* *68*, 8056–8063.
- 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*, 355–360.
- Mays, L.E., Vandenberghe, L.H., Xiao, R., Bell, P., Nam, H.-J., Agbandje-McKenna, M., and Wilson, J.M. (2009). Adeno-Associated Virus Capsid Structure Drives CD4-Dependent CD8⁺ T Cell Response to Vector Encoded Proteins. *J. Immunol.* *182*, 6051–6060.
- Mays, L.E., Wang, L., Lin, J., Bell, P., Crawford, A., Wherry, E.J., and Wilson, J.M. (2013). AAV8 Induces Tolerance in Murine Muscle as a Result of Poor APC Transduction, T Cell Exhaustion, and Minimal MHC I Upregulation on Target Cells. *Mol. Ther.* *22*, 28–41.
- 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*.
- 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. (2011). Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in the CNS. *Curr. Gene Ther.* *11*, 181–188.
- McCurdy, L.H., Larkin, B.D., Martin, J.E., and Graham, B.S. (2004). Modified Vaccinia Ankara: Potential as an Alternative Smallpox Vaccine. *Clin. Infect. Dis.* *38*, 1749–1753.
- McElrath, M.J., De Rosa, S.C., Moodie, Z., Dubey, S., Kierstead, L., Janes, H., Defawe, O.D., Carter, D.K., Hural, J., Akondy, R., et al. (2008). HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet* *372*, 1894–1905.
- McLachlan, J.B., Catron, D.M., Moon, J.J., and Jenkins, M.K. (2009). Dendritic cell antigen presentation drives simultaneous cytokine production by effector and regulatory T cells in inflamed skin. *Immunity* *30*, 277–288.
- Mehendale, S., van Lunzen, J., Clumeck, N., Rockstroh, J., Vets, E., Johnson, P.R., Anklesaria, P., Barin, B., Boaz, M., Kochhar, S., et al. (2008). A Phase 1 Study to Evaluate the Safety and Immunogenicity of a Recombinant HIV Type 1 Subtype C Adeno-Associated Virus Vaccine. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *24*, 873–880.

- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154–159.
- Mendell, J.R., Rodino-Klapac, L.R., Rosales-Quintero, X., Kota, J., Coley, B.D., Galloway, G., Craenen, J.M., Lewis, S., Malik, V., Shilling, C., et al. (2009). Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores α -sarcoglycan and associated proteins. *Ann. Neurol.* 66, 290–297.
- Mendell, J.R., Campbell, K., Rodino-Klapac, L., Sahenk, Z., Shilling, C., Lewis, S., Bowles, D., Gray, S., Li, C., Galloway, G., et al. (2010a). Dystrophin Immunity in Duchenne’s Muscular Dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 363, 1429–1437.
- Mendell, J.R., Rodino-Klapac, L.R., Rosales, X.Q., Coley, B.D., Galloway, G., Lewis, S., Malik, V., Shilling, C., Byrne, B.J., Conlon, T., et al. (2010b). Sustained alpha-sarcoglycan gene expression following gene transfer in LGMD2D. *Ann. Neurol.* 68, 629–638.
- Merad, M., Ginhoux, F., and Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 935–947.
- Mescher, M.F., Curtsinger, J.M., Agarwal, P., Casey, K.A., Gerner, M., Hammerbeck, C.D., Popescu, F., and Xiao, Z. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* 211, 81–92.
- Mingozzi, F., and High, K. (2011). Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr. Gene Ther.* 11, 321–330.
- Mingozzi, F., and Büning, H. (2015). Adeno-Associated Viral Vectors at the Frontier between Tolerance and Immunity. *Front. Immunol.* 6.
- Mingozzi, F., Maus, M.V., Hui, D.J., Sabatino, D.E., Murphy, S.L., Rasko, J.E.J., Ragni, M.V., Manno, C.S., Sommer, J., Jiang, H., et al. (2007). CD8+ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* 13, 419–422.
- Mingozzi, F., Meulenberg, J.J., Hui, D.J., Basner-Tschakarjan, E., Hasbrouck, N.C., Edmonson, S.A., Hutnick, N.A., Betts, M.R., Kastelein, J.J., Stroes, E.S., et al. (2009). AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood* 114, 2077–2086.
- 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, 375–383.
- Moser, M. (2003). Dendritic Cells in Immunity and Tolerance—Do They Display Opposite Functions? *Immunity* 19, 5–8.
- Mousavi, S.F., Soroosh, P., Takahashi, T., Yoshikai, Y., Shen, H., Lefrançois, L., Borst, J., Sugamura, K., and Ishii, N. (2008). OX40 Costimulatory Signals Potentiate the Memory Commitment of Effector CD8+ T Cells. *J. Immunol.* 181, 5990–6001.
- Mueller, C., Chulay, J.D., Trapnell, B.C., Humphries, M., Carey, B., Sandhaus, R.A., McElvaney, N.G., Messina, L., Tang, Q., Rouhani, F.N., et al. (2013). Human Treg responses

allow sustained recombinant adeno-associated virus-mediated transgene expression. *J. Clin. Invest.* *123*, 5310–5318.

Mullen, A.C., High, F.A., Hutchins, A.S., Lee, H.W., Villarino, A.V., Livingston, D.M., Kung, A.L., Cereb, N., Yao, T.-P., Yang, S.Y., et al. (2001). Role of T-bet in Commitment of TH1 Cells Before IL-12-Dependent Selection. *Science* *292*, 1907–1910.

Muzyczka, N., and Warrington, K.H. (2005). Custom Adeno-Associated Virus Capsids: The Next Generation of Recombinant Vectors with Novel Tropism. *Hum. Gene Ther.* *16*, 408–416.

Nagao, K., Ginhoux, F., Leitner, W.W., Motegi, S.-I., Bennett, C.L., Clausen, B.E., Merad, M., and Udey, M.C. (2009). Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 3312–3317.

Nagaraju, K., Raben, N., Merritt, G., Loeffler, L., Kirk, K., and Plotz, P. (1998). A variety of cytokines and immunologically relevant surface molecules are expressed by normal human skeletal muscle cells under proinflammatory stimuli. *Clin. Exp. Immunol.* *113*, 407–414.

Nakanishi, Y., Lu, B., Gerard, C., and Iwasaki, A. (2009). CD8⁺ T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4⁺ T-cell help. *Nature* *462*, 510–513.

Nathwani, A.C., Tuddenham, E.G., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D.C., Chowdhary, P., Riddell, A., Pie, A.J., and Harrington, C. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2357–2365.

Nestle, F.O., Zheng, X.G., Thompson, C.B., Turka, L.A., and Nickoloff, B.J. (1993). Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J. Immunol.* *151*, 6535–6545.

Nickoloff, B.J., and Turka, L.A. (1994). Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol. Today* *15*, 464–469.

Nickoloff, B.J., Mitra, R.S., Green, J., Zheng, X.G., Shimizu, Y., Thompson, C., and Turka, L.A. (1993). Accessory cell function of keratinocytes for superantigens. Dependence on lymphocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction. *J. Immunol.* *150*, 2148–2159.

Nicolas, J.-F., and Guy, B. (2008). Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert Rev. Vaccines* *7*, 1201–1214.

Nieto, K., and Salvetti, A. (2014). AAV vectors vaccines against infectious diseases. *Microb. Immunol.* *5*, 5.

Nieto, K., Kern, A., Leuchs, B., Gissmann, L., Müller, M., and Kleinschmidt, J.A. (2009). Combined prophylactic and therapeutic intranasal vaccination against human papillomavirus type-16 using different adeno-associated virus serotype vectors. *Antivir. Ther.* *14*, 1125–1137.

- Nieto, K., Stahl-Hennig, C., Leuchs, B., Müller, M., Gissmann, L., and Kleinschmidt, J.A. (2012). Intranasal Vaccination with AAV5 and 9 Vectors Against Human Papillomavirus Type 16 in Rhesus Macaques. *Hum. Gene Ther.* 23, 733–741.
- Nishiyama, A., Ampong, B.N., Ohshima, S., Shin, J.-H., Nakai, H., Imamura, M., Miyagoe-Suzuki, Y., Okada, T., and Takeda, S. (2008). Recombinant Adeno-Associated Virus Type 8-Mediated Extensive Therapeutic Gene Delivery into Skeletal Muscle of α -Sarcoglycan-Deficient Mice. *Hum. Gene Ther.* 19, 719–730.
- Novy, P., Quigley, M., Huang, X., and Yang, Y. (2007). CD4 T Cells Are Required for CD8 T Cell Survival during Both Primary and Memory Recall Responses. *J. Immunol.* 179, 8243–8251.
- Obar, J.J., and Lefrançois, L. (2010). Early Signals during CD8+ T Cell Priming Regulate the Generation of Central Memory Cells. *J. Immunol.* 185, 263–272.
- Obar, J.J., Molloy, M.J., Jellison, E.R., Stoklasek, T.A., Zhang, W., Usherwood, E.J., and Lefrançois, L. (2010). CD4+ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8+ T cells in primary and secondary responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 193–198.
- Obar, J.J., Jellison, E.R., Sheridan, B.S., Blair, D.A., Pham, Q.-M., Zickovich, J.M., and Lefrançois, L. (2011). Pathogen-Induced Inflammatory Environment Controls Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation. *J. Immunol.* 187, 4967–4978.
- O'Brien, K.L., Liu, J., King, S.L., Sun, Y.-H., Schmitz, J.E., Lifton, M.A., Hutnick, N.A., Betts, M.R., Dubey, S.A., Goudsmit, J., et al. (2009). Adenovirus-Specific Immunity Following Immunization with an Ad5 HIV-1 Vaccine Candidate in Humans. *Nat. Med.* 15, 873–875.
- Oh, Y.-K., Harding, C.V., and Swanson, J.A. (1997). The efficiency of antigen delivery from macrophage phagosomes into cytoplasm for MHC class I-restricted antigen presentation. *Vaccine* 15, 511–518.
- Okada, T., Shimazaki, K., Nomoto, T., Matsushita, T., Mizukami, H., Urabe, M., Hanazono, Y., Kume, A., Tobita, K., Ozawa, K., et al. (2002). Adeno-associated viral vector-mediated gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Methods Enzymol.* 346, 378–393.
- Olson, J.A., McDonald-Hyman, C., Jameson, S.C., and Hamilton, S.E. (2013). Effector-like CD8+ T Cells in the Memory Population Mediate Potent Protective Immunity. *Immunity* 38, 1250–1260.
- Otten, G., Schaefer, M., Doe, B., Liu, H., Srivastava, I., Megede, J. zur, O'Hagan, D., Donnelly, J., Widera, G., Rabussay, D., et al. (2004). Enhancement of DNA vaccine potency in rhesus macaques by electroporation. *Vaccine* 22, 2489–2493.
- Ouyang, Q., Wagner, W.M., Voehringer, D., Wikby, A., Klatt, T., Walter, S., Müller, C.A., Pircher, H., and Pawelec, G. (2003). Age-associated accumulation of CMV-specific CD8+ T cells expressing the inhibitory killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). *Exp. Gerontol.* 38, 911–920.

- Pacak, C.A., Mah, C.S., Thattaliyath, B.D., Conlon, T.J., Lewis, M.A., Cloutier, D.E., Zolotukhin, I., Tarantal, A.F., and Byrne, B.J. (2006). Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 9 Leads to Preferential Cardiac Transduction In Vivo. *Circ. Res.* 99, e3–e9.
- Pascolo, S. (2006). Vaccination with messenger RNA. *Methods Mol. Med.* 127, 23–40.
- Patterson, L.J., and Robert-Guroff, M. (2008). Replicating adenovirus vector prime/protein boost strategies for HIV vaccine development. *Expert Opin. Biol. Ther.* 8, 1347–1363.
- Pauls, K., Schön, M., Kubitzka, R.C., Homey, B., Wiesenborn, A., Lehmann, P., Ruzicka, T., Parker, C.M., and Schön, M.P. (2001). Role of Integrin $\alpha E(CD103)\beta 7$ for Tissue-Specific Epidermal Localization of CD8+ T Lymphocytes. *J. Invest. Dermatol.* 117, 569–575.
- Pearce, E.L., and Shen, H. (2007). Generation of CD8 T Cell Memory Is Regulated by IL-12. *J. Immunol.* 179, 2074–2081.
- Pedraza-Alva, G., Mérida, L.B., Burakoff, S.J., and Rosenstein, Y. (1998). T Cell Activation through the CD43 Molecule Leads to Vav Tyrosine Phosphorylation and Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Activation. *J. Biol. Chem.* 273, 14218–14224.
- Penaud-Budloo, M., Le Guiner, C., Nowrouzi, A., Toromanoff, A., Chérel, Y., Chenuaud, P., Schmidt, M., von Kalle, C., Rolling, F., Moullier, P., et al. (2008). Adeno-Associated Virus Vector Genomes Persist as Episomal Chromatin in Primate Muscle. *J. Virol.* 82, 7875–7885.
- Pepper, M., Pagán, A.J., Igyártó, B.Z., Taylor, J.J., and Jenkins, M.K. (2011). Opposing Signals from the Bcl6 Transcription Factor and the Interleukin-2 Receptor Generate T Helper 1 Central and Effector Memory Cells. *Immunity* 35, 583–595.
- Pereira, D.J., McCarty, D.M., and Muzyczka, N. (1997). The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J. Virol.* 71, 1079–1088.
- Pernis, A., Gupta, S., Gollob, K.J., Garfein, E., Coffman, R.L., Schindler, C., and Rothman, P. (1995). Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells. *Science* 269, 245–247.
- Peters, B.S., Jaoko, W., Vardas, E., Panayotakopoulos, G., Fast, P., Schmidt, C., Gilmour, J., Bogoshi, M., Omosa-Manyonyi, G., Dally, L., et al. (2007). Studies of a prophylactic HIV-1 vaccine candidate based on modified vaccinia virus Ankara (MVA) with and without DNA priming: Effects of dosage and route on safety and immunogenicity. *Vaccine* 25, 2120–2127.
- Pfeifer, J.D., Wick, M.J., Roberts, R.L., Findlay, K., Normark, S.J., and Harding, C.V. (1993). Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361, 359–362.
- Pham, N.-L.L., Badovinac, V.P., and Harty, J.T. (2009). A Default Pathway of Memory CD8 T Cell Differentiation after Dendritic Cell Immunization Is Deflected by Encounter with Inflammatory Cytokines during Antigen-Driven Proliferation. *J. Immunol.* 183, 2337–2348.
- Pien, G.C., Basner-Tschakarjan, E., Hui, D.J., Mentlik, A.N., Finn, J.D., Hasbrouck, N.C., Zhou, S., Murphy, S.L., Maus, M.V., Mingozzi, F., et al. (2009). Capsid antigen presentation

- flags human hepatocytes for destruction after transduction by adeno-associated viral vectors. *J. Clin. Invest.* *119*, 1688–1695.
- Pipkin, M.E., Sacks, J.A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M.G., Bevan, M.J., and Rao, A. (2010). Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs that Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells. *Immunity* *32*, 79–90.
- Ploquin, A., Szécsi, J., Mathieu, C., Guillaume, V., Barateau, V., Ong, K.C., Wong, K.T., Cosset, F.-L., Horvat, B., and Salvetti, A. (2013). Protection Against Henipavirus Infection by Use of Recombinant Adeno-Associated Virus–Vector Vaccines. *J. Infect. Dis.* *207*, 469–478.
- Plumlee, C.R., Sheridan, B.S., Cicek, B.B., and Lefrançois, L. (2013). Environmental Cues Dictate the Fate of Individual CD8⁺ T Cells Responding to Infection. *Immunity* *39*, 347–356.
- Plunkett, F.J., Franzese, O., Belaramani, L.L., Fletcher, J.M., Gilmour, K.C., Sharifi, R., Khan, N., Hislop, A.D., Cara, A., Salmon, M., et al. (2005). The impact of telomere erosion on memory CD8⁺ T cells in patients with X-linked lymphoproliferative syndrome. *Mech. Ageing Dev.* *126*, 855–865.
- Podsakoff, G., Wong, K.K., and Chatterjee, S. (1994). Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. *J. Virol.* *68*, 5656–5666.
- van der Poel, C.E., Spaapen, R.M., van de Winkel, J.G.J., and Leusen, J.H.W. (2011). Functional Characteristics of the High Affinity IgG Receptor, FcγRI. *J. Immunol.* *186*, 2699–2704.
- Ponnazhagan, S., Mahendra, G., Kumar, S., Thompson, J.A., and Castillas, Jr., M. (2002). Conjugate-Based Targeting of Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 Vectors by Using Avidin-Linked Ligands. *J. Virol.* *76*, 12900–12907.
- Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V., and Srivastava, A. (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat. Med.* *5*, 71–77.
- Quirk, E.K., Mogg, R., Brown, D.D., Lally, M.A., Mehrotra, D.V., DiNubile, M.J., and Robertson, M.N. (2008). HIV Seroconversion without Infection after Receipt of Adenovirus-Vectorized HIV Type 1 Vaccine. *Clin. Infect. Dis.* *47*, 1593–1599.
- 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.
- Rabinowitz, J.E., Bowles, D.E., Faust, S.M., Ledford, J.G., Cunningham, S.E., and Samulski, R.J. (2004). Cross-Dressing the Virion: the Transcapsidation of Adeno-Associated Virus Serotypes Functionally Defines Subgroups. *J. Virol.* *78*, 4421–4432.
- Ramos, H.J., Davis, A.M., Cole, A.G., Schatzle, J.D., Forman, J., and Farrar, J.D. (2009). Reciprocal responsiveness to interleukin-12 and interferon-α specifies human CD8⁺ effector versus central memory T-cell fates. *Blood* *113*, 5516–5525.

- Rao, S.S., Gomez, P., Mascola, J.R., Dang, V., Krivulka, G.R., Yu, F., Lord, C.I., Shen, L., Bailer, R., Nabel, G.J., et al. (2006). Comparative evaluation of three different intramuscular delivery methods for DNA immunization in a nonhuman primate animal model. *Vaccine* 24, 367–373.
- Redmond, W.L., and Sherman, L.A. (2005). Peripheral Tolerance of CD8 T Lymphocytes. *Immunity* 22, 275–284.
- Reich, S. j., Auricchio, A., Hildinger, M., Glover, E., Maguire, A. m., Wilson, J. m., and Bennett, J. (2003). Efficient Trans-Splicing in the Retina Expands the Utility of Adeno-Associated Virus as a Vector for Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* 14, 37–44.
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Premisri, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E., et al. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* 361, 2209–2220.
- Rice, J., Ottensmeier, C.H., and Stevenson, F.K. (2008). DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 108–120.
- Robert-Guroff, M. (2007). Replicating and Non-replicating Viral Vectors for Vaccine Development. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 546–556.
- Roberts, A.D., and Woodland, D.L. (2004). Cutting Edge: Effector Memory CD8+ T Cells Play a Prominent Role in Recall Responses to Secondary Viral Infection in the Lung. *J. Immunol.* 172, 6533–6537.
- Rodríguez, A., Mintardjo, R., Tax, D., Gillissen, G., Custers, J., Pau, M.G., Klap, J., Santra, S., Balachandran, H., Letvin, N.L., et al. (2009). Evaluation of a prime-boost vaccine schedule with distinct adenovirus vectors against malaria in rhesus monkeys. *Vaccine* 27, 6226–6233.
- Rogers, G.L., Martino, A.T., Aslanidi, G.V., Jayandharan, G.R., Srivastava, A., and Herzog, R.W. (2011). Innate Immune Responses to AAV Vectors. *Front. Microbiol.* 2.
- Rottembourg, D., Filippi, C.M., Bresson, D., Ehrhardt, K., Estes, E.A., Oldham, J.E., and Herrath, M.G. von (2010). Essential Role for TLR9 in Prime but Not Prime-Boost Plasmid DNA Vaccination To Activate Dendritic Cells and Protect from Lethal Viral Infection. *J. Immunol.* 184, 7100–7107.
- Rottinghaus, S.T., Poland, G.A., Jacobson, R.M., Barr, L.J., and Roy, M.J. (2003). Hepatitis B DNA vaccine induces protective antibody responses in human non-responders to conventional vaccination. *Vaccine* 21, 4604–4608.
- Rutishauser, R.L., Martins, G.A., Kalachikov, S., Chandele, A., Parish, I.A., Meffre, E., Jacob, J., Calame, K., and Kaech, S.M. (2009). Transcriptional Repressor Blimp-1 Promotes CD8+ T Cell Terminal Differentiation and Represses the Acquisition of Central Memory T Cell Properties. *Immunity* 31, 296–308.
- Rybniker, J., Nowag, A., Janicki, H., Demant, K., Hartmann, P., and Büning, H. (2012). Incorporation of Antigens into Viral Capsids Augments Immunogenicity of Adeno-Associated Virus Vector-Based Vaccines. *J. Virol.* 86, 13800–13804.

Sallach, J., Di Pasquale, G., Larcher, F., Niehoff, N., Rübsam, M., Huber, A., Chiorini, J., Almarza, D., Eming, S.A., Ulus, H., et al. (2014). Tropism-modified AAV vectors overcome barriers to successful cutaneous therapy. *Mol. Ther.*

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Exploring pathways for memory T cell generation. *J. Clin. Invest.* *108*, 805–806.

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* *401*, 708–712.

Samaranch, L., Salegio, E.A., San Sebastian, W., Kells, A.P., Bringas, J.R., Forsayeth, J., and Bankiewicz, K.S. (2013). Strong Cortical and Spinal Cord Transduction After AAV7 and AAV9 Delivery into the Cerebrospinal Fluid of Nonhuman Primates. *Hum. Gene Ther.* *24*, 526–532.

Samulski, R.J., Berns, K.I., Tan, M., and Muzyczka, N. (1982). Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 2077–2081.

Samulski, R.J., Chang, L.S., and Shenk, T. (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J. Virol.* *63*, 3822–3828.

Sandberg, J.K., Fast, N.M., and Nixon, D.F. (2001). Functional Heterogeneity of Cytokines and Cytolytic Effector Molecules in Human CD8⁺ T Lymphocytes. *J. Immunol.* *167*, 181–187.

Santra, S., Sun, Y., Koriath-Schmitz, B., Fitzgerald, J., Charbonneau, C., Santos, G., Seaman, M.S., Ratcliffe, S.J., Montefiori, D.C., Nabel, G.J., et al. (2009). Heterologous Prime/Boost Immunizations of Rhesus Monkeys Using Chimpanzee Adenovirus Vectors. *Vaccine* *27*, 5837–5845.

Sarukhan, A., Soudais, C., Danos, O., and Jooss, K. (2001a). Factors influencing cross-presentation of non-self antigens expressed from recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Gene Med.* *3*, 260–270.

Sarukhan, A., Camugli, S., Gjata, B., von Boehmer, H., Danos, O., and Jooss, K. (2001b). Successful Interference with Cellular Immune Responses to Immunogenic Proteins Encoded by Recombinant Viral Vectors. *J. Virol.* *75*, 269–277.

Sato, A., Suwanto, A., Okabe, M., Sato, S., Nochi, T., Imai, T., Koyanagi, N., Kunisawa, J., Kawaguchi, Y., and Kiyono, H. (2014). Vaginal Memory T Cells Induced by Intranasal Vaccination Are Critical for Protective T Cell Recruitment and Prevention of Genital HSV-2 Disease. *J. Virol.* *88*, 13699–13708.

Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M.-D., Silverman, G.J., Lotz, M., Carson, D.A., and Raz, E. (1996). Immunostimulatory DNA Sequences Necessary for Effective Intradermal Gene Immunization. *Science* *273*, 352–354.

Scheel, B., Teufel, R., Probst, J., Carralot, J.-P., Geginat, J., Radsak, M., Jarrossay, D., Wagner, H., Jung, G., Rammensee, H.-G., et al. (2005). Toll-like receptor-dependent

activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *Eur. J. Immunol.* 35, 1557–1566.

Schenkel, J.M., Fraser, K.A., Beura, L.K., Pauken, K.E., Vezys, V., and Masopust, D. (2014). Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science* 346, 98–101.

Schirmbeck, R., Wild, J., and Reimann, J. (1998). Similar as well as distinct MHC class I-binding peptides are generated by exogenous and endogenous processing of hepatitis B virus surface antigen. *Eur. J. Immunol.* 28, 4149–4161.

Schlehofer, J.R., Ehrbar, M., and Hausen, H.Z. (1986). Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus. *Virology* 152, 110–117.

Schlitzer, A., and Ginhoux, F. (2014). Organization of the mouse and human DC network. *Curr. Opin. Immunol.* 26, 90–99.

Schluns, K.S., and Lefrançois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 269–279.

Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C., and Lefrançois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 1, 426–432.

Schober, S.L., Kuo, C.T., Schluns, K.S., Lefrancois, L., Leiden, J.M., and Jameson, S.C. (1999). Expression of the Transcription Factor Lung Krüppel-Like Factor Is Regulated by Cytokines and Correlates with Survival of Memory T Cells In Vitro and In Vivo. *J. Immunol.* 163, 3662–3667.

Schwab, S.R., and Cyster, J.G. (2007). Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat. Immunol.* 8, 1295–1301.

Schwartzkopff, S., Gründemann, C., Schweier, O., Rosshart, S., Karjalainen, K.E., Becker, K.-F., and Pircher, H. (2007). Tumor-Associated E-Cadherin Mutations Affect Binding to the Killer Cell Lectin-Like Receptor G1 in Humans. *J. Immunol.* 179, 1022–1029.

Seder, R.A., Darrah, P.A., and Roederer, M. (2008). T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 247–258.

Seneschal, J., Clark, R.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C.M., and Kupper, T.S. (2012). Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells. *Immunity* 36, 873–884.

Seneschal, J., Jiang, X., and Kupper, T.S. (2014). Langerin+ Dermal DC, but not Langerhans cells, are required for effective CD8 mediated immune responses after skin scarification with Vaccinia Virus (VACV). *J. Invest. Dermatol.* 134, 686–694.

Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* 7, 311–317.

- Serrador, J.M., Nieto, M., Alonso-Lebrero, J.L., del Pozo, M.A., Calvo, J., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Lozano, F., González-Amaro, R., Sánchez-Mateos, P., et al. (1998). CD43 Interacts With Moesin and Ezrin and Regulates Its Redistribution to the Uropods of T Lymphocytes at the Cell-Cell Contacts. *Blood* 91, 4632–4644.
- Shedlock, D.J., and Shen, H. (2003). Requirement for CD4 T Cell Help in Generating Functional CD8 T Cell Memory. *Science* 300, 337–339.
- Shen, X., Wong, S.B.J., Buck, C.B., Zhang, J., and Siliciano, R.F. (2002). Direct Priming and Cross-Priming Contribute Differentially to the Induction of CD8+ CTL Following Exposure to Vaccinia Virus Via Different Routes. *J. Immunol.* 169, 4222–4229.
- Sheridan, B.S., Pham, Q.-M., Lee, Y.-T., Cauley, L.S., Puddington, L., and Lefrançois, L. (2014). Oral Infection Drives a Distinct Population of Intestinal Resident Memory CD8+ T Cells with Enhanced Protective Function. *Immunity* 40, 747–757.
- Shin, H., and Iwasaki, A. (2012). A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature* 491, 463–467.
- Shiow, L.R., Rosen, D.B., Brdičková, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L.L., Cyster, J.G., and Matloubian, M. (2006). CD69 acts downstream of interferon- α/β to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* 440, 540–544.
- Sipo, I., Knauf, M., Fechner, H., Poller, W., Planz, O., Kurth, R., and Norley, S. (2011). Vaccine protection against lethal homologous and heterologous challenge using recombinant AAV vectors expressing codon-optimized genes from pandemic swine origin influenza virus (SOIV). *Vaccine* 29, 1690–1699.
- Skaricic, D., Traube, C., De, B., Joh, J., Boyer, J., Crystal, R.G., and Worgall, S. (2008). Genetic delivery of an anti-RSV antibody to protect against pulmonary infection with RSV. *Virology* 378, 79–85.
- Skon, C.N., Lee, J.-Y., Anderson, K.G., Masopust, D., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2013). Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* 14, 1285–1293.
- Spies, B., Hochrein, H., Vabulas, M., Huster, K., Busch, D.H., Schmitz, F., Heit, A., and Wagner, H. (2003). Vaccination with Plasmid DNA Activates Dendritic Cells via Toll-Like Receptor 9 (TLR9) but Functions in TLR9-Deficient Mice. *J. Immunol.* 171, 5908–5912.
- Spring, F.A., Dalchau, R., Daniels, G.L., Mallinson, G., Judson, P.A., Parsons, S.F., Fabre, J.W., and Anstee, D.J. (1988). The Ina and Inb blood group antigens are located on a glycoprotein of 80,000 MW (the CDw44 glycoprotein) whose expression is influenced by the In(Lu) gene. *Immunology* 64, 37–43.
- Srivastava, A., Lusby, E.W., and Berns, K.I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* 45, 555–564.
- Steinert, E.M., Schenkel, J.M., Fraser, K.A., Beura, L.K., Manlove, L.S., Igyártó, B.Z., Southern, P.J., and Masopust, D. (2015). Quantifying Memory CD8 T Cells Reveals Regionalization of Immunosurveillance. *Cell* 161, 737–749.

- Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2002). Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 351–358.
- Stelekati, E., Shin, H., Doering, T.A., Dolfi, D.V., Ziegler, C.G., Beiting, D.P., Dawson, L., Liboon, J., Wolski, D., Ali, M.-A.A., et al. (2014). Bystander Chronic Infection Negatively Impacts Development of CD8⁺ T Cell Memory. *Immunity* 40, 801–813.
- Sudres, M., Ciré, S., Vasseur, V., Brault, L., Da Rocha, S., Boisgérault, F., Le Bec, C., Gross, D.A., Blouin, V., Ryffel, B., et al. (2012). MyD88 Signaling in B Cells Regulates the Production of Th1-dependent Antibodies to AAV. *Mol. Ther.* 20, 1571–1581.
- Summerford, C., and Samulski, R.J. (1998). Membrane-Associated Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Virions. *J. Virol.* 72, 1438–1445.
- Summerford, C., Bartlett, J.S., and Samulski, R.J. (1999). α V β 5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat. Med.* 5, 78–82.
- Sun, J.C., and Bevan, M.J. (2003). Defective CD8 T Cell Memory Following Acute Infection Without CD4 T Cell Help. *Science* 300, 339–342.
- Sun, J.C., Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2004). CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection. *Nat. Immunol.* 5, 927–933.
- Sun, Y., Santra, S., Schmitz, J.E., Roederer, M., and Letvin, N.L. (2008). Magnitude and Quality of Vaccine-Elicited T-Cell Responses in the Control of Immunodeficiency Virus Replication in Rhesus Monkeys. *J. Virol.* 82, 8812–8819.
- Tan, W.G., Jin, H.-T., West, E.E., Penaloza-MacMaster, P., Wieland, A., Zilliox, M.J., McElrath, M.J., Barouch, D.H., and Ahmed, R. (2012). Comparative Analysis of Simian Immunodeficiency Virus Gag-Specific Effector and Memory CD8⁺ T Cells Induced by Different Adenovirus Vectors. *J. Virol.* 87, 1359–1372.
- Tang, V.A., and Rosenthal, K.L. (2010). Intravaginal infection with herpes simplex virus type-2 (HSV-2) generates a functional effector memory T cell population that persists in the murine genital tract. *J. Reprod. Immunol.* 87, 39–44.
- Tateyama, M., Fujihara, K., and Itoyama, Y. (2011). Dendritic cells in muscle lesions of sarcoidosis. *Hum. Pathol.* 42, 340–346.
- Tatsis, N., Lasaro, M.O., Lin, S.-W., Xiang, Z.Q., Zhou, D., DiMenna, L., Li, H., Bian, A., Abdulla, S., Li, Y., et al. (2009). Adenovirus vector-induced immune responses in nonhuman primates: responses to prime boost regimens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 6587–6599.
- Tejaro, J.R., Turner, D., Pham, Q., Wherry, E.J., Lefrançois, L., and Farber, D.L. (2011). Cutting Edge: Tissue-Retentive Lung Memory CD4 T Cells Mediate Optimal Protection to Respiratory Virus Infection. *J. Immunol.* 187, 5510–5514.

Tessmer, M.S., Fugere, C., Stevenaert, F., Naidenko, O.V., Chong, H.J., Leclercq, G., and Brossay, L. (2007). KLRG1 binds cadherins and preferentially associates with SHIP-1. *Int. Immunol.* *19*, 391–400.

Teunissen, M.B.M., Haniffa, M., and Collin, M.P. (2012). Insight into the immunobiology of human skin and functional specialization of skin dendritic cell subsets to innovate intradermal vaccination design. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *351*, 25–76.

Thacker, E.E., Timares, L., and Matthews, Q.L. (2009). Strategies to overcome host immunity to adenovirus vectors in vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* *8*, 761–777.

Thimme, R., Appay, V., Koschella, M., Panther, E., Roth, E., Hislop, A.D., Rickinson, A.B., Rowland-Jones, S.L., Blum, H.E., and Pircher, H. (2005). Increased Expression of the NK Cell Receptor KLRG1 by Virus-Specific CD8 T Cells during Persistent Antigen Stimulation. *J. Virol.* *79*, 12112–12116.

Thomson, B.J., Weindler, F.W., Gray, D., Schwaab, V., and Heilbronn, R. (1994). Human Herpesvirus 6 (HHV-6) Is a Helper Virus for Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep Gene Homologue in HHV-6 Can Mediate AAV-2 DNA Replication and Regulate Gene Expression. *Virology* *204*, 304–311.

Tudor, D., Dubuquoy, C., Gaboriau, V., Lefèvre, F., Charley, B., and Riffault, S. (2005). TLR9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines. *Vaccine* *23*, 1258–1264.

Turell, M.J., Bunning, M., Ludwig, G.V., Ortman, B., Chang, J., Speaker, T., Spielman, A., McLean, R., Komar, N., Gates, R., et al. (2003). DNA Vaccine for West Nile Virus Infection in Fish Crows (*Corvus ossifragus*). *Emerg. Infect. Dis.* *9*, 1077–1081.

Ulmer, J.B., Wahren, B., and Liu, M.A. (2009). DNA Vaccines: Recent Technological and Clinical Advances. *Discov. Med.* *6*, 109–112.

Unsoeld, H., Krautwald, S., Voehringer, D., Kunzendorf, U., and Pircher, H. (2002). Cutting Edge: CCR7+ and CCR7– Memory T Cells Do Not Differ in Immediate Effector Cell Function. *J. Immunol.* *169*, 638–641.

Vandendriessche, T., Thorrez, L., Acosta-Sanchez, A., Petrus, I., Wang, L., Ma, L., De Waele, L., Iwasaki, Y., Gillijns, V., Wilson, J.M., et al. (2007). Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy. *J. Thromb. Haemost.* *5*, 16–24.

Vardas, E., Kaleebu, P., Bekker, L.-G., Hoosen, A., Chomba, E., Johnson, P.R., Anklesaria, P., Birungi, J., Barin, B., Boaz, M., et al. (2010). A Phase 2 Study to Evaluate the Safety and Immunogenicity of a Recombinant HIV Type 1 Vaccine Based on Adeno-Associated Virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *26*, 933–942.

Vasan, S., Schlesinger, S.J., Chen, Z., Hurley, A., Lombardo, A., Than, S., Adesanya, P., Bunce, C., Boaz, M., Boyle, R., et al. (2010). Phase 1 Safety and Immunogenicity Evaluation of ADMVA, a Multigenic, Modified Vaccinia Ankara-HIV-1 B'/C Candidate Vaccine. *PLoS ONE* *5*.

- Veron, P., Leborgne, C., Monteilhet, V., Boutin, S., Martin, S., Moullier, P., and Masurier, C. (2012). Humoral and Cellular Capsid-Specific Immune Responses to Adeno-Associated Virus Type 1 in Randomized Healthy Donors. *J. Immunol.* *188*, 6418–6424.
- Voehringer, D., Blaser, C., Brawand, P., Raulet, D.H., Hanke, T., and Pircher, H. (2001). Viral Infections Induce Abundant Numbers of Senescent CD8 T Cells. *J. Immunol.* *167*, 4838–4843.
- Voehringer, D., Koschella, M., and Pircher, H. (2002). Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1). *Blood* *100*, 3698–3702.
- Wagner, H. (2002). Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* *5*, 62–69.
- Wakim, L.M., Waithman, J., van Rooijen, N., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2008). Dendritic Cell-Induced Memory T Cell Activation in Nonlymphoid Tissues. *Science* *319*, 198–202.
- Wakim, L.M., Woodward-Davis, A., and Bevan, M.J. (2010). Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 17872–17879.
- Walz, C., Deprez, A., Dupressoir, T., Dürst, M., Rabreau, M., and Schlehofer, J.R. (1997). Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *J. Gen. Virol.* *78* (Pt 6), 1441–1452.
- Wang, A.Y., Peng, P.D., Ehrhardt, A., Storm, T.A., and Kay, M.A. (2004). Comparison of Adenoviral and Adeno-Associated Viral Vectors for Pancreatic Gene Delivery In Vivo. *Hum. Gene Ther.* *15*, 405–413.
- Wang, L., Dobrzynski, E., Schlachterman, A., Cao, O., and Herzog, R.W. (2005a). Systemic protein delivery by muscle-gene transfer is limited by a local immune response. *Blood* *105*, 4226–4234.
- Wang, L., Calcedo, R., Bell, P., Lin, J., Grant, R.L., Siegel, D.L., and Wilson, J.M. (2011). Impact of Pre-Existing Immunity on Gene Transfer to Nonhuman Primate Liver with Adeno-Associated Virus 8 Vectors. *Hum. Gene Ther.* *22*, 1389–1401.
- Wang, S., Farfan-Arribas, D.J., Shen, S., Chou, T.W., Hirsch, A., He, F., and Lu, S. (2006). Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine* *24*, 4531–4540.
- Wang, Z., Ma, H.-I., Li, J., Sun, L., Zhang, J., and Xiao, X. (2003). Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther.* *10*, 2105–2111.
- Wang, Z., Zhu, T., Qiao, C., Zhou, L., Wang, B., Zhang, J., Chen, C., Li, J., and Xiao, X. (2005b). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat. Biotechnol.* *23*, 321–328.

- Wang, Z., Storb, R., Lee, D., Kushmerick, M.J., Chu, B., Berger, C., Arnett, A., Allen, J., Chamberlain, J.S., Riddell, S.R., et al. (2010). Immune Responses to AAV in Canine Muscle Monitored by Cellular Assays and Noninvasive Imaging. *Mol. Ther.* *18*, 617–624.
- Warrington, K.H., Gorbatyuk, O.S., Harrison, J.K., Opie, S.R., Zolotukhin, S., and Muzyczka, N. (2004). Adeno-Associated Virus Type 2 VP2 Capsid Protein Is Nonessential and Can Tolerate Large Peptide Insertions at Its N Terminus. *J. Virol.* *78*, 6595–6609.
- Way, S.S., Havenar-Daughton, C., Kolumam, G.A., Orgun, N.N., and Murali-Krishna, K. (2007). IL-12 and Type-I IFN Synergize for IFN- γ Production by CD4 T Cells, Whereas Neither Are Required for IFN- γ Production by CD8 T Cells after *Listeria monocytogenes* Infection. *J. Immunol.* *178*, 4498–4505.
- Weaver, E.A., Nehete, P.N., Buchl, S.S., Senac, J.S., Palmer, D., Ng, P., Sastry, K.J., and Barry, M.A. (2009). Comparison of Replication-Competent, First Generation, and Helper-Dependent Adenoviral Vaccines. *PLoS ONE* *4*.
- Wee, E.G.-T., Patel, S., McMichael, A.J., and Hanke, T. (2002). A DNA/MVA-based candidate human immunodeficiency virus vaccine for Kenya induces multi-specific T cell responses in rhesus macaques. *J. Gen. Virol.* *83*, 75–80.
- Weide, B., Carralot, J.-P., Reese, A., Scheel, B., Eigentler, T.K., Hoerr, I., Rammensee, H.-G., Garbe, C., and Pascolo, S. (2008). Results of the first phase I/II clinical vaccination trial with direct injection of mRNA. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* *31*, 180–188.
- Weide, B., Pascolo, S., Scheel, B., Derhovanessian, E., Pflugfelder, A., Eigentler, T.K., Pawelec, G., Hoerr, I., Rammensee, H.-G., and Garbe, C. (2009). Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* *32*, 498–507.
- Weiss, R., Scheibelhofer, S., Roesler, E., Ferreira, F., and Thalhamer, J. (2010). Prophylactic mRNA vaccination against allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* *10*, 567–574.
- Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* *12*, 492–499.
- Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2004). Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. *J. Virol.* *78*, 5535–5545.
- Wherry, E.J., Teichgräber, V., Becker, T.C., Masopust, D., Kaech, S.M., Antia, R., von Andrian, U.H., and Ahmed, R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat. Immunol.* *4*, 225–234.
- Wherry, E.J., Barber, D.L., Kaech, S.M., Blattman, J.N., and Ahmed, R. (2004). Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16004–16009.
- Whitmire, J.K., Tan, J.T., and Whitton, J.L. (2005). Interferon- γ acts directly on CD8⁺ T cells to increase their abundance during virus infection. *J. Exp. Med.* *201*, 1053–1059.
- Wiendl, H., Hohlfeld, R., and Kieseier, B.C. (2005). Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. *Trends Immunol.* *26*, 373–380.

- 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*, 171–182.
- Wu, K., Meyer, E.M., Bennett, J.A., Meyers, C.A., Hughes, J.A., and King, M.A. (2005). AAV2/5-mediated NGF gene delivery protects septal cholinergic neurons following axotomy. *Brain Res.* *1061*, 107–113.
- Wu, T., Töpfer, K., Lin, S.-W., Li, H., Bian, A., Zhou, X.Y., High, K.A., and Ertl, H.C. (2012). Self-complementary AAVs Induce More Potent Transgene Product-specific Immune Responses Compared to a Single-stranded Genome. *Mol. Ther.* *20*, 572–579.
- Wu, T., Hu, Y., Lee, Y.-T., Bouchard, K.R., Benechet, A., Khanna, K., and Cauley, L.S. (2014). Lung-resident memory CD8 T cells (TRM) are indispensable for optimal cross-protection against pulmonary virus infection. *J. Leukoc. Biol.* *95*, 215–224.
- Wu, Z., Asokan, A., and Samulski, R.J. (2006). Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol. Ther.* *14*, 316–327.
- Xiang, S.D., Selomulya, C., Ho, J., Apostolopoulos, V., and Plebanski, M. (2010). Delivery of DNA vaccines: an overview on the use of biodegradable polymeric and magnetic nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* *2*, 205–218.
- Xiao, X., Li, J., and Samulski, R.J. (1998). Production of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in the Absence of Helper Adenovirus. *J. Virol.* *72*, 2224–2232.
- Xin, K.-Q., Urabe, M., Yang, J., Nomiya, K., Mizukami, H., Hamajima, K., Nomiya, H., Saito, T., Imai, M., Monahan, J., et al. (2001). A Novel Recombinant Adeno-Associated Virus Vaccine Induces a Long-Term Humoral Immune Response to Human Immunodeficiency Virus. *Hum. Gene Ther.* *12*, 1047–1061.
- Xin, K.-Q., Ooki, T., Mizukami, H., Hamajima, K., Okudela, K., Hashimoto, K., Kojima, Y., Jounai, N., Kumamoto, Y., Sasaki, S., et al. (2002). Oral Administration of Recombinant Adeno-Associated Virus Elicits Human Immunodeficiency Virus-Specific Immune Responses. *Hum. Gene Ther.* *13*, 1571–1581.
- 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*, 11899–11910.
- Xu, R., Johnson, A.J., Liggitt, D., and Bevan, M.J. (2004). Cellular and Humoral Immunity against Vaccinia Virus Infection of Mice. *J. Immunol.* *172*, 6265–6271.
- Yan, Z., Zhang, Y., Duan, D., and Engelhardt, J.F. (2000). Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 6716–6721.
- 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.
- Yang, Q., Mamounas, M., Yu, G., Kennedy, S., Leaker, B., Merson, J., Wong-Staal, F., Yu, M., and Barber, J.R. (1998). Development of Novel Cell Surface CD34-Targeted Recombinant Adenoassociated Virus Vectors for Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* *9*, 1929–1937.
- Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1998). Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Proteins Bind to a Positively Charged Amino Acid Cluster in the Juxta-Membrane Cytoplasmic Domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J. Cell Biol.* *140*, 885–895.
- Zaiss, A.K., Cotter, M.J., White, L.R., Clark, S.A., Wong, N.C.W., Holers, V.M., Bartlett, J.S., and Muruve, D.A. (2008). Complement Is an Essential Component of the Immune Response to Adeno-Associated Virus Vectors. *J. Virol.* *82*, 2727–2740.
- Zhang, N., and Bevan, M.J. (2013). Transforming Growth Factor- β Signaling Controls the Formation and Maintenance of Gut-Resident Memory T Cells by Regulating Migration and Retention. *Immunity* *39*, 687–696.
- 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.
- Zhou, L., Zhu, T., Ye, X., Yang, L., Wang, B., Liang, X., Lu, L., Tsao, Y.-P., Chen, S.-L., Li, J., et al. (2009). Long-Term Protection Against Human Papillomavirus E7-Positive Tumor by a Single Vaccination of Adeno-Associated Virus Vectors Encoding a Fusion Protein of Inactivated E7 of Human Papillomavirus 16/18 and Heat Shock Protein 70. *Hum. Gene Ther.* *21*, 109–119.
- Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y. (2007). Innate Immune Response to Adenoviral Vectors Is Mediated by both Toll-Like Receptor-Dependent and -Independent Pathways. *J. Virol.* *81*, 3170–3180.
- Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y. (2009). The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 2388–2398.
- Ziegler, S.F., Ramsdell, F., and Alderson, M.R. (1994). The activation antigen CD69. *STEM CELLS* *12*, 456–465.

ANNEXES

Annexe 1

Figure 11 : Exemples de vecteurs vaccinaux utilisés.

Vecteurs viraux :

- **VSV** (Boudreau et al., 2009)
- **Herpès** (Liu et al., 2009)
- **Poxvirus** (Hanke et al., 2002a, 2002b; Mackowiak et al., 1999; McCurdy et al., 2004; Peters et al., 2007; Rerks-Ngarm et al., 2009; Vasan et al., 2010; Wee et al., 2002)
- **Adénovirus** (Benlahrech et al., 2009; Buchbinder et al., 2008; Casimiro et al., 2003; Gabitzsch et al., 2009; Gómez-Román et al., 2006; Harro et al., 2009; Hutnick et al., 2009; Koup et al., 2009; McElrath et al., 2008; O'Brien et al., 2009; Patterson and Robert-Guroff, 2008; Quirk et al., 2008; Robert-Guroff, 2007; Rodríguez et al., 2009; Santra et al., 2009; Tatsis et al., 2009; Thacker et al., 2009; Weaver et al., 2009)

Vecteurs bactériens :

- **Salmonelles** (Chin'ombe et al., 2009; Fouts et al., 1995a, 1995b; Gahan et al., 2009; Huang et al., 2009)
- **Shigelles** (Fennelly et al., 1999)
- **Mycobactéries** (Ferrari et al., 2000)

Vecteurs dérivés d'acides nucléiques :

- **ADN plasmidique** (Babiuk et al., 2004; Chiarella et al., 2010; DeLong et al., 2009; Denis-Mize et al., 2003; Donnelly et al., 1995; Gerdts et al., 2004; Manoj et al., 2004; Otten et al., 2004; Rao et al., 2006; Rottembourg et al., 2010; Rottinghaus et al., 2003; Sato et al., 1996; Spies et al., 2003; Tudor et al., 2005; Wang et al., 2006; Xiang et al., 2010)
- **ARN** (Kuhn et al., 2010; Pascolo, 2006; Scheel et al., 2005; Weide et al., 2008, 2009; Weiss et al., 2010)

Annexe 2

Figure 16 : Représentation des organes préférentiellement ciblés par les différents sérotypes d'AAV.

Nature du tissu	Efficacité du sérotype	Réf.
Neurone et cellule gliale	AAV9, AAV7 > AAV8 > AAV5 > AAV2, AAV1	[1, 2, 3]
Glioblastome	AAV8, AAV7 > AAV6 > AAV2 > AAV5	[3]
Tissu cardiaque	AAV9 > AAV8 > AAV1, AAV6 > AAV2	[4, 5, 6, 7]
Muscle (systémique)	AAV8	[8, 9]
Muscle (local)	AAV1, AAV6	[8, 10, 11, 12]
Foie (hépatocyte)	AAV9, AAV8	[13]
Pancréas	AAV8, AAV1	[14, 15]
Rétine	AAV8, AAV5 > AAV4 > AAV1, AAV2	[16, 17, 18]
Cellule dendritique	AAV6	[19]
Cellule souche hématopoïétique	AAV1	[20]
Fibroblaste	AAV1, AAV6 > AAV2	[21]

Tableau 1 : Evaluation des efficacités des sérotypes d'AAV dans la transduction de différents tissus.

Adapté d'*Okada and Takeda, Pharmaceuticals, 2013.*

[1, 2, 3] : (Samaranch et al., 2013), (Wu et al., 2005), (Harding et al., 2006)

[4, 5, 6, 7] : (Inagaki et al., 2006), (Du et al., 2004), (Pacak et al., 2006), (Kawamoto et al., 2005)

[8, 9] : (Wang et al., 2005b), (Nishiyama et al., 2008)

[10, 11, 12] : (Mingozzi et al., 2009), (Brantly et al., 2009), (Wang et al., 2010)

[13] : (Vandendriessche et al., 2007)

[14, 15] : (Wang et al., 2004), (Loiler et al., 2003)

[16, 17, 18] : (Rabinowitz et al., 2002), (Colella and Auricchio, 2012), (Baba et al., 2012)

[19] : (Aldrich et al., 2005)

[20] : (Zhong et al., 2006)

[21] : (Ellis et al., 2013)

Annexe 3

Figure 24 : Tableau récapitulatif des études basées sur l'utilisation des vecteurs AAV recombinants en vaccination.

[1] : (Manning et al., 1997)

[2] : (Liu et al., 2000)

[3] : (Liu et al., 2005a)

[4] : (Kuck et al., 2006)

[5] : (Nieto et al., 2009)

[6] : (Zhou et al., 2009)

[7] : (Nieto et al., 2012)

[8] : (Xin et al., 2001)

[9] : (Xin et al., 2002)

[10] : (Xin et al., 2006)

[11] : (Lin et al., 2007a)

[12] : (Lin et al., 2007b)

[13] : (Lin et al., 2009)

[14] : (Wu et al., 2012)

[15] : (Johnson et al., 2005)

[16] : (Du et al., 2006)

[17] : (Logan et al., 2007)

[18] : (Sipo et al., 2011)

[19] : (Li et al., 2012)

[20] : (Rybniker et al., 2012)

[21] : (Ploquin et al., 2013)

Annexe 4

Poster congrès Société Française d'Immunologie, Paris, 2013



Two distinct waves of antigen presentation trigger CD8 T cell priming towards foreign antigens delivered in peripheral tissues

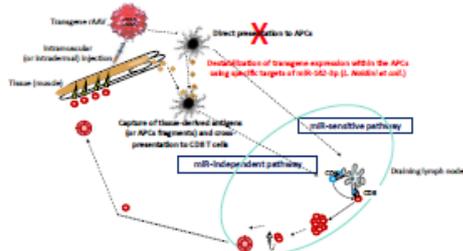
Alexandre Ghenassia¹, Pascal Chappert¹, Maxime Carpentier¹, Loredana Saveanu¹, Stéphanie Lorain², Dominique Urbain¹, David-Alexandre Gross¹, Jean Davoust¹.

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR_S 1013, Hôpital Necker-Enfants Malades, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine René Descartes, 75015 Paris, France.
² Université Pierre et Marie Curie (Umr76)-Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U974)-Centre National de la Recherche Scientifique (UMR 7215)-Institut de Myologie, Paris, France.

INTRODUCTION

In the context of antigen presentation two major pathways, namely direct and cross-presentation, act in parallel to trigger efficient anti-viral cytotoxic CD8 T cell responses. Each pathway requires the processing of antigens by professional antigen presenting cells (APCs) which can be either transduced or present pieces of antigens coming from others infected cells or tissues.

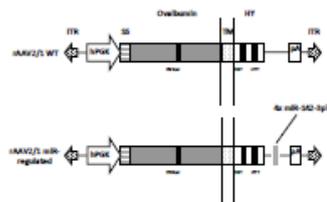
To dissect the impact of each pathway, we based our study on a miR-142-3p (miR) presents in all cells belonging to the hematopoietic lineage. Targets of this miR were inserted into a recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector in order to destabilize antigen expression in APCs and favour cross-presentation events (figure below).



In this study, we analyse how the kinetic of CD8 T cells priming is modulated by miR-mediated regulation of antigen expression in APCs, and how this might be affected by external cues such as CD4⁺ T cell help or tissue microenvironment.

MATERIALS

The rAAV vector is constituted by an AAV1 capsid and AAV2 Inverted Terminal Repeats (ITRs). Such vector is called pseudotyped rAAV2/1 vector and possesses a strong tropism to target muscles. As foreign antigen, we use a membrane form of OVA₃₂₃ containing two Class I epitopes (OVA₃₂₃ and UTY₃₄₈) and one Class II epitope (DBY₃₆₈) which are inserted into the rAAV2/1 vector under the control of the promoter hPGK. One construct expresses the transgene flanked by two ITRs (rAAV2/1 WT) and another carries four additional repeated targets of miR (rAAV2/1 miR-regulated).

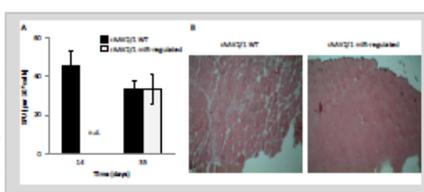


RESULTS

1. Evaluation of effector CD8 T cells responses after rAAV2/1 vectors immunizations

Figure A: To analyse the generation of effector CD8 T cells responses directed against the neo-antigen, IFN γ production potential was measured by ELISpot Assay within the spleen in wild-type (C57BL/6) mice, injected by intramuscular (i.m.) route following OVA₃₂₃ restimulation.

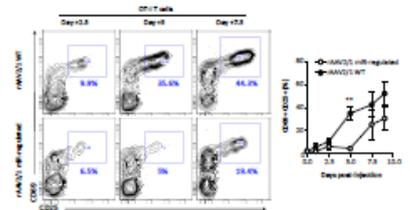
Figure B: Additionally, the presence of infiltrating cytotoxic T lymphocytes (CTL) was analysed by immunohistochemistry in muscle at day 14.



- At 14 days no CTL responses were detected following rAAV2/1 miR-regulated vector injection. Later at 35 days, functional responses were observed for both vectors.
- These results suggest that cross-presentation of muscle-derived OVA transgene could be delayed in time.

2. Impact of miR-mediated regulation on antigen presentation to cognate CD8 T cells

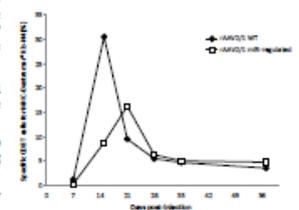
To estimate when antigen presentation occurs, naive OT-1 T cells were injected at indicated time points to assess presentation of OVA transgene products in draining lymph nodes of wild-type male mice injected by the i.m. route. CD69 and CD25 expression was analysed 18 hours later on transferred OT-1 T cells.



- Hematopoietically-derived antigens from rAAV2/1 WT vector injection appeared more quickly presented than muscle-derived antigens.
- The time delay observed between direct and cross-presentation in this model, is correlated with the time delay of initiation of effector CD8 T cells responses between the two vectors. Altogether, these results highlight two successive waves of antigen presentation, that can both lead to CD8 T cell priming.

3. Effect of the route of administration

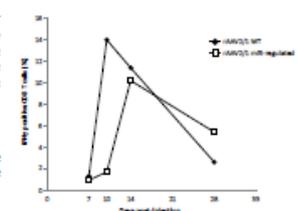
To assess whether the tissue could influence this delay in antigen cross-presentation, wild-type male mice were injected by intradermal (i.d.) route and the evolution of antigen-specific CD8 T cells was monitored into the peripheral blood by Dextramer[®] staining.



- OVA-specific CD8 T cells responses against the rAAV2/1 miR-regulated vector peaked 7 days later than with the rAAV2/1 WT vector.
- As observed previously, a delay exists between the two vectors highlighting that the kinetic of CD8 T cell priming appears to be independent of the route of administration.
- Nevertheless, both vectors are able to maintain similar frequencies of long-term CD8 T cells.

4. Effect of CD4⁺ T cell help

To estimate whether an important stimulation by helper T cells could modify the observed delays, a kinetic of IFN γ production potential of CD8 T cells was monitored and the expression of IFN γ was measured by intracellular cytokine FACS staining within the spleen in wild-type female mice immunized by i.d. route.



- CD4⁺ T cell help triggers faster responses for both vectors.
- However, as observed in male mice, a delay in the response to rAAV2/1 miR-regulated vector could be observed in female mice.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

This study highlights an important difference between the two major pathways of antigen presentation using a foreign antigen expressed in peripheral tissue with rAAV2/1 vectors: a time delay in presentation and priming of CD8 T cells when the cross-presentation is preferentially activated. Nevertheless, despite early differences in the kinetic of antigen presentation and CD8 T cells priming, similar frequency of long-term memory CD8 T cells could be observed against the transgene.

A first future aim of this study will be to assess the quality of memory CD8 T cells generated by these two pathways of antigen presentation.

A second future aim will be to address how the modulation of these pathways can improve the initiation of antigen-specific memory CD8 T cells in response to rAAV vaccines, currently used in clinical trials?

Moreover, preliminary results indicate that the efficiency of the rAAV2/1 miR-regulated vector to trigger the muscle-derived antigens presentation by APCs, and subsequent CD8 T cells priming, is closely dependent on IRAP (Insulin-Regulated AminoPeptidase) activity. Further experiments in IRAP-KO mice will allow us to confirm the importance of IRAP molecule in the generation of functional responses of CD8 T cells after rAAV2/1 WT vector immunizations.

Annexe 5

Poster congrès Vaccinology, Institut Pasteur Paris, 2015



Intradermal vaccination with recombinant Adeno-Associated Virus vector leads to polyfunctional long-term memory CD8⁺ T cell responses

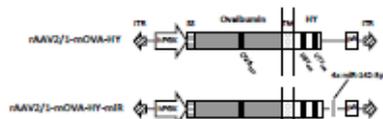
Alexandre Ghenassia¹, Stéphanie Lorain², David-Alexandre Gross¹, Jean Davoust¹, Pascal Chappert¹

¹ INSERM UMR 1151 - Institut Necker-Enfants Malades - Centre de médecine moléculaire, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.
² Institut de Myologie, UMR76, INSERM UMR83 974, CNRS FRE 3617, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

INTRODUCTION

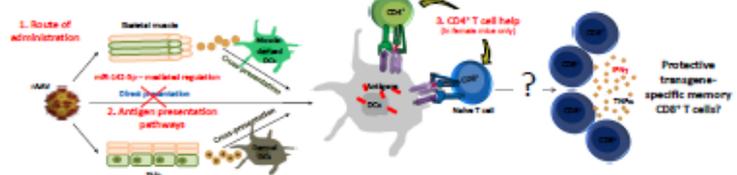
Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV) vectors have been described as tools used both in the context of gene replacement therapy and vaccinal trials. Previous studies performed in mice, however, showed that memory CD8⁺ T cells generated following intramuscular vaccination with rAAV vectors were inefficient to protect against a cognate pathogen, due to their inability to expand and to produce effector cytokines following a secondary antigen encounter. In this study, we investigate the impact of three key parameters known to regulate the induction of CD8⁺ T cells responses, namely route of administration (intramuscular versus intradermal), availability of antigen-presentation pathways and CD4⁺ T cell help, on the regulation of long-lasting memory CD8⁺ T cells induced following rAAV-mediated vaccination to a model transgene.

rAAV CONSTRUCTS



In this study, we made use of a pseudotyped rAAV2/1 vector, constituting of an AAV1 capid and AAV2 Inverted Terminal Repeats (ITRs), which has previously been described for its strong tropism toward muscle fibers. The inserted transgene encodes for a membrane-bound form of the model protein chicken ovalbumin (OVA), containing the immunodominant MHC Class I epitope SIINFEKL (OVA₃₂₃₋₃₃₉), fused to two well-characterized male-specific epitopes isolated from male-specific DBY (MHC Class II epitope DBY₁₀₀) and UTY (MHC Class I epitope UTY₁₀₀) proteins (mOVA-HY). The full construct is under the control of the hPGK promoter (rAAV2/1-mOVA-HY). Furthermore, to inhibit direct transgene expression in antigen presenting cells (APCs), we additionally generated a second rAAV2/1 construct bearing 4 repeats of the microRNA-143-3p targets (miR-143-3p) sequence inserted in the 3' untranslated region of the hPGK-driven mOVA-HY expression cassette (rAAV2/1-mOVA-HY-miR).

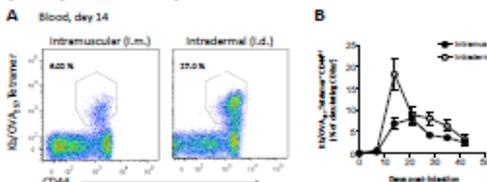
MODEL



A unique model to study the cellular and molecular parameters regulating the induction of long-term memory CD8⁺ T cells following vaccination with rAAV vectors: (1) First, the impact of the route of administration has been addressed in this study by comparing the classical intramuscular immunization with an intradermal immunization. (2) Second, the role of direct antigen presentation by rAAV-transduced professional antigen presenting cells (APCs) has been investigated by comparing CD8⁺ T cells responses elicited against the mOVA-HY and the mOVA-HY-miR constructs. In APCs transduced by the miR-regulated vector, transgene expression is naturally destabilized by the miR-143-3p microRNA, endogenously expressed in all hematopoietic cells, thus preventing direct presentation of transgene product-derived antigens to CD8⁺ T cells. (3) Finally, the impact of helper CD4⁺ T cell responses has been simply addressed by comparing responses elicited in female mice versus male mice, which are naturally tolerant to the male DBY₁₀₀ antigen. Numbers and quality of anti-OVA₃₂₃₋₃₃₉ CD8⁺ T cells generated in all 8 possible combinations of route, vector and recipient sex have been analyzed and the most significant results are listed below.

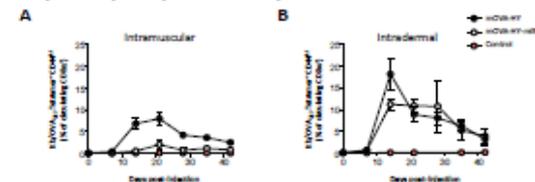
RESULTS

1. Intradermal immunization with rAAV2/1 vector yield a strong primary CD8⁺ T cell response:



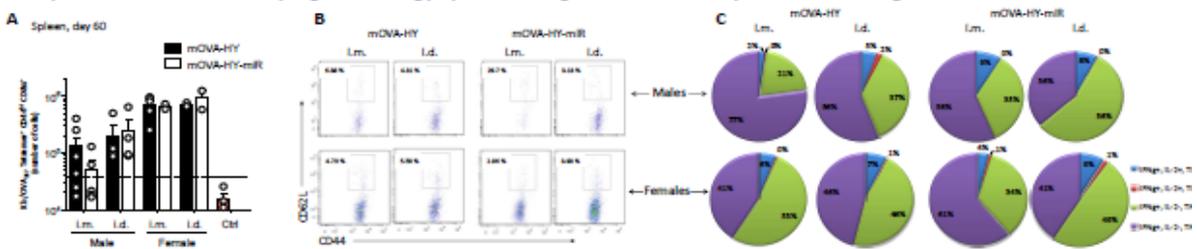
C57Bl/6 male mice were injected i.m. or i.d. at day 0 with 3×10^{10} vg of rAAV2/1-mOVA-HY vector. Every 7 days, blood samples were collected and stained with anti-CD8 α antibodies and Kb/OVA₃₂₃₋₃₃₉ Tetramer (A). Tetramer and CD44 stainings on gated live CD8 α ⁺ T cells in the blood at day 14. (B) Frequencies of CD44^{hi} Tetramer⁺ in live CD8 α ⁺ T cells, n=6-11 mice per group pooled from five independent experiments. Mean \pm SEM.

2. Intradermal but not intramuscular immunization yield direct presentation-independent primary CD8⁺ T cell responses:



C57Bl/6 male mice were injected i.m. (A) or i.d. (B) at day 0 with 3×10^{10} vg of rAAV2/1-mOVA-HY or rAAV2/1-mOVA-HY-miR vector. Every 7 days, blood samples were collected and stained with anti-CD8 α and anti-CD44 antibodies and Kb/OVA₃₂₃₋₃₃₉ Tetramer. Frequencies of CD44^{hi} Tetramer⁺ in live CD8 α ⁺ T cells are displayed, n=4-11 mice per group pooled from five independent experiments. Mean \pm SEM.

3. Help and route of administration synergize in inducing polyfunctional long-term effector/memory CD8⁺ T cells following rAAV immunization:



C57Bl/6 male and female mice were injected i.m. or i.d. at day 0 with 3×10^{10} vg of rAAV2/1-mOVA-HY or rAAV2/1-mOVA-HY-miR vector. At day 60, spleens were harvested and stained with anti-CD8 α , anti-CD44 and anti-CD62L antibodies and Kb/OVA₃₂₃₋₃₃₉ Tetramer (A-B) or restimulated for 5h with cognate OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide in the presence of Inelifeidin A and stained for Intracellular IL-2, IFN γ and TNF α cytokines (C). (A) Absolute number of live IgG-Kb/OVA₃₂₃₋₃₃₉ Tetramer⁺ CD44^{hi} CD8 α ⁺ T cells in the spleen (OVA-specific memory T cells). (B) CD44 and CD62L expression on gated live OVA-specific memory T cells in the spleen. (C) Repartition of cytokine combinations expressed by OVA-specific memory CD8 α ⁺ T cells upon restimulation, n=4-6 mice per group pooled from three independent experiments (except for female immunized with rAAV2/1-mOVA-HY in i.d. or mOVA-HY-miR in i.m. or i.d.; n=2 mice per group from one experiment). Mean \pm SEM.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Overall, our results underline the potency of the intradermal administration route for rAAV vaccines as well as the need to carefully consider a helper effect and antigen-presentation pathways in the future design of rAAV vaccines. In all tested conditions, rAAV2/1 immunization mostly generated effector/memory CD8⁺ T cells (CD44^{hi} CD62L^{low}) with few central memory cells. The absolute number and the polyfunctionality of anti-transgene memory CD8⁺ T cells recovered at later time points in the response, however, appeared highly improved by the presence of bystander CD4⁺ T cell help and the choice of an intradermal route of administration. Interestingly, primary CD8⁺ T cell responses directed against a foreign transgene expressed in the skin, but not muscle fibers, appeared to mostly rely on cross-presentation, suggesting different antigen presenting cells in play. A detailed analysis of the phenotype of transgene-derived antigens presenting cells, both in muscle and skin draining lymph nodes, as well as the level of protection to pathogens achieved in our various settings should further bring us important clues on the modulation of cytotoxic T cell responses and the recruitment of long-lasting memory CD8⁺ T cells by rAAV vaccines.