

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : *Immunologie*

Par

Malo DANIEL

Étude de lymphocytes CD8 régulateurs hépatiques murins par microscopie et analyse du transcriptome

Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le 27/11/2020

Unité de recherche : CRTI UMR 1064

Rapporteurs avant soutenance :

Alberto SANCHEZ-FUEYO Professor of Hepatology, King's College London, Londres, UK
Emmanuel DONNADIEU Directeur de Recherche, Institut Cochin, Paris, France

Composition du Jury :

Président :	Oumeya ADJALI	Chargée de Recherche, UMR 1089, Université de Nantes, France
Examineurs :	Alberto SANCHEZ-FUEYO Emmanuel DONNADIEU	Professor of Hepatology, King's College London, UK Directeur de Recherche, Institut Cochin, Université de Paris, France
Dir. de thèse :	Sophie CONCHON	Chargée de Recherche, CRTI UMR 1064, Université de Nantes, France

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier le Docteur Sophie Conchon de m'avoir intégré au sein de son équipe de recherche il y a maintenant plus de 4 ans et d'avoir accepté de superviser mon travail de thèse. Merci pour ta confiance, ton implication, merci de m'avoir poussé à approfondir mes travaux. Je sors grandis de nos recherches, et en cela, merci.

À l'heure de soutenir mes travaux de thèse, je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail :

Le Docteur Oumeya Adjali en sa qualité d'examinatrice.

Le Docteur Emmanuel Donnadiou et le Professeur Alberto Sánchez-Fueyo en leur qualité de rapporteurs.

Je tiens également à remercier chaleureusement Jean-Paul Judor pour m'avoir formé et accompagné sur de nombreuses manip. C'était un réel plaisir de travailler à tes côtés (même à l'animalerie !).

Merci également à Laurence Dubreil pour m'avoir ouvert les portes de sa plate-forme et appris la microscopie. Nos échanges étaient très enrichissants. En ce sens, merci également à Marie-Thérèse Charreyre et Arnaud Favier pour les travaux que nous avons pu mener ensemble, cela a été très formateur pour moi.

Merci à Richard Danger et à Céline Serazin pour votre aide et vos précieux conseils bioinformatiques.

Un grand merci à Pierre et Alex qui furent, sans conteste, la plus belle découverte de ces 4 années. Mercé les potibros.

Merci également aux potos Marine, Alice, Nathan, Marion, Anaïs, Eléa pour votre bonne humeur, mais également aux plus lointains Maxime, Clément, Axel, Édouard, Tudi et Rose !

Je remercie également l'AFM-Téléthon d'avoir accepté de financer mon travail de thèse.

Je tiens évidemment à remercier ma famille pour m'avoir toujours soutenu dans mes longues études.

Un grand merci également à Laurie et Minette pour leur soutien au quotidien !

Enfin merci au moi d'il y a 3 ans d'avoir finalement eu le courage et la curiosité nécessaire pour débiter ce travail de thèse.

Avant-propos

Mes travaux de recherche durant ces 3 années de thèse se sont portés sur l'étude d'une population murine de lymphocytes CD8⁺ régulateurs induite dans le foie après transfert de gène codant pour une molécule de CMH allogénique. Cette population lymphocytaire, présente uniquement dans le foie des souris traitées par thérapie génique, induit une tolérance immunologique systémique envers la molécule de CMH allogénique génétiquement transférée et permet ainsi la prise d'un greffon allogénique portant cette molécule de CMH. Ce sujet présente pour moi un intérêt particulier, à l'interface des problématiques contemporaines liées à la transplantation et de l'étude de l'environnement immunitaire atypique que représente le foie.

Mon travail de thèse a été centré sur la caractérisation de cette population lymphocytaire régulatrice, de l'étude transcriptomique à la recherche d'une population équivalente chez l'homme, mais également par l'optimisation de techniques de microscopie de pointe pour l'étude de cellules immunitaires *in situ*.

Je commencerai ce manuscrit par introduire la transplantation d'organes, son histoire, ses chiffres, ses enjeux de santé mondiale et sa principale limite clinique : le rejet immun du greffon. Je décrirai ensuite les différentes approches thérapeutiques envisagées dans le contrôle du rejet. Cela me conduira à développer la notion de tolérance immunologique, ses principaux acteurs et son intérêt en transplantation.

J'introduirai ensuite l'organe immunitaire qu'est le foie en insistant particulièrement sur ses capacités tolérogènes qui en font une cible de choix dans le développement de nouvelles stratégies d'inductions de tolérance. Je m'intéresserai spécifiquement aux nouvelles thérapies géniques utilisant ce potentiel tolérogène pour traiter des pathologies héréditaires et auto-immunes. Enfin je présenterai les travaux originaux de mon équipe, qui a développé chez la souris une stratégie d'induction de tolérance en transplantation par détournement du potentiel tolérogène du foie par thérapie génique, impliquant l'expansion d'une population de lymphocytes CD8⁺ régulateurs résidentes du foie.

Je présenterai ensuite mes résultats en deux parties distinctes, qui seront chacune introduites et discutées indépendamment.

La première partie sera dédiée à l'analyse transcriptomique de cette population régulatrice. Cette analyse m'a permis d'identifier de nouveaux marqueurs discriminants de cette population chez la souris, de mettre en lumière de nouvelles voies potentiellement impliquées dans la génération et les fonctions suppressives de ces cellules, mais également de débiter les recherches d'une population équivalente chez l'homme dans un contexte d'allogreffe hépatique.

La seconde partie de mon travail a été dédiée à la mise en place et à l'optimisation du tracking cellulaire dans le foie chez le petit animal grâce à une sonde fluorescente de nouvelle génération permettant une approche multimodale, de l'analyse en cytométrie en flux à la microscopie biphotonique sur échantillons épais transparés. Le but de ce développement technologique est de faciliter et standardiser l'analyse microscopique en profondeur de cellules immunitaires telles que les lymphocytes régulateurs aux centres de nos travaux.

Enfin je terminerai ce manuscrit par une conclusion regroupant les deux axes de ma thèse, et les perspectives de recherches directes liées à ceux-ci.

Table des matières

Remerciements	3
Avant-propos	5
Table des matières	7
Liste des abréviations	9
Liste des figures et tableaux.....	12
Introduction	14
Partie 1 : La tolérance en transplantation	14
1.1. La transplantation, enjeux et limites	15
1.1.1. Généralités.....	15
a- Historique	15
b- Chiffres.	16
1.1.2. Le rejet immun du greffon.	18
a- Le rejet hyperaigu.	19
b- Le rejet aigu	19
c- Le rejet chronique.....	22
1.1.3. Les traitements immunosuppresseurs en transplantation	23
a- Historique	23
b- Principaux traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation.....	24
1.2. La tolérance immunologique.....	28
1.2.1. Généralités et historique	28
1.2.2. La tolérance centrale	29
1.2.3. La tolérance périphérique.....	30
a- Les lymphocytes CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ régulateurs.....	31
b- Les lymphocytes CD8 ⁺ régulateurs.	34
c- Tolérisation des lymphocytes T par anergie et épuisement.	39
1.2.5. La tolérance en transplantation.....	41
a- Transplantation et tolérance opérationnelle	41
b- Induction d'un chimérisme hématopoïétique en transplantation	42
c- La thérapie cellulaire par injection de cellules régulatrices en transplantation.....	43
Partie 2 : Détournement du potentiel tolérogène du foie par thérapie génique	46
2.1. Le foie, un organe tolérogène	46
2.1.1. Généralités et anatomie du foie	46
2.2.2. Le foie : un environnement immunitaire particulier.....	48
2.2.3. Les cellules immunitaires du foie impliquées dans la tolérance hépatique.....	49
a- Les cellules de Kupffer	49
b- Les cellules dendritiques	51
c- Les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques	51
d- Les hépatocytes	52
e- Les cellules étoilées	52
2.2.4. Activation et tolérisation lymphocytaire dans le foie	53
a- Le foie, un organe lymphoïde secondaire ?.....	53
b- Devenir des lymphocytes T activés dans le foie	54
c- Les lymphocytes régulateurs dans l'induction de tolérance hépatique et systémique.....	56
2.2. Thérapie génique dans le foie	57

2.2.1. Généralités	57
2.2.2. La thérapie génique dans le foie pour le traitement des maladies héréditaires et auto-immunes	58
a- Le foie, un organe de choix pour la thérapie génique	58
b- Les vecteurs AAV pour la thérapie génique dans le foie	59
c- Des réussites précliniques aux succès cliniques	60
2.2.3. Induction d'une tolérance allogénique par transfert de gène dans le foie, perspective en transplantation	64
a- Travaux de l'équipe de P. Bertolino	65
b- Travaux de notre équipe	66
Synthèse du projet	69
Résultats	71
I- Étude des LT_{Regs} CD8⁺ induit dans un contexte allogénique hépatique	71
1- Analyse transcriptomique des LT _{Regs} CD8 ⁺ murins	71
1.1. Matériels et méthodes	72
1.2. Profil transcriptomique des LT _{Regs} CD8 ⁺ murins	73
a- Un transcriptome hautement différentiel	73
b- L'analyse transcriptomique pour une meilleure compréhension des mécanismes de génération et de régulation des LT _{Regs} CD8 ⁺	75
2- Phénotypage des LT _{Regs} CD8 ⁺ murins	78
3- Recherche d'une signature CD8 ⁺ régulatrice chez le patient transplanté hépatique	81
Discussion	86
1- De la caractérisation des LT _{Regs} CD8 ⁺ hépatiques murins à la recherche d'une équivalence chez l'homme	86
2- Vers l'expansion des LT _{Regs} CD8 ⁺ hépatiques murins	88
3- Mise en place d'un test fonctionnel <i>in vivo</i> pour confirmer le potentiel suppressif des LT _{Regs} CD8 ⁺ ...	89
II- Caractérisation microscopique des LT_{Regs} CD8⁺	93
Introduction	93
Article	96
Multiscale fluorescence-based tracking of immune cells in the liver with a highly biocompatible far-red emitting polymer probe.	96
Discussion	118
1- Vers la caractérisation <i>in situ</i> des LT _{Regs} CD8 ⁺ hépatiques murins par microscopie	118
2- Développement d'un modèle de coculture hépato-lymphocytaire adapté à la microscopie	119
Conclusion	124
Annexe	126
Bibliographie	130

Liste des abréviations

6MP : 6-mercaptopurine
AAV : *Adeno-associated Virus* ou virus adéno-associés
ABM : Agence de la Biomédecine
ACAID : *Anterior Chamber-associated Immune Deviation* ou déviation immunitaire associée à la chambre antérieure de l'œil
ADCC : *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity* ou cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
Adj. P. value : Adjusted p value
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AIRE : Autoimmune Regulator
ASM : Acid Sphingomyelinase
ATP : Adénosine Triphosphate
BLIMP-1 : B-lymphocyte-induced Maturation Protein 1
CD : Cluster de Différenciation
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV : Cytomégalovirus
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CTLA-4 : *Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Protein 4* ou antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique
DC : *Dendritic Cell* ou cellule dendritique
EAE : *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* ou encéphalomyélite allergique expérimentale
EBV : Epstein-Barr Virus
ECFP : Enhanced Cyan Fluorescent Protein
EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein
Entpd1 : Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 1
ET : Enhanced Transhyretin
EYFP : Enhanced Yellow Fluorescent Protein
FACS : *Fluorescence-activated Cell Sorting* ou tri cellulaire par fluorescence
FC : fold change
FIX : *coagulation Factor IX* ou facteur de coagulation IX
FKBP12 : FK506 Binding Protein
Foxp3 : Forkhead Box P3
GAA : Acid Alpha-glucosidase
GVHD : *Graft Versus Host Disease* ou maladie du greffon contre l'hôte
GZMA : Granzyme A
GZMB : Granzyme B
Havcr2 : Hepatitis A Virus Cellular Receptor 2
HBV : *Hepatitis B Virus* ou virus de l'hépatite B
HCV : *Hepatitis C Virus* ou virus de l'hépatite C
HCC : *Hepatocellular Carcinoma* ou carcinome hépatocellulaire
hDC : *Hepatic Dendritic Cells* ou cellules dendritiques hépatiques
HLA : *Human Leukocyte Antigen* ou antigène des leucocytes humains

HSC : *Hepatic Stellate Cells* ou cellules étoilées (ou stellaires) hépatiques
 hTTR : Human Transthylerin
 HV : *Healthy Volunteer* ou donneur sain
i.v. : Intraveineux
 IFN γ : Interféron γ
 Ig : Immunoglobuline
 IL : Interleukine
 IL-R : *Interleukin Receptor* ou récepteur aux interleukines
 IPEX : *Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked* ou syndrome d'immunodérégulation, de polyendocrinopathie et d'entéropathie lié au chromosome X
 iTreg : *Induced Treg* ou Treg induits
 Jak : Janus Kinase
 Kb : Kilobase
 KC : *Kupffer Cells* ou cellules de Kupffer
 Klrc1 : Killer Cell Lectin Like Receptor C1
 Klrtd1 : Killer Cell Lectin Like Receptor D1
 LAG-3 : Lymphocyte-Activation Gene 3
 LB : Lymphocytes B
 LCMV : *Lymphocytic Choriomeningitis* ou chorioméningite lymphocytaire
 LIFT : Liver Immunosuppression Free Trial
 LP1 : *Liver-Specific Promoter 1* ou promoteur hépatospécifique 1
 LSEC : *Liver Sinusoidal Endothelial Cells* ou cellules endothéliales des sinusoides hépatiques
 LT : Lymphocytes T
 LT_{Eff} : Lymphocytes T effecteurs
 LTh : T helper lymphocytes
 LT_{Regs} : Lymphocytes T régulateurs
 MAIT : Mucosal-associated Invariant T cells ou cellules T invariantes associées aux muqueuses
 MBP : *Myelin-basic Protein* ou protéine basique de la myéline
 mDC : *Myeloid Dendritic Cells* ou cellules dendritiques myéloïdes
 MLR : *Mixed Lymphocyte Reaction* ou réaction lymphocytaire mixte
 MMF : Mycophénolate Mofétil
 MPA : *Mycophenolic Acid* ou acide mycophénolique
 mTEC : *Medullary Thymic Epithelial Cells* ou cellules épithéliales médullaires thymiques
 mTor : Mechanistic Target of Rapamycin
 mTTR : Mouse Transthyretin
 NFAT : *Nuclear Factor of Activated T-cells* ou facteur nucléaire des lymphocytes T actives.
 NK : Natural killer cells
 NKT : *Natural Killer T* ou lymphocytes NKT
 Non-Tol : Non-tolérant
 NPC : *Non-parenchymal Cells* ou cellules non parenchymateuses
 NRP-1 : Neuropiline 1
 nTreg : *Natural Treg* ou Treg naturels
 OLS : Organes Lymphoïdes Secondaires
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cells* ou cellules mononuclées du sang périphérique
 PD1 : Programmed Cell Death 1
 pDC : *Plasmacytoid Dendritic Cells* ou cellules dendritiques plasmacytoïdes

PGK : Phosphoglycerate Kinase
PLC γ : Phospholipase C γ
RNA : *Ribonucleic Acid* ou acide ribonucléique
RNA-Seq : *RNA sequencing* ou séquençage de l'ARN
scAAV : Self-complementary AAV
SEP : Sclérose En Plaques
SNC : Système Nerveux Central
TCR : *T Cell Receptor* ou récepteur des cellules T
TGF- β : *Transforming Growth Factor β* ou Facteur de Croissance Transformant β
Tim-3 : T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3
TLR : *Toll-like Receptors* ou récepteurs de type Toll
Tol : Tolérant
Tox : Thymocyte selection-associated high mobility group bOX
TPLSM : Two-photon Laser Scanning Microscopy
Tr1 : Type 1 Regulatory T cell
TRAIL : Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
UGT1A1 : UDP-glucuronosyltransferase 1 polypeptide A1
vgc : vector genome copy number
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
WT : *wild type* ou type sauvage (naïf)

Liste des figures et tableaux

<i>Figure 1 : Répartition des différents organes greffés en 2017, tous donneurs confondus.</i>	16
<i>Figure 2 : Évolution des transplantations d'organes en France de 2009 à 2018.</i>	17
<i>Figure 3 : Les voies de reconnaissance des alloantigènes en transplantation.</i>	21
<i>Figure 4 : Mécanismes d'actions des principaux traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation.</i>	27
<i>Figure 5 : Mécanismes majeurs de suppression directe des lymphocytes CD4⁺ régulateurs envers les lymphocytes T activés.</i>	32
<i>Figure 6 : Mécanismes régulateurs majeurs des lymphocytes CD4⁺ régulateurs envers les cellules dendritiques.</i>	33
<i>Figure 7 : Mécanismes régulateurs majeurs des lymphocytes CD8⁺ régulateurs sur le système immunitaire.</i>	35
<i>Figure 8 : La tolérisation des lymphocytes T par anergie ou épuisement.</i>	39
<i>Figure 9 : Microanatomie hépatique chez l'homme.</i>	47
<i>Figure 10 : Les différentes cellules immunitaires hépatiques.</i>	50
<i>Figure 11 : Les vecteurs AAV recombinants en thérapie génique.</i>	59
<i>Figure 12 : Travaux de l'équipe sur l'induction de tolérance allogénique dans le foie par thérapie génique.</i>	67
<i>Figure 13 : Préparation des échantillons pour le RNA-Seq.</i>	73
<i>Figure 14 : Analyse transcriptomique des LT_{Regs} CD8⁺ CD44⁺ PD1⁺.</i>	74
<i>Figure 15 : Analyse transcriptomique des gènes impliqués dans la régulation négative du système immunitaire.</i>	75
<i>Figure 16 : Phénotypage des LT_{Regs} CD8⁺ CD44⁺ PD1⁺.</i>	79
<i>Figure 17 : Recherche d'une population CD8⁺ tolérogène chez des patients transplantés hépatiques (cohorte LIFT) avant arrêt des traitements immunosuppresseurs.</i>	83
<i>Figure 18 : Analyse phénotypique des PBMC de patients transplantés hépatiques avant arrêt des traitements immunosuppresseurs.</i>	84
<i>Figure 19 : Modèle de prise tumorale associée à l'injection de cellules Hepa1.6 et Hepa1.6 H-2K^d.</i>	90
<i>Figure 20 : Étude du potentiel suppressif des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins dans le modèle d'hépatocarcinome allogénique induit par les cellules Hepa1.6 H-2K^d.</i>	92
<i>Figure 21 : Modèle de coculture hépato-lymphocytaire en petit volume, adapté à la microscopie.</i>	121
<i>Figure 22 : Analyse de l'activation cellulaire des LT_{Regs} CD8⁺ et des LT CD8⁺ CD44⁺ PD1⁺ contrôles sur un tapis hépatocytaire exprimant l'alloantigène H-2K^d.</i>	122
<i>Table 1 : Survie du greffon rénal selon la période de greffe (1986-2015).</i>	18
<i>Table 2 : Principaux traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation.</i>	26
<i>Table 3 : Les différentes populations de LT_{Regs} CD8⁺ décrites chez le rongeur et l'homme dans un contexte de transplantation.</i>	38
<i>Table 4 : Principales études pré-cliniques et cliniques de thérapie génique dans le foie.</i>	62
<i>Table 5 : Le complexe d'histocompatibilité murin ou système H2.</i>	65
<i>Table 6 : Les haplotypes H2 des différentes souches de souris utilisées au laboratoire.</i>	65
<i>Table 7 : Liste restreinte des 147 gènes les plus différenciellement exprimés par les LT_{Regs} CD8⁺.</i>	126

Introduction

Introduction

Partie 1 : La tolérance en transplantation

La transplantation d'organe est une des avancées thérapeutiques majeures du XX^{ème} siècle qui consiste à remplacer un organe dysfonctionnel par un greffon fonctionnel provenant d'un autre individu. Elle reste aujourd'hui la seule issue thérapeutique pour un grand nombre de pathologies chroniques entraînant des pertes de fonctions irréversibles des organes vitaux.

Dans cette première partie, j'introduirai brièvement la transplantation d'organe, ses enjeux de santé mondiale, et ses limites, principalement liées au rejet immun du greffon. J'aborderai ensuite les traitements immunosuppresseurs utilisés pour limiter le rejet de greffe mais pour lesquels les effets indésirables sont aujourd'hui bien caractérisés.

Cela m'emmènera à décrire, dans un second temps, la tolérance immunologique et ses principaux acteurs : les lymphocytes régulateurs (LT_{Regs}). Enfin, je développerai la notion de tolérance opérationnelle, son intérêt en transplantation et les nouvelles stratégies utilisées en ce sens.

1.1. La transplantation, enjeux et limites

1.1.1. Généralités

a- Historique

D'après Jacques Cinqalbre : « Greffe d'organes » aux éditions Elsevier Masson, 2004.

La transplantation d'organes est aujourd'hui considérée comme la seule alternative thérapeutique dans bon nombre de pathologies chroniques en stade terminale, en remplaçant un organe dysfonctionnel par un greffon fonctionnel provenant d'un donneur sain. On distingue 3 types de transplantations dépendant de l'origine du greffon. L'autogreffe consiste à greffer des cellules ou un tissu à l'individu même qui a donné le greffon. Les principales applications d'autogreffes sont effectuées dans des contextes de greffe de peau après brûlures sévères, ou dans le cadre de greffe de moelle osseuse autologue après chimiothérapie anti-cancéreuse. On parlera d'allogreffe quand donneur et receveur sont génétiquement différents mais appartiennent à la même espèce et de xéngreffe quand ceux-ci n'appartiennent pas à la même espèce. Si la xéngreffe en est encore à ses débuts (la seule application clinique étant la greffe de valves cardiaques porcines à des humains), l'allogreffe est quant à elle la transplantation la plus effectuée dans le monde.

Historiquement, la transplantation d'organes est considérée comme l'une des avancées médicales majeures du XXème siècle. René Küss (1913-2006), pionnier de la greffe rénale et lauréat du prix Medawar décrit la transplantation comme « la grande aventure médicale du XXème siècle ». La première partie du siècle fut une succession d'échecs pour la transplantation, due à des connaissances encore partielles dans les domaines de l'immunologie et de la physiologie humaine. Ce n'est qu'à partir des années 1950 que vont voir le jour les premiers succès en transplantation, dans un premier temps entre jumeaux homozygotes (greffe syngénique rénale, effectuée en 1954 par le Dr. Joseph E. Murray, Prix Nobel de Physiologie ou Médecine 1990, à Hôpital Peter Bent Brigham, Boston, États-Unis - Harrison et al., 1956) puis progressivement (parallèlement à la découverte des traitements immunosuppresseurs, du chimérisme hématolymphopoïétique et du complexe majeur d'histocompatibilité) entre individus génétiquement différents. Parmi les premières études

les plus notables sur l'allogreffe, nous retenons les travaux du Dr Thomas Starzl (Denver, Colorado) qui démontra en 1963 l'efficacité de l'association azathioprine-prednisone pour prévenir le rejet aigu d'allogreffe rénale (Starzl, 1963). La décennie 1960 permit également la remise en cause des fondements éthiques de la transplantation d'organes en autorisant notamment les prélèvements sur des donneurs en mort encéphalique, ouvrant ainsi les possibilités de greffe à d'autres organes que le rein. S'ensuivirent les premiers succès de greffe de foie en 1963 (Dr Thomas Starzl - Denver, États-Unis) et de cœur en 1968 (Dr Christiaan Barnard - Le Cap, Afrique du Sud). Dès lors, l'amélioration des techniques chirurgicales et de conditionnement du greffon, couplée à la découverte de traitements immunosuppresseurs toujours plus efficaces permirent la démocratisation de la transplantation d'organes pour atteindre aujourd'hui des niveaux de succès thérapeutiques inégalés.

b- Chiffres.

Le rein reste aujourd'hui l'organe le plus greffé au monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 139 024 organes ont été transplantés dans le monde en 2017 (soit 7,5% de plus qu'en 2015) dont 90 306 reins (32 990 provenant de donneurs vivants, 57 316 de donneurs décédés) se plaçant largement devant les greffes de foie (32 348) et de cœur (7881 greffes) (Figure 2).

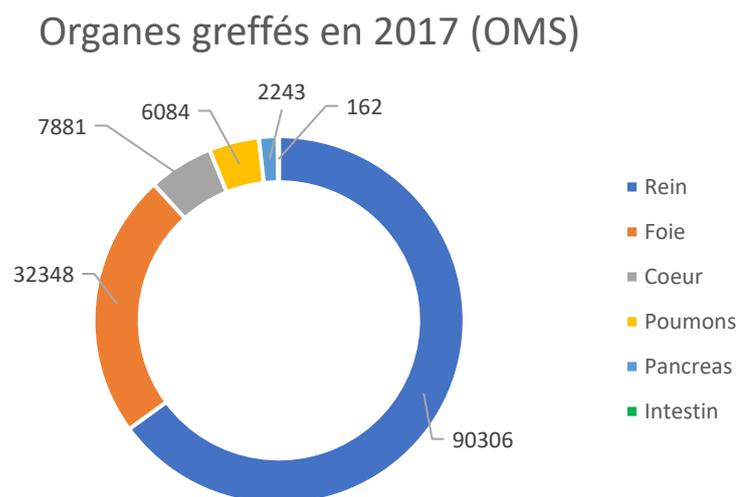


Figure 2 : Répartition des différents organes greffés en 2017, tous donneurs confondus. Source : ABM.

La France est en 2017 le 5ème pays qui transplante le plus d'organes, derrière le Brésil, l'Inde, la Chine et les États-Unis, avec un total de 6360 greffes tout organes et donneurs confondus en 2018 selon l'Agence de la Biomédecine (ABM), contre 6734 en 2017 et 4815 en 2009. Il est cependant important de noter que, malgré des efforts certains pour la sensibilisation aux dons d'organes et l'amélioration du conditionnement du greffon pré-transplantation, cela reste en deçà du nombre de nouveaux inscrits (8322) en attente d'une greffe en 2018 (*Figure 3*).

Evolution des greffes d'organes en France de 2009 à 2018 (ABM)

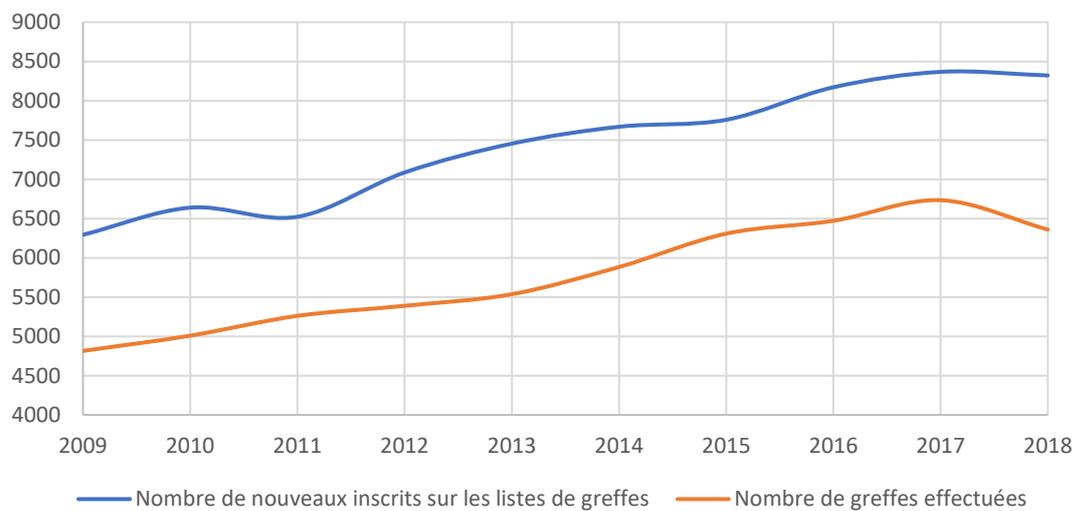


Figure 3 : Évolution des transplantations d'organes en France de 2009 à 2018. Source : ABM.

Si le besoin en transplantation reste aujourd'hui largement supérieur aux greffes effectuées (qui couvre seulement 10% du besoin mondial selon l'OMS), il est néanmoins nécessaire de mentionner l'impact qu'a eu l'amélioration des techniques chirurgicales, du conditionnement du greffon et du receveur ainsi que des traitements immunosuppresseurs sur le devenir du greffon. En 15 ans (1986-2000), la médiane de survie du greffon rénal n'a fait qu'augmenter, atteignant respectivement la valeur de 179,4 mois sur la période 1996-2000 contre 128,5 mois sur la période 1986-1990 soit une survie du greffon rénale augmentée de plus de 4 ans. Cela s'explique principalement par la prévention des rejets de greffe précoces de type hyperaigu et aigu grâce aux traitements immunosuppresseurs et au typage HLA (Human Leukocyte Antigen, nom donné au CMH humain).

Table 1 : Survie du greffon rénal selon la période de greffe (1986-2015), ABM. [] : Intervalle de confiance. NO : non observable. Données extraites de CRISTAL le 01/03/2017.

Période de greffe	N	Survie à 1 mois	Survie à 1 an	Survie à 5 ans	Survie à 10 ans	Survie à 15 ans	Médiane de survie (mois)
1986-1990	8671	93,30% [92,7% - 93,8%]	83,70% [82,8% - 84,4%]	68,20% [67,2% - 69,2%]	52,30% [51,2% - 53,3%]	38,20% [37,2% - 39,3%]	128,5 [124,4 - 132,8]
1991-1995	8819	94,20% [93,7% - 94,7%]	86,30% [85,5% - 87,0%]	74,50% [73,6% - 75,4%]	59,10% [58,1% - 60,2%]	44,00% [42,9% - 45,1%]	156,6 [151,2 - 161,0]
1996-2000	8971	96,00% [95,5% - 96,3%]	91,00% [90,4% - 91,6%]	80,50% [79,7% - 81,3%]	65,10% [64,1% - 66,0%]	49,90% [48,8% - 50,9%]	179,4 [175,0 - 183,6]
2001-2005	11396	96,20% [95,8% - 96,5%]	92,20% [91,7% - 92,6%]	80,60% [79,9% - 81,3%]	63,60% [62,7% - 64,5%]	NO	165,1 [161,3 - 168,4]
2006-2008	8580	96,50% [96,0% - 96,8%]	92,60% [92,1% - 93,2%]	80,00% [79,1% - 80,9%]	59,60% [58,2% - 60,9%]	NO	NO
2009-2011	8695	96,00% [95,6% - 96,4%]	91,70% [91,1% - 92,3%]	79,40% [78,5% - 80,2%]	NO	NO	NO
2012-2015	12836	95,90% [95,5% - 96,2%]	91,60% [91,1% - 92,1%]	NO	NO	NO	NO

Néanmoins, moins de 50% des patients ayant subis une greffe rénale entre 1996 et 2000 présentent un greffon fonctionnel 15 ans après la transplantation (*Table 1*). Cette survie du greffon, diminuant invariablement à mesure que le temps passe, est le reflet d'une des plus importantes problématiques modernes de la transplantation : le rejet chronique du greffon.

1.1.2. Le rejet immunitaire du greffon.

D'après l'expertise collective : « Transplantation d'organes : quelles voies de recherche ? » aux éditions Inserm, 2009.

Le rejet de greffe consiste en l'ensemble des réactions immunitaires, locales et systémiques que l'organisme receveur peut développer à l'encontre du greffon, pouvant entraîner la destruction de ce dernier. La cause majeure du rejet immunitaire du greffon est la variation génétique existante entre donneur et receveur, principalement au niveau des loci du CMH, induisant l'expression d'antigènes à la surface des cellules du greffon qui seront reconnus par le système immunitaire du donneur comme des antigènes du non soi (alloantigènes) conduisant à une réponse immunitaire envers le greffon. Cela explique pourquoi les premiers

succès historiques de transplantation d'organe ont eu lieu entre patients apparentés donc génétiquement proches voire identiques dans le cas des jumeaux homozygotes (Harrison et al., 1956). Il existe plusieurs types de rejet immun du greffon qui se caractérisent par le délai entre l'acte chirurgical de la transplantation et l'apparition des premiers signes de dysfonctions de l'organe greffé.

a- Le rejet hyperaigu.

Le rejet hyperaigu, uniquement médié par l'immunité humorale, apparaît dans les premières minutes suivant la transplantation du greffon dans l'organisme hôte. La principale cause du rejet hyperaigu est la préexistence, chez le receveur, d'anticorps anti-donneur (Cai and Terasaki, 2005a et b). Ces anticorps peuvent être naturels, assimilés aux groupes sanguins des donneurs et receveurs, ou induits lors de situations immunogènes antérieures à la transplantation (greffes, grossesses, transfusions sanguines). Dans le deuxième cas, ces anticorps sont notamment dirigés contre des déterminants du CMH du donneur. Ainsi, les complexes anticorps-antigènes formés au niveau du greffon vont entraîner une activation du complément, conduisant à un recrutement massif de neutrophiles fortement inflammatoires. Parallèlement, les anticorps anti-donneur vont également stimuler les cellules endothéliales aboutissant à une agrégation plaquettaire et à une thrombose intravasculaire instantanée des vaisseaux du greffon, provoquant la nécrose de ce dernier avant toute revascularisation.

Le rejet hyperaigu est aujourd'hui évité dans la quasi-totalité des cas grâce à l'étude des antécédents des patients et à leurs typages HLA avant la greffe.

b- Le rejet aigu.

Le rejet aigu résulte d'une immunisation post-transplantation du receveur contre les alloantigènes du donneur présents dans le greffon. Il peut être à la fois médié par l'immunité adaptative cellulaire et humorale, et peut donc mettre plusieurs jours à survenir (en moyenne, une dizaine de jours après la transplantation). Le diagnostic est effectué par analyse histologique de l'organe greffé : le rejet aigu cellulaire est caractérisé par une infiltration massive de lymphocytes T et de macrophages et par des lésions tissulaires faisant l'objet d'une classification internationale (Marks and Finke, 2006). Dans le cas d'un rejet aigu humoral, le diagnostic s'effectue sur la présence d'immunoglobulines et de protéines du complément

(principalement C4d) au niveau des zones fibrotiques vasculaires entourant le greffon et d'anticorps anti-donneur circulants retrouvés dans le sérum (Racusen et al., 2003).

L'implication des lymphocytes dans le rejet d'allogreffe a été mise en lumière très tôt dans l'histoire de la transplantation. Au début des années 1950, Avrion Mitchison et son équipe ont démontré par des expériences de transfert adoptif que les lymphocytes, contrairement aux anticorps sériques seuls, transmettaient les réponses de rejet des greffes allogéniques (Mitchison, 1955). Le rôle des lymphocytes T dans le rejet d'allogreffe a été démontré, plus tardivement, grâce aux souris nude, dépourvues de thymus et donc de cellules T fonctionnelles et incapables de rejeter des allogreffes de peau (Rygaard, 1974).

La réponse immune adaptative à l'origine du rejet aigu cellulaire s'établit dans un contexte de reconnaissance des alloantigènes du donneur par le système immunitaire du receveur. Elle s'inscrit dans un schéma « classique » de réponse immunitaire à médiation cellulaire. La première étape, dites de sensibilisation, résulte de la reconnaissance des alloantigènes du donneur par les lymphocytes T naïfs au niveau des organes lymphoïdes secondaires (OLS). Plusieurs voies de reconnaissance des alloantigènes (ou alloreconnaissance) par les lymphocytes T ont été décrites (Siu et al., 2018) (*Figure 4*) :

- la reconnaissance directe, pour laquelle les complexes CMH/peptide à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du donneur vont être reconnus par le TCR (T cell receptor) des lymphocytes T du receveur. Cette voie de reconnaissance, propre à la transplantation, conduit à une différenciation efficace des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T cytotoxiques.
- la reconnaissance indirecte, pour laquelle les alloantigènes du donneur (principalement les molécules du CMH) sont processés, à partir de corps apoptotiques et nécrotiques ou de protéines solubles, par les CPA du receveur et présentés à leur surface dans un contexte classique de présentation CMH du soi/peptide du non-soi.
- la reconnaissance semi-directe, plus récemment décrite, pour laquelle un transfert de molécules de CMH allogéniques intactes s'opèrent entre CPA du donneur et CPA du receveur, aboutissant à une reconnaissance directe de molécules de CMH allogéniques à la surface des CPA du receveur.

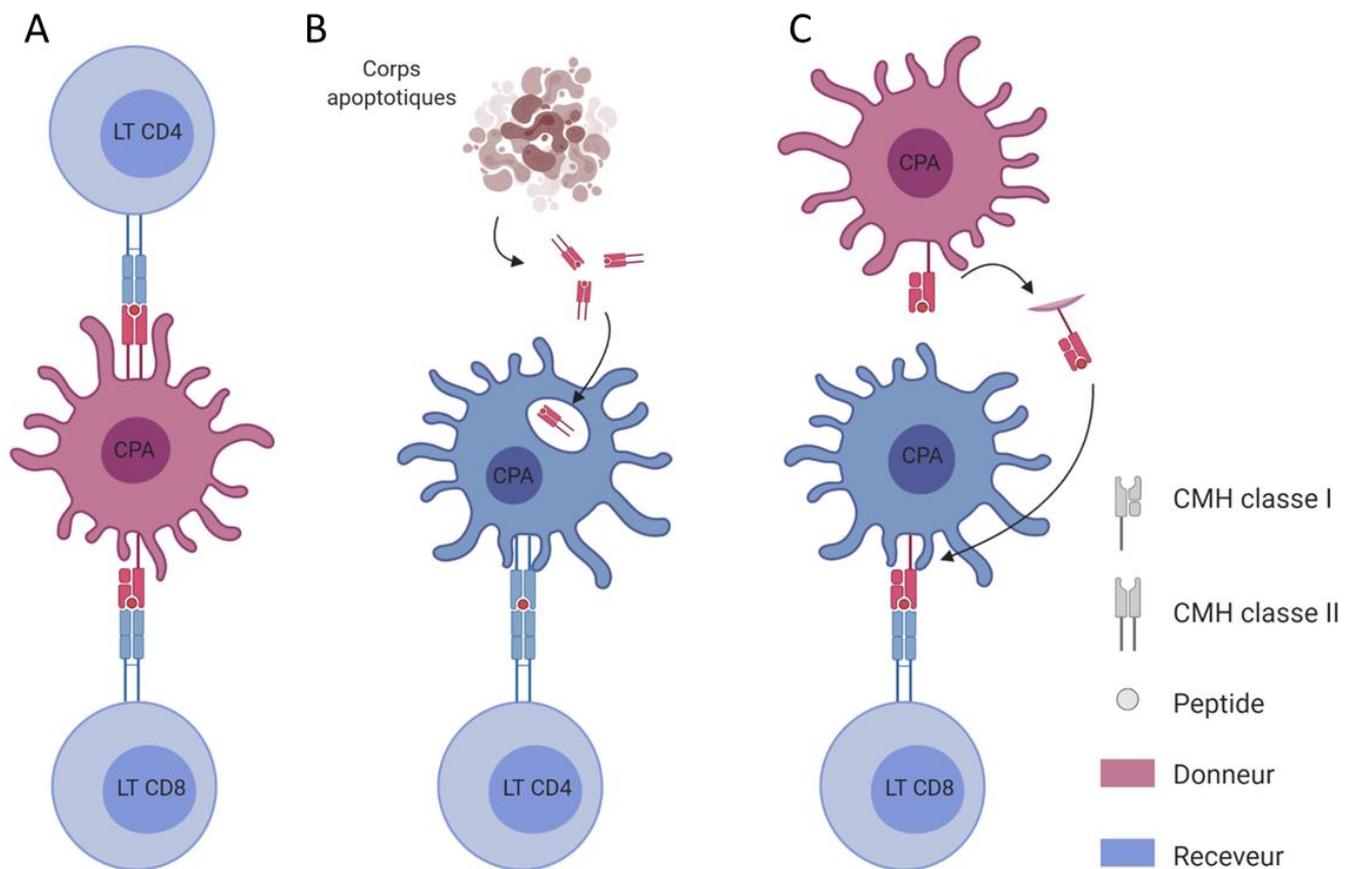


Figure 4 : Les voies de reconnaissance des alloantigènes en transplantation. (A) La voie directe implique une reconnaissance des molécules de CMH allogéniques à la surface des CPA du donneur par les lymphocytes T du receveur. (B) La voie indirecte implique une présentation de peptides dérivés des alloantigènes du donneur à la surface des CPA du receveur, reconnus par les lymphocytes T du receveur. (C) La voie semi-directe implique un échange de membrane entre CPA du donneur et du receveur, aboutissant à une reconnaissance par les lymphocytes T du receveur des molécules du CMH du donneur à la surface des CPA du receveur.

L'implication de ces différentes voies de reconnaissances dans la mise en place du rejet de greffe est un sujet largement étudié (Siu et al., 2018) que je ne développerai pas d'avantage dans ce manuscrit.

S'ensuit une phase effectrice où les cellules T activées, spécifiques des alloantigènes du donneur, infiltrent massivement le greffon en libérant des molécules pro-inflammatoires et cytotoxiques aboutissant à des lésions tissulaires. Bien que la réponse immunitaire à médiation cellulaire soit considérée depuis de nombreuses années comme prédominante dans le rejet aigu de greffe, il est désormais admis que la réponse humorale y joue également un rôle crucial (Terasaki, 2003). Il a fallu attendre la fin des années 1990, et le développement de lignées de souris déficientes en cellules B pour pleinement établir le rôle des lymphocytes B et des alloanticorps dans le développement du rejet aigu de greffe (Brändle et al., 1998;

Wasowska et al., 2001). La réponse immunitaire innée joue également un rôle important dans le développement du rejet d'allogreffe, en particulier dans les phases précoces de rejet, lié à des dommages tissulaires importants au niveau du greffon induisant une forte inflammation (He et al., 2002, 2003).

Grâce aux traitements immunosuppresseurs inhibant de façon aspécifique le système immunitaire du receveur, moins de 15% des patients transplantés vont aujourd'hui développer des épisodes de rejet aigu dans les premiers jours suivant la transplantation (Port et al., 2004).

c- Le rejet chronique

Si les rejets précoces de type hyperaigu et aigu sont aujourd'hui bien caractérisés et contrôlables, le rejet chronique dont les premiers signes cliniques peuvent mettre plusieurs mois ou années à survenir, est quant à lui la première cause de perte du greffon (Matas et al., 2002; Pascual et al., 2002). La dégénérescence progressive du greffon associée au rejet chronique se caractérise par une fibrose interstitielle importante et par des vasculopathies chroniques résultant, entre autres, d'un épaissement de l'intima et d'une fibrose des muscles lisses (Mennander et al., 1993; Ramzy et al., 2005; Kloc and Ghobrial, 2014). De plus, certaines complications physiopathologiques peuvent survenir, aboutissant à un dysfonctionnement de l'organe greffé comme le rétrécissement des voies biliaires associé au rejet chronique de greffe de foie (Graziadei et al., 2006) ou l'atrophie tubulaire associée au rejet chronique de greffe rénale (Schelling, 2016). Si ses origines sont encore mal comprises, il est néanmoins admis que le rejet de greffe chronique résulterait d'une intensification progressive de l'inflammation présente au niveau du greffon depuis la transplantation ou installée au cours d'épisodes de rejets aigus mal contrôlés. Le seul traitement au rejet chronique est la retransplantation, avec des risques accrus de récurrence sur le deuxième greffon. Ainsi, l'effort est aujourd'hui porté sur le diagnostic préventif, et la mise en place de traitements adaptés afin de contrôler les épisodes de rejet aigu.

1.1.3. Les traitements immunosuppresseurs en transplantation

a- Historique

C'est au début des années 1960 que l'immunosuppression non-spécifique médicamenteuse va commencer à voir le jour en transplantation. Avant cela, les seuls succès de greffes étaient restreints aux greffes autologues ou syngéniques entre jumeaux homozygotes. La fin des années 50 permis néanmoins d'outrepasser la barrière immunitaire individuelle qui semblait jusqu'alors infranchissable : des succès relatifs de greffes allogéniques sont observés chez l'animal après irradiation corporelle (le plus souvent léthale) suivi d'une greffe de moelle osseuse du donneur d'organe, posant là les bases du chimérisme hématolymphopoiétique (Main and Prehn, 1955; Mannick et al., 1959).

En 1960, les stéroïdes et la 6-Mercaptopurine (dont on retiendra le nom de son analogue synthétique : l'azathioprine) font leur apparition dans le traitement immunosuppresseur du receveur de greffe rénale en association avec l'irradiation corporelle. Entre un dosage hasardeux de la 6MP et une irradiation corporelle encore non-maitrisée, les premiers essais se soldèrent majoritairement par des échecs. Nous retiendrons néanmoins le succès de René Küss qui, en 1961, témoignera le premier d'une survie supérieure à un an d'un greffon rénale allogénique en associant la 6MP à une irradiation corporelle allégée (Kuss and Legrain, 1961). À partir de 1963, de nombreux essais d'immunosuppressions médicamenteuses vont émerger autour du sérum antilymphocytaire associé à des corticoïdes ou à l'azathioprine, permettant une amélioration des résultats de survie du greffon rénal jusqu'à 50% à 10 ans. Le début des années 1980 marqua un tournant historique dans l'histoire de l'immunosuppression en transplantation avec la découverte de la cyclosporine A qui, malgré sa néphrotoxicité, va permettre une augmentation de 15% de la survie des greffons rénaux fonctionnels à 10 ans, et de 35% (de 40 à 75%) de la survie des greffons cardiaques fonctionnels à 5 ans. S'ensuivit la découverte et la démocratisation de nombreux immunosuppresseurs tels que le mycophénolate mofétil (MMF), le tacrolimus, le sirolimus ou plus récemment les anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules de costimulations. Leurs utilisations combinées, parallèlement à l'amélioration de la compréhension des mécanismes de rejet de greffe, permettent aujourd'hui un contrôle efficace du rejet aigu de greffe mais reste globalement inefficace dans le rejet chronique.

b- Principaux traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation.

Les traitements immunosuppresseurs font l'objet d'une classification complexe et mouvante. On distingue : les agents biologiques des agents pharmacologiques ; les thérapies à large spectre, ou visant un type cellulaire particulier ; les traitements d'inductions ou de maintenance (Barshes et al., 2004; Allison, 2016). En transplantation, les traitements immunosuppresseurs les plus efficaces sont ceux inhibant la prolifération et la fonction des lymphocytes T, acteurs principaux du rejet de greffe. Pour cela, de nombreuses molécules, récepteurs et voies de signalisation peuvent être ciblées. On distingue notamment :

- les anticalcineurines, inhibant la protéine intracytosolique du même nom, impliquée en aval de la signalisation TCR, dont l'activation entraîne l'augmentation de la synthèse d'Interleukine-2 (IL-2), cytokine stimulant l'activation et la prolifération lymphocytaire. Les principaux membres de cette famille sont la cyclosporine A et le tacrolimus.

- les antimétabolites, des agents immunosuppresseurs non-spécifiques inhibant la synthèse *de novo* des bases puriques nécessaires au cycle cellulaire et à la prolifération des cellules. Les principaux membres de cette famille sont l'azathioprine, le méthotrexate et le mycophénolate mofétil (MMF).

- les corticostéroïdes, également agents immunosuppresseurs non-spécifiques, inhibent le système immunitaire à de nombreux niveaux : inhibition de la production de cytokines lymphoprolifératives (IL-1, IL-6 et IL-2) ; inhibition de l'expression de molécules d'adhésion ; inhibition de l'apprêtement antigénique au niveau des CPA ; inhibition de la production de médiateurs inflammatoires (leukotriènes, prostaglandines, histamine) (Coutinho and Chapman, 2011). Les principaux corticostéroïdes utilisés en transplantation sont la méthylprednisolone, la prednisolone et la prednisone.

- les agents immunosuppresseurs biologiques, aujourd'hui principalement représentés par les anticorps monoclonaux, vont cibler des populations cellulaires spécifiques. Historiquement, les premiers agents biologiques utilisés en cliniques pour diminuer le rejet de greffe sont les sérums anti-lymphocytaires polyclonaux (Starzl et al., 1967), produits par immunisation de sérums de chevaux avec des lymphocytes humains. Les sérums anti-lymphocytaires induisent, après injection, la déplétion rapide des lymphocytes circulants par divers phénomènes immunologiques incluant principalement l'opsonisation dépendante du complément et la

cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ou « ADCC » pour *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). Ce traitement, bien qu'ayant évolué, est toujours utilisé de nos jours en traitement d'induction. Depuis, le développement des techniques de productions d'anticorps monoclonaux a permis à la fois l'augmentation de la spécificité des anticorps envers les lymphocytes T et la diminution de la toxicité liée à l'injection d'un sérum animal. Les principaux anticorps monoclonaux utilisés en immunosuppression aujourd'hui sont dirigés contre la molécule CD3 présente à la surface des lymphocytes T (OKT3), contre la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (CD25) et plus récemment, contre les molécules de costimulation CD80/86 présentes à la surface des CPA (Belatacept), inhibant ainsi l'activation et la prolifération des cellules T.

Les principaux traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation pour inhiber la réponse T sont résumés en *Table 2* et leurs mécanismes d'actions illustrés en *Figure 5*. Cette liste n'est pas exhaustive et il existe de plus de nombreux agents immunosuppresseurs visant d'autres types cellulaires tels que le Rituximab induisant une déplétion efficace des lymphocytes B.

Table 2 : Principaux traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation. FKBP12 : FK506 binding protein 12 ; mTOR : mechanistic target of rapamycin ; 6MP : 6-mercaptopurine ; MPA : mycophenolic acid ; DC : cellule dendritique ; Tregs : lymphocytes T régulateurs ; IL-2 : interleukine-2 ; CPA : cellules présentatrices de l'antigène.

Nom	Famille	Mécanisme d'action	Effets indésirables	Ref
Agents pharmacologiques				
Cyclosporine A	Inhib. Calcineurine	Se lie à la cyclophiline A et inhibe la calcineurine	Hypertension, neurotoxicité, néphrotoxicité, diabète, hyperplasie gingivale, hyperlipidémie, intolérance au glucose, hypomagnésémie	Randak, 1990 Rao, 1995 Chow, 1999
Tacrolimus (FK-506)	Inhib. Calcineurine	Se lie à la protéine FKBP12 et inhibe la calcineurine	Hypertension, neurotoxicité, néphrotoxicité, diabète, alopecie, intolérance au glucose, hypomagnésémie, hyperkalémie	Liu, 1991 Bierer, 1993
Sirolimus (Rapamycine)	Inhib. mTOR	Se lie à la protéine FKBP12 et inhibe mTOR et l'activité cellulaire	Thrombopénie, diabète, pneumonie, troubles gastro-intestinaux, ulcères aphteux	Dumont, 1995 Ballou, 2008
Azathioprine	Antimétabolites	Métabolisé en 6MP inhibant la synthèse des bases puriques <i>de novo</i>	Pancytopenie, nausée, vomissement, diarrhée, pancréatite, hépatotoxicité, alopecie	Elion, 1972 Maltzman, 2003
Mycophénolate mofetil (MMF)	Antimétabolites	Métabolisé en MPA inhibant la synthèse des bases puriques <i>de novo</i>	Troubles gastro-intestinaux, cytopénie.	Wu, 1994
Méthylprednisolone Prednisone	Corticostéroïdes	Multiplés: anti-inflammatoire, immunosuppressive, lymphotoxique	Hypertension, prise de poids, nécrose osseuse, ostéoporose, hyperglycémie, diabète, myopathie proximale, trouble de l'humeur, psychose, ulcère gastroduodénal, glaucome, cataracte, insuffisance surrénale, infection	Steiner, 2011
Agents biologiques				
ATG	Sérum polyclonal	Déplétion des cellules T, modulation de l'expression des molécules d'adhésion, apoptose de sous-type B, interfère avec les fonctions des DC, induction de Tregs.	Anaphylaxie, fièvre, état gripal, thrombopénie, infections	Mohty, 2007
Anti-CD25 (Basiliximab)	Anticorps mono.	Inhibe la signalisation de l'IL-2 et donc l'activation et la prolifération des cellules T.	Hypotension, hypersensibilité, tachycardia, bronchospasme, œdème pulmonaire, infection	Soullilou, 1990 Ponticelli, 2014
Anti-CD80/86 (Belatacept)	Anticorps mono.	Se lie aux molécules de co-stimulation CD80/86 présentes à la surface des CPA, bloquant ainsi le signal 2 nécessaire à l'activation et à la prolifération des lymphocytes T.	<i>À l'étude.</i> Infection, syndrome lymphoprolifératif post-greffe	Satyananda, 2014 Perez, 2018

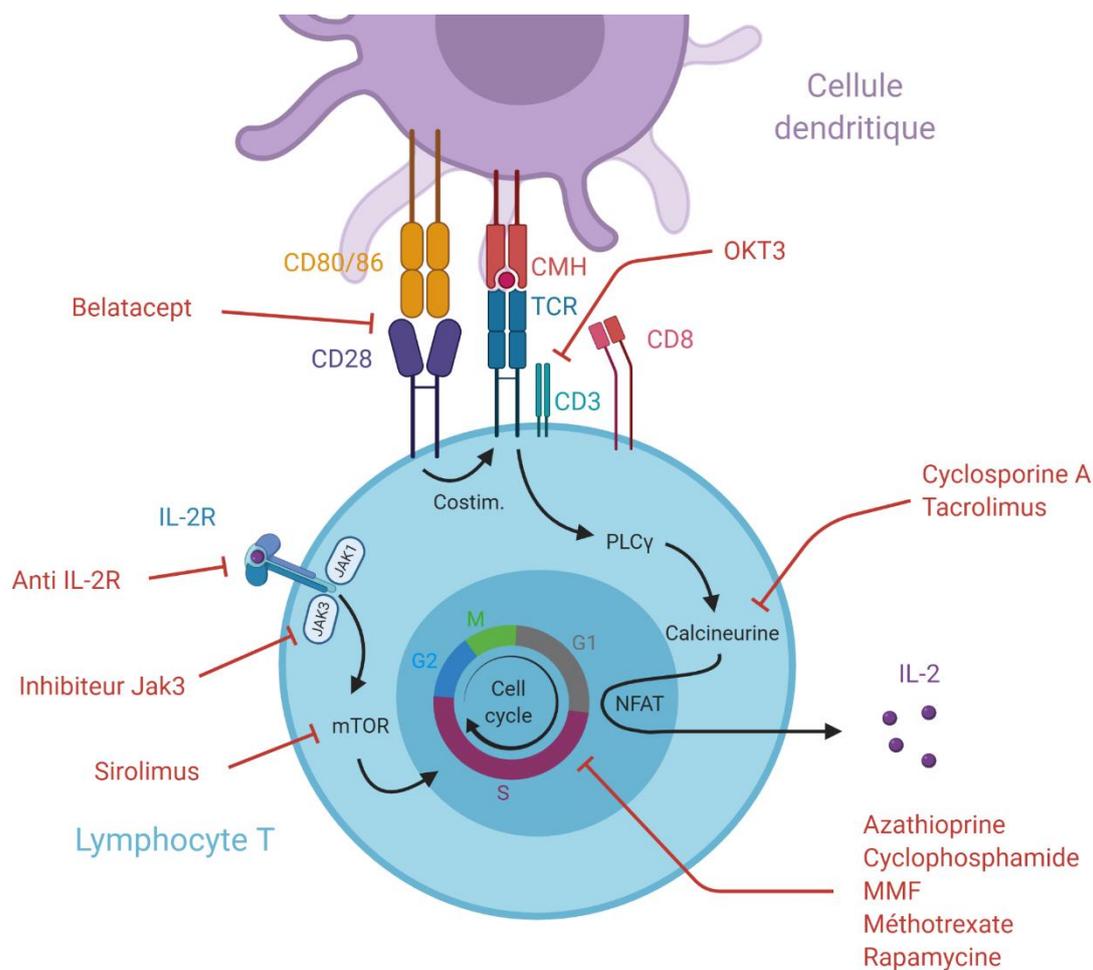


Figure 5 : Mécanismes d'actions des principaux traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation. CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; TCR : T-cell receptor ; mTOR : mechanistic target of rapamycin ; 6MP : 6-mercaptopurine. MPA : mycophenolic acid ; Tregs : lymphocytes T régulateurs ; IL-2R : récepteur à l'interleukine-2 ; PLCγ : phospholipase Cγ ; NFAT : nuclear factor of activated T-cells. MMF : mycophénolate mofetil. Jak : janus kinase.

Afin d'obtenir une immunosuppression efficace, ces différents traitements sont associés en fonction de leurs propriétés pharmacodynamiques et à la réponse du patient à la transplantation. Ainsi, la plupart des thérapies immunosuppressives vont comporter un agent pharmacologique de type corticostéroïdes, en phase d'induction principalement, associé par exemple à un inhibiteur de la calcineurine, à un métabolite et/ou à un anticorps monoclonal.

Si les traitements immunosuppresseurs ont permis une augmentation considérable de la survie du greffon dans les premières années, les effets indésirables associés sont aujourd'hui bien caractérisés (*Table 2*). En effet, les agents pharmacologiques, de par leur large champ d'action sur le système immunitaire, peuvent induire de nombreux bouleversements physiopathologiques. On notera notamment le développement de cancer, associé à

l'immunodépression et à la baisse de l'immunosurveillance, 3 à 5 fois plus élevée dans la population transplantée (Marcén, 2009; Jiyad et al., 2016). Le risque de contracter des infections virales est également augmenté pour les infections à CMV, EBV et virus BK, mais aussi pour les infections pulmonaires, du système nerveux central ou encore certaines infections fongiques (Fishman, 2017). On notera également le développement de maladies cardiovasculaires et d'insuffisances hépatique et rénale (Marcén, 2009). Ces complications sont largement corrélées au rejet chronique du greffon. À titre d'exemple, la prise d'inhibiteurs de la calcineurine au long cours est associée à une survenue plus importante de néphropathie chronique d'allogreffe rénale (Vincenti et al., 2005; Jacquet et al., 2008), première cause de perte du greffon rénale (Matas et al., 2002; Pascual et al., 2002).

C'est pourquoi l'effort est aujourd'hui porté sur le développement de nouveaux agents immunosuppresseurs, tels que les anticorps monoclonaux, plus spécifiques d'un type cellulaire et donc moins toxique à l'échelle de l'organisme. Des stratégies alternatives aux traitements immunosuppresseurs en transplantation sont également à l'étude : la thérapie cellulaire à l'aide de cellules régulatrices ou encore l'induction d'une tolérance spécifique des alloantigènes du donneur par thérapie génique.

1.2. La tolérance immunologique

1.2.1. Généralités et historique

En immunologie, la tolérance se caractérise par une absence ou un faible niveau de réponse immunitaire envers un antigène. En condition physiologique, le système immunitaire d'un individu sain ne développe pas de réaction agressive vis-à-vis de ses tissus ou de ses cellules. Néanmoins, il est établi que tout individu sain héberge également des lymphocytes qualifiés « d'autoréactifs » dirigés contre des antigènes du soi. La prolifération de ces lymphocytes auto-réactifs peut aboutir à l'apparition de maladies auto-immunes. On distingue :

- La tolérance centrale, qui aboutit à l'élimination des lymphocytes B et T immatures autoréactifs dans les organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus).
- La tolérance périphérique, seconde barrière de la tolérance immunologique, assure que les lymphocytes autoréactifs matures ayant échappé à l'élimination par la tolérance centrale

n'induisent pas de maladies auto-immunes en périphérie. Elle permet aussi de contrôler les réactions immunitaires envers certains alloantigènes afin que celles-ci ne soient pas disproportionnées et n'entraînent pas d'effets délétères sur l'organisme.

Historiquement, la tolérance immunologique est décrite pour la première fois en 1945 par le Dr Ray D. Owen. Il observa que des jumeaux dizygotiques (donc génétiquement différents) bovins partageant le même placenta présentaient un chimérisme stable de leurs globules rouges (Owen, 1945), mettant ainsi en lumière un phénomène de tolérance de l'organisme envers des cellules étrangères et donc par extension, envers des antigènes du non-soi. Des travaux menés quelques années plus tard par Medawar, Billingham et Brent confirment la possibilité d'induire une tolérance au non-soi en biaisant le répertoire lymphocytaire d'un système immunitaire encore immature. Ils démontrèrent que l'injection *in utero* d'un inoculat de splénocytes allogéniques à des fœtus de souris permet la tolérisation d'une greffe allogénique de peau provenant de la même souche de souris que les splénocytes. Inspirés de ces travaux, F. Burnet et F. Fenner établirent la théorie de la délétion des lymphocytes auto-réactifs (aujourd'hui appelé délétion clonale), qui valut à Fenner de partager avec Medawar le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 1960.

En transplantation, la tolérance immunologique fait intervenir des mécanismes différents qu'en conditions physiologiques ou dans les maladies auto-immunes car les antigènes du greffon ne sont, au vu des différences génétiques entre donneur et receveur, pas considérés comme des antigènes du soi. La tolérance en transplantation sera abordée à la fin de cette partie.

1.2.2. La tolérance centrale

Le concept de tolérance centrale fait référence à la délétion des lymphocytes auto-réactifs immatures avant leur sortie des organes lymphoïdes primaires. Dans le thymus, les cellules épithéliales médullaires thymiques (mTEC ou *medullary thymic epithelial cells*) présentent à leur surface des complexes CMH-peptide du soi sous le contrôle du facteur de transcription AIRE (*autoimmune regulator*) (Derbinski et al., 2001; Passos et al., 2018). Les lymphocytes T immatures (thymocytes) reconnaissant les complexes CMH-peptide du soi avec une forte affinité seront délétés par induction d'apoptose ou inactivés (on parle d'anergie). Une reconnaissance d'affinité intermédiaire du complexe CMH-peptide pourra entraîner la

différentiation des lymphocytes T auto-réactifs en lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg), qui en périphérie, pourront exercer des mécanismes suppresseurs afin d'inhiber les lymphocytes auto-réactifs ayant échappé à la sélection négative (participant ainsi à la tolérance périphérique). Enfin, une absence de reconnaissance des complexes CMH-peptide du soi entrainera la survie des cellules et leur sortie du thymus, on parle de sélection négative. Cette étape de l'éducation lymphocytaire est cruciale dans les mécanismes de préventions de l'auto-immunité. La sélection négative des lymphocytes B immatures dans la moelle osseuse est sensiblement similaire à celle des lymphocytes T (LeBien and Tedder, 2008).

1.2.3. La tolérance périphérique

La tolérance périphérique prend place au niveau des tissus périphériques et des ganglions lymphatiques. Elle implique de nombreux mécanismes et types cellulaires et agit comme un deuxième verrou permettant de contrôler les réactions immunitaires au sein de l'organisme. La tolérance centrale et la sélection négative des thymocytes n'étant pas parfaites, certains lymphocytes auto-réactifs pourront y échapper et induire, s'ils ne sont pas contrôlés, des réactions auto-immunes. Comme énoncé ci-dessus, les lymphocytes nTreg dérivés du thymus vont exercer leur potentiel suppressif en périphérie pour contrôler ces réponses auto-immunes. Des LT_{Regs} sont également induits en périphérie, par différenciation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes T régulateurs (iTreg pour *induced regulatory T cells*) (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Qu'ils soient naturels ou induits, les LT_{Regs} sont définis par un phénotype bien précis : ce sont des lymphocytes CD4⁺ qui expriment fortement la sous-unité alpha du récepteur à l'IL-2 (CD25) ainsi que le facteur de transcription Foxp3 (*forkhead box P3*), responsable du développement et des propriétés régulatrices de ces cellules (Fontenot et al., 2003; Hori, 2003). De nombreuses populations de lymphocytes CD8⁺ régulatrices ont également été décrites, tant chez l'homme que chez l'animal, et seront développées plus bas. Bien que les LT_{Regs} jouent un rôle majeur dans la tolérance périphérique, d'autres types cellulaires peuvent être impliqués tels que les lymphocytes CD4⁺ Tr1 (*type 1 regulatory T cells*), via la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire Interleukine-10 (IL-10) (Chihara et al., 2016). Des populations de cellules dendritiques (ou DC pour *dendritic cells*) régulatrices ont également été décrites chez l'homme (Sato et al., 2003) et la souris (Fujita et al., 2006). Ces cellules expriment fortement les molécules du CMH mais très faiblement les signaux de costimulation CD40, CD80 et CD86, conduisant à une activation incomplète des lymphocytes

T et à leurs anergies. D'autres mécanismes tels que l'anergie et l'épuisement participent à la régulation des lymphocytes auto-réactifs et des réactions immunitaires exacerbées en périphérie. Ces mécanismes seront développés en fin de partie.

a- Les lymphocytes CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ régulateurs

L'implication des LT_{Regs} CD4⁺ dans la tolérance immunologique a été mise en lumière en 1995 par M. Toda et son équipe (Sakaguchi et al., 1995). Ils démontrèrent dans un modèle de souris *nude* que l'injection de LT_{Regs} CD4⁺ CD25⁺ (le facteur de transcription Foxp3 n'ayant pas encore été découvert) prévenait l'apparition de maladies auto-immunes (thyroïdite, gastrite, pancréatite, polyarthrite, etc) développées après injection de lymphocytes CD4⁺ CD25⁻. Il faudra attendre 2003 pour que l'expression du facteur de transcription Foxp3 soit associée au développement et aux propriétés régulatrices des LT_{Regs} CD4⁺ (Fontenot et al., 2003). Depuis, les LT_{Regs} CD4⁺ (naturels et induits) sont habituellement caractérisés par leur phénotype CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, et représente la première population cellulaire régulatrice étudiée en immunologie.

Les LT_{Regs} CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ contrôlent les réactions auto-immunes en périphérie, en inhibant la signalisation et la prolifération des lymphocytes T auto-réactifs par de nombreux mécanismes impliquant ou non un contact cellulaire direct (Shevach, 2009) (*Figure 6*) :

- par la production de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), l'IL-10 ou encore l'IL-35 (Bettini and Vignali, 2009).
- par relargage au contact des lymphocytes T de Granzyme B, induisant leur apoptose (Gondek et al., 2005).
- par privation de l'IL-2 aux lymphocytes T effecteurs. Les LT_{Regs} exprimant fortement le CD25 (IL-2R α), ils sont plus à même de capter l'IL-2 dans le milieu environnant que les lymphocytes T effecteurs, les privant ainsi des signaux de survie, prolifération et activation associés aux voies de signalisation de l'IL-2 et induisant leur apoptose (Pandiyani et al., 2007).

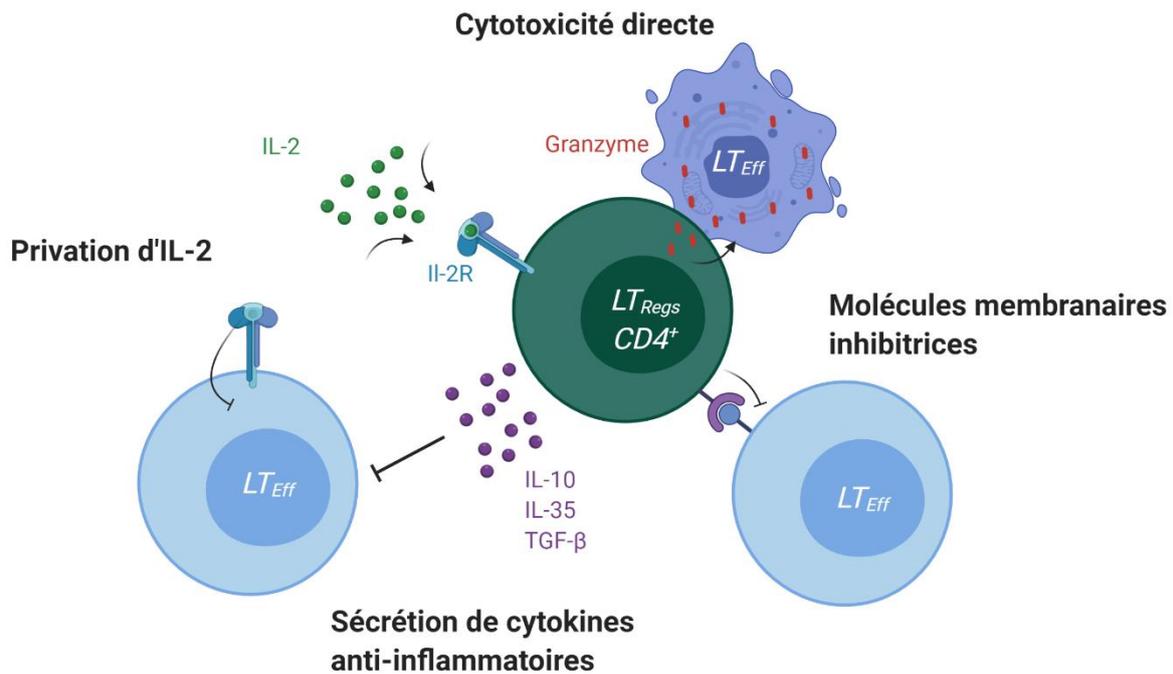


Figure 6 : Mécanismes majeurs de suppression directe des lymphocytes CD4⁺ régulateurs envers les lymphocytes T activés. On distingue notamment : la privation de la cytokine pro-inflammatoire IL-2, la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, l'IL-35 ou le TGF- β , l'expression à leur surface de molécules inhibitrices telles que la Galectine-1, et la cytotoxicité directe par relargage de granzyme au contact des lymphocytes T.

- par expression à leur surface de la molécule inhibitrice Galectine-1, appartenant à la famille des β -galactoside binding proteins qui peut se lier à de multiples glycoprotéines. L'implication de la Galectine-1 dans l'activité suppressive des LT_{Regs} a été démontrée par des expériences de blocages de cette molécule à l'aide d'un anticorps monoclonal, qui entraîne une inhibition de leur capacité suppressive *in vitro* (Garín et al., 2007).

Les lymphocytes CD4⁺ régulateurs peuvent également réprimer indirectement l'activation des cellules T en bloquant la fonction des cellules présentatrices d'antigènes (principalement les DC) (Shevach, 2009) (Figure 7) :

- par l'expression constitutive à leur surface du récepteur inhibiteur CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*), qui se lie aux protéines CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2) à la surface des CPA et leur transmet un signal inhibiteur. Cette interaction aboutit notamment à la down-régulation des protéines CD80 et CD86, impliquées dans la costimulation des lymphocytes T (Misra et al., 2004; Sakaguchi et al., 2009).

- par la régulation du taux d'ATP (adénosine triphosphate) circulante au niveau des sites inflammatoires. En effet, les lymphocytes Tregs expriment fortement les enzymes CD39 et CD73 permettant l'hydrolyse de l'ATP (adénosine monophosphate) en adénosine. Si l'ATP est largement décrite comme pro-inflammatoire, l'adénosine permet au contraire de polariser la différenciation des DC vers un phénotype tolérogène, notamment par une diminution de leur capacité à stimuler la prolifération des cellules mais également en induisant la sécrétion d'IL-10 (Silva-Vilches et al., 2018).

- par l'expression de molécules inhibitrices telles que LAG-3 (*lymphocyte-activation gene 3*), qui se lie aux molécules de CMH de classe II à la surface des DC immatures et induit un signal inhibiteur qui empêche la maturation des DC et leur capacité de stimulation des cellules T (Liang et al., 2008). L'expression de la neuropiline par les lymphocytes Tregs jouerait également un rôle dans leur activité régulatrice en séquestrant les DC immatures par interactions prolongées, empêchant ainsi leur accès aux cellules effectrices (Sarris et al., 2008).

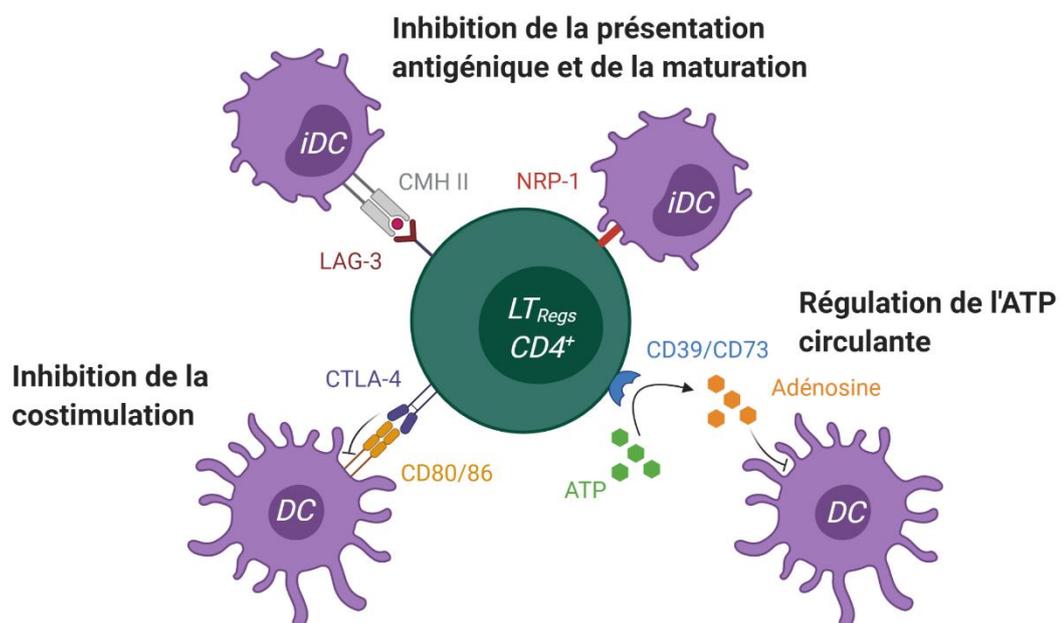


Figure 7 : Mécanismes régulateurs majeurs des lymphocytes $CD4^+$ régulateurs envers les cellules dendritiques. On distingue notamment : l'expression de molécules inhibitrices telles que le CTLA-4 ou encore la protéine LAG-3, la régulation du taux d'ATP circulante et l'expression de la neuropiline (NRP-1) induisant des contacts prolongés avec les DC. iDC : cellules dendritiques immatures.

Chez l'homme, le syndrome IPEX (*Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*), est une maladie héréditaire qui résulte de mutations ponctuelles du gène codant pour le facteur de transcription Foxp3 aboutissant à un défaut en lymphocytes T CD4⁺ régulateurs (Verbsky and Chatila, 2013; Bacchetta et al., 2018). Cela conduit à l'apparition de syndromes auto-immuns multiples tels que des dermatites importantes (eczéma, psoriasis – Nieves et al., 2004), des entéropathies sévères (Moes et al., 2010) ou encore des atteintes rénales (Sheikine et al., 2015). Cette pathologie permet de mettre en évidence le rôle clé des lymphocytes CD4⁺ régulateurs dans la régulation de l'auto-immunité chez l'homme. Un modèle similaire de souris a été découvert en 1949, nommé Souris *Scurfy* en raison de l'apparence squameuse de leur pelage, liée aux dermatites auto-immunes développées (Sharma et al., 2009).

b- Les lymphocytes CD8⁺ régulateurs.

Si les LT_{Regs} CD4⁺ sont aujourd'hui bien caractérisés et décrits comme acteurs majeurs de la tolérance immunologique, c'est pourtant les lymphocytes CD8 qui ont été étudiés les premiers pour les capacités régulatrices de certaines sous-populations (Gershon and Kondo, 1970). Néanmoins, l'hétérogénéité phénotypique de ces populations et le manque de marqueurs membranaires discriminants ont mis sous silence l'étude de ces cellules durant de nombreuses années. En effet, il faudra attendre près de 30 ans pour que LT_{Regs} CD8⁺ réapparaissent au sein des travaux de recherche (Noble et al., 1998). Aujourd'hui de nombreuses populations de LT_{Regs} CD8⁺ ont été identifiées aussi bien chez l'homme que dans des modèles animaux. Ainsi, même si de nombreuses populations ont été décrites dans des travaux sur l'auto-immunité, les maladies infectieuses ou encore en cancérologie, je développerai davantage sur les LT_{Regs} CD8⁺ étudiés dans un contexte de transplantation, au plus proche de mon sujet de thèse. Dans ce contexte, le rôle des lymphocytes régulateurs est de contrôler les réactions allogéniques à l'origine du rejet de greffe.

Il est intéressant de noter que le facteur de transcription Foxp3, responsable du caractère régulateur des LT CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ n'est pas exprimé par toutes les sous-populations de LT_{Regs} CD8⁺, suggérant des mécanismes régulateurs indépendants. Cela complique l'analyse de ces sous-populations, dont le phénotype tend parfois à se rapprocher d'un phénotype épuisé ou mémoire par l'expression de marqueurs tels que PD1 ou CD44. Ainsi l'appellation

« régulateur » découlera le plus souvent de tests fonctionnels *in vitro* ou de modèles *in vivo* démontrant le potentiel suppressif de la population étudiée.

Malgré une apparente hétérogénéité, les $LT_{\text{Regs}} CD8^+$ partagent des mécanismes suppressifs avec les $LT_{\text{Regs}} CD4^+$ « conventionnels » (Bézie et al., 2018a) (Figure 8). On retrouve notamment l'inhibition de la fonction des LT effecteurs et des CPA par des mécanismes similaires au $LT_{\text{Regs}} CD4^+$: *via* l'expression de protéines membranaires inhibitrices telles que CTLA-4 (Jarvis et al., 2008; Zheng et al., 2013) ou PD1 (Dai et al., 2010; Le Guen et al., 2017) ou par la sécrétion de facteurs solubles telles que les cytokines anti-inflammatoires IL-10 (Shi et al., 2009; Dai et al., 2014), IL-34 (Bézie et al., 2015) et TGF- β (Mangalam et al., 2012). Les sous-populations de $LT_{\text{Regs}} CD8^+$ exprimant fortement les sous-unités du récepteur à l'IL-2 (CD25 et/ou CD122) peuvent, similairement au $LT_{\text{Regs}} CD4^+$, induire des perturbations métaboliques par privation d'IL-2 dans le milieu environnant (Létourneau et al., 2009). L'activité cytolytique directe des $LT_{\text{Regs}} CD8^+$ a également été démontré dans certaines sous-populations, par l'expression de la perforine (Lu et al., 2008; Mu et al., 2017) ou encore du ligand du récepteur de mort Fas (Liu et al., 2015; Akane et al., 2016).

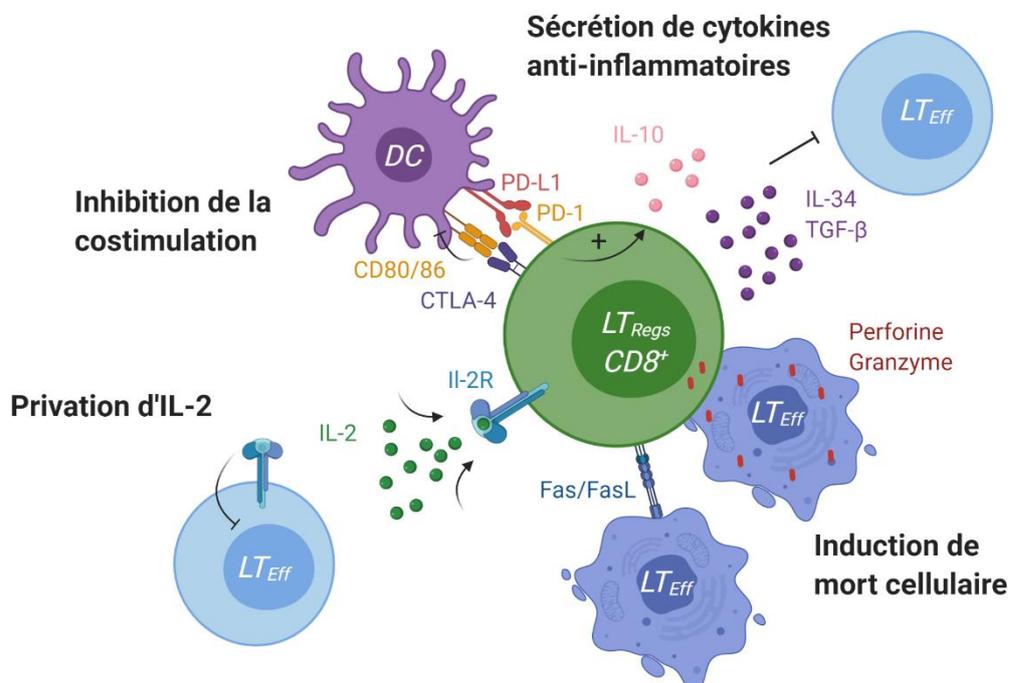


Figure 8 : Mécanismes régulateurs majeurs des lymphocytes $CD8^+$ régulateurs sur le système immunitaire. On distingue notamment : l'inhibition de la costimulation par les DC via l'interaction CTLA-4/CD80-86, la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-34, le TGF- β ou l'IL-10, l'induction de la mort cellulaire et la privation de la cytokine pro-inflammatoire IL-2.

Un récapitulatif des principales populations lymphocytaires CD8 régulatrices identifiées dans un contexte de transplantation est présenté en *Table 3*.

Chez la souris, il a été démontré que la population de $LT_{\text{Regs}} CD8^+ Foxp3^- CD122^+ CD28^+ PD1^+ CD127^-$ naturellement présente dans la rate de souris C57Bl/6 permet la suppression, largement médiée par l'IL-10 (dont la production est favorisée par l'engagement des protéines PD1 et CD28) de LT_{Eff} aussi bien *in vitro* que *in vivo* dans un modèle de greffe de peau allogénique (Dai et al., 2010). Un modèle murin de GVHD (*graft versus host disease*) a également permis de mettre en évidence l'expansion (dépendante de l'IL-2 et de TGF- β) d'une population de $LT_{\text{Regs}} CD8^+ Foxp3^+ CD25^+ CD122^+ CTLA-4^+$, dérivés des cellules du donneur, dans les OLS de la souris receveuse, la protégeant contre la GVHD (Sawamukai et al., 2012). Dans notre équipe, nous avons démontré chez la souris que l'injection d'un vecteur viral hépatospécifique codant pour une molécule de CMH allogénique entraînait l'expansion d'une population de $LT_{\text{Regs}} CD8^+ Foxp3^- CD25^+ CD122^+ PD1^+ CD44^+ CD69^+$ sécrétant d'IL-10, uniquement dans le foie des souris. Ces cellules permettent notamment la prise d'une greffe d'îlots pancréatiques allogéniques portant la molécule de CMH transférée (Le Guen et al., 2017). Ces travaux, préliminaires aux miens, seront développés dans une partie indépendante.

Dans un modèle de souris humanisée, la population de $LT_{\text{Regs}} CD8^+ Foxp3^+ CD45RC^{\text{low}}$, sécrétant de l'IL-10, de l'IL-34 et du TGF- β , naturellement présente dans le sang chez l'homme, améliore grandement la prise de greffe de peau humaine et retarde le développement de la GVHD après injection de PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) humaines (Bézie et al., 2018b). Des résultats similaires, également obtenus dans un modèle de souris humanisée, démontrent que les $LT_{\text{Regs}} CD8^{\text{high}} Foxp3^+ CD25^+$, dérivés *in vitro* à partir de $LT CD8^+$ naïfs humains en présence de LB (*lymphocytes B*) allogéniques pré-activés par interaction CD40/CD40L, permettent un contrôle de la GVHD (Zheng et al., 2013). Enfin, Kwekkeboom et son équipe ont eux démontré que l'incubation de pDC (*cellule dendritique plasmacytoïde*) allogéniques humaines sur des lymphocytes $CD3^+$ circulants entraînait la différenciation de ces derniers en $LT_{\text{Regs}} CD8^+ Foxp3^+ LAG-3^+ CTLA-4^+$ qui exerce une activité suppressive *in vitro*, dépendante de CTLA-4, sur les lymphocytes effecteurs et mémoires (Boor et al., 2011).

Bien que largement décrit en transplantation, les $LT_{\text{Regs}} CD8^+$ sont aussi étudiés dans des contextes auto-immuns. Une étude récente, menée par Saligrama et collaborateurs a par

exemple permis de démontrer, dans un modèle murin d'EAE, le potentiel régulateur d'une population CD8 régulatrice vis-à-vis de LT CD4⁺ Ag-spécifiques pathogéniques (Saligrama et al., 2019). Dans cette même étude, une oligoclonalité CD8 est retrouvée chez des patients atteints de sclérose en plaques (SEP), similairement au modèle murin d'EAE, suggérant l'existence d'une population régulatrice CD8 impliquée dans le contrôle de la SEP chez l'homme. D'autres populations CD8 régulatrices, qu'il serait trop long de détailler dans ce manuscrit, se retrouvent impliquées dans le contrôle de pathologies auto-immunes telles que le lupus érythémateux disséminé (Zhang et al., 2009), la cholangite biliaire primitive (Bernuzzi et al., 2010) ou encore le diabète de type 1 (Shimokawa et al., 2020). Il convient également de mentionner les nombreux travaux effectués sur les populations CD8 régulatrices restreintes aux molécules de CMH-I non-conventionnelle Qa-1 chez la souris, HLA-E chez l'homme, également impliqués dans le contrôle de l'auto-immunité et développées plus bas (Kim and Cantor, 2011).

La multiplicité des populations de LT_{Regs} CD8⁺, et des modèles dont elles sont issues, rendent leur comparaison compliquée, d'autant plus que les marqueurs utilisés pour les décrire sont multiples et peu discriminants. Si l'étude transcriptomique, rendue possible par le développement des outils de séquençage à haut débit, permet une caractérisation beaucoup plus exhaustive d'une population cellulaire ; très peu de populations régulatrices CD8⁺ ont aujourd'hui fait l'objet d'une telle analyse. Cela faciliterait pourtant leur comparaison (par le biais de méta-analyse par exemple) et la mise en lumière de nouvelles voies de régulation importantes, qui échappent souvent à l'analyse phénotypique cantonnée la plupart du temps à une dizaine de marqueurs.

Table 3 : Les différentes populations de LT_{Regs} CD8⁺ décrites chez le rongeur et l'homme dans un contexte de transplantation. MLR : réaction lymphocytaire mixte ; TLR : récepteur de type Toll ; IFN γ : interféron gamma.

Espèce	Phénotype	Modèle	Origine	Caractérisation fonctionnelle	Référence
Souris	CD8 ⁺ Foxp3 ⁻ CD122 ⁺ CD28 ⁺ PD1 ⁺ CD127 ⁻	Allogreffe de peau	Périphérique (rate)	Production d'IL-10 dépendante de la signalisation PD1 et CD28	(Dai, 2010)
Souris	Foxp3 ⁺ CD25 ⁺ CD103 ⁺ CTLA-4 ⁺ CD122 ⁻ CD62L ⁻ CD28 ⁻	Allogreffe de peau	<i>in vitro</i> : différenciation de CD8 naïfs en présence de DC allogénique + IL-2 + TGF- β	Inhibition de l'activation T, de la maturation et de la fonction des DC. Induction TGF- β -dépendante de LT _{Regs} CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ .	(Lerret, 2010)
Souris	CD8 ⁺ Foxp3 ⁻ CD25 ⁺ CD122 ⁺ PD1 ⁺ CD44 ⁺ CD69 ⁺	Allogreffe d'îlots pancréatiques	Expansion <i>in vivo</i> après thérapie génique	Inhibition IL-10-dépendante de la prolifération de T _{eff} <i>in vitro</i> . Signalisation PD1/PD-L1 nécessaire à l'induction de tolérance <i>in vivo</i> .	(Le Guen, 2017)
Souris	CD8 ⁺	Allogreffe cardiaque	Expansion <i>in vivo</i> (rate) après injection de LT CD4 ⁺ autologue activés.	Suppression par lyse (<i>via</i> reconnaissance de Qa-1) des lymphocytes CD4 activés.	(Long, 2017)
Souris	CD8 ⁺ CD122 ⁺ PD1 ⁺ FasL ⁺	Allogreffe de peau	Périphérique (rate)	Suppression dépendante de la voie Fas/FasL et de la production d'IL-10	(Liu, 2017)
Souris	Foxp3 ⁺ CD25 ⁺ CD44 ⁺ GITR ⁺ CTLA-4 ⁺ PD1 ⁺ CD103 ⁺	GVHD	Expansion induite en périphérie (rate, foie, colon, poumons) dès les phases précoces de GVHD.	Inhibe la prolifération des LT alloréactifs (MLR). Induction de Foxp3 dépendante de l'expression de TGF β R.	(Beres, 2012)
Souris	Foxp3 ⁺ CD25 ⁺ GITR ⁺ CTLA-4 ⁺ CD122 ⁻	GVHD	Différenciation de cellules T du donneur en LT _{Regs} CD8 ⁺ dans les OLS du receveur.	Différenciation dépendante de l'expression du TGF β -R et de l'IL-2R.	(Sawamukai, 2012)
Rat	CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ CD45RC ^{low}	Allogreffe cardiaque	Périphérique (Rate, sang). Expansion induite en périphérie après injection de CD40lg.	Suppression partiellement dépendante de l'IL-34, potentialisée par une stimulation peptidique.	(Guillonnet, 2007) (Picarda, 2014) (Bézie, 2015)
Homme	CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ CD45RC ^{low} GITR ⁺ IL-34 ⁺ IL-10 ⁺ TGF- β ⁺ IFN γ ^{int}	GVHD dans souris humanisée	Périphérique (PBMC). Expansion <i>in vitro</i> : stimulation CD3/CD28 ou CPA allogénique + IL-2 + IL-15.	Suppression (dépendante de l'IFN γ , de l'IL-10, du TGF- β et de l'IL-34) de LT CD4 ⁺ syngéniques stimulés avec CPA allogénique.	(Bézie, 2018)
Homme	CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ LAG3 ⁺ CTLA-4 ⁻	<i>in vitro</i> (MLR)	<i>in vitro</i> : différenciation de LT CD3 ⁺ totaux en LT _{Regs} CD8 ⁺ au contact de DC allogéniques préstimulées avec des ligands TLR.	Suppression dépendante de CTLA-4 de LT _{Eff} et LT _{Mém} allogéniques	(Boor, 2011)
Homme	CD8 ^{high} Foxp3 ⁺ CD25 ⁺	GVHD dans souris humanisée	<i>in vitro</i> : différenciation de LT CD8 ⁺ naïfs (PBMC) en LT _{Regs} CD8 ⁺ au contact de LB allogéniques préactivés par interaction CD40/CD40L	Prévention de GVHD dépendante de CTLA-4	(Zheng, 2013)

c- Tolérisation des lymphocytes T par anergie et épuisement.

L'anergie et l'épuisement sont deux états distincts de dysfonctions des LT, caractérisés par la perte des fonctions effectrices et de proliférations, participant ainsi activement à la mise en place de la tolérance périphérique (Figure 9).

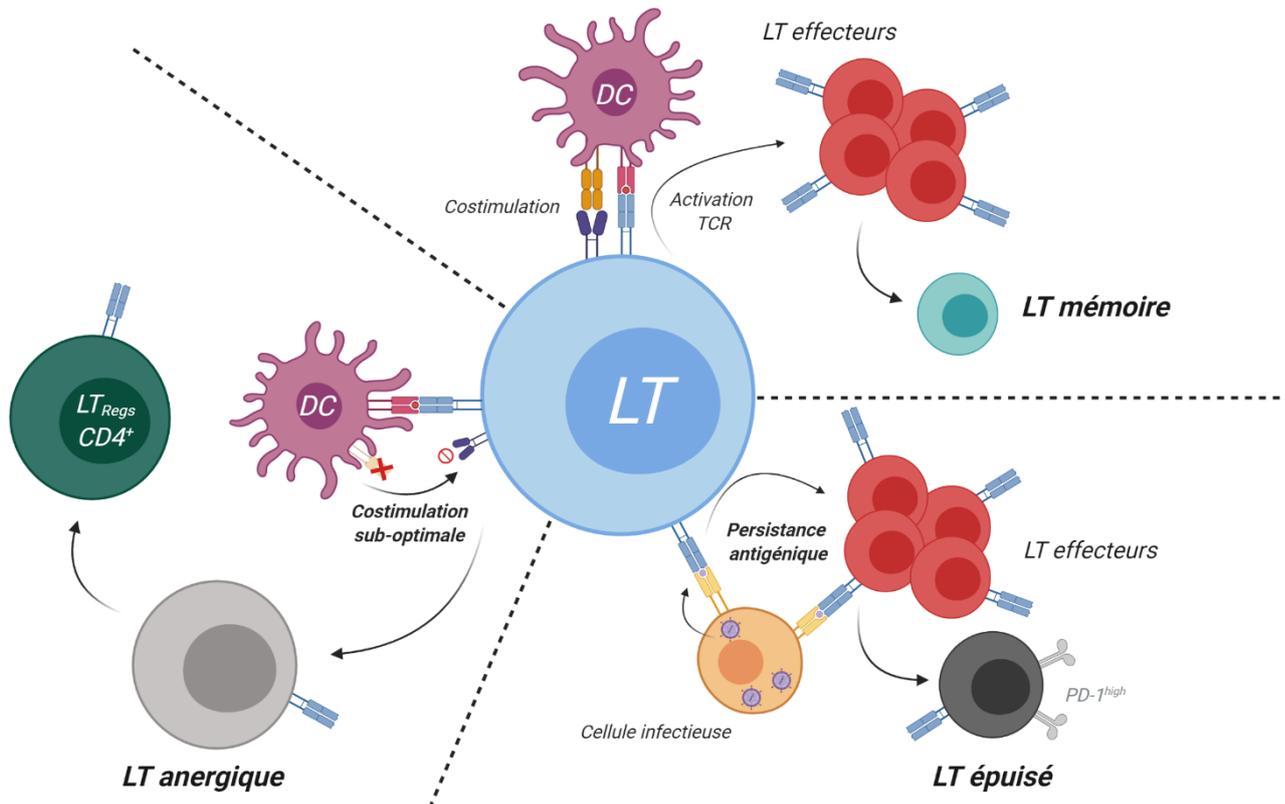


Figure 9 : La tolérisation des lymphocytes T par anergie ou épuisement. Dans un contexte inflammatoire approprié, le LT se différencie en LT effecteur après reconnaissance d'un complexe CMH-peptide associé à une costimulation optimale; puis en LT mémoire. En cas de stimulation sub-optimale, le LT ne se différencie pas en LT effecteur et entre en anergie. En cas de persistance antigénique, les LT effecteurs se différencient en LT épuisés.

L'anergie est un état de désactivation du lymphocyte T, décrit pour la première fois en 1987 lors d'expériences *in vitro* de stimulation du TCR en absence de CPA et donc de costimulation (Quill, 1987 : « long-lived state of proliferative nonresponsiveness »). Les LT anergiques sont caractérisés par leur incapacité à proliférer en réponse à un antigène et à produire des facteurs de croissance tels que l'IL-2. L'équivalent *in vivo*, appelé tolérance adaptative, résulte d'une activation incomplète du lymphocyte T par défaut de signal 2 (costimulation CD28/CD80-CD86 sous-optimale) et/ou de signal 3 (facteurs solubles, environnement cytokinique appauvri) lors de la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR (Choi and Schwartz, 2007). Les LT_{Regs} sont impliqués dans la mise en place de la tolérance

adaptative par l'expression des récepteurs inhibiteurs CTLA-4 et PD1 et la down-régulation des molécules de costimulation à la surface des CPA (Sakaguchi et al., 2009). Des sous-populations lymphocytaires CD4⁺ anergiques ont également été décrit comme capable de se différencier en précurseur de LT_{Regs} CD4⁺ Foxp3⁺ (Kalekar et al., 2016), confirmant l'implication de l'anergie dans la mise en place de la tolérance immunologique.

L'épuisement des LT est caractérisé par une diminution des capacités effectrices et prolifératives dans un contexte de persistance antigénique généralement associé à des pathologies infectieuses chroniques. Cet état de différenciation des LT a été initialement étudié chez la souris dans des modèles d'infections chroniques au LCMV (*Lymphocytic Choriomeningitis Virus*) (Gallimore et al., 1998; Zajac et al., 1998) puis chez l'homme dans des pathologies chroniques telles que l'hépatite C (Gruener et al., 2001) ou encore le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) (Day et al., 2006).

Cette persistance antigénique perturbe notamment la différenciation des cellules T en LT mémoires. Ainsi, même si les LT mémoires et épuisés partagent des marqueurs communs (*e.g.* CD69 et CD44), ces derniers se caractérisent notamment par une forte expression de molécules inhibitrices (*e.g.* PD1, LAG-3, CTLA-4) et par une très faible expression des récepteurs aux cytokines pro-inflammatoires (notamment l'IL-15 et l'IL-7) (Yi et al., 2010). De plus, contrairement au LT mémoires, la survie des LT épuisés est dépendante de la persistance de l'antigène (Wherry and Kurachi, 2015). La présence de facteurs solubles immunosuppresseurs, notamment l'IL-10 (Ejrnaes et al., 2006), et de LT_{Regs} dans le milieu inflammatoire favorise l'épuisement des cellules T.

L'épuisement et l'anergie, par l'inactivation des réponses T en périphérie, sont des mécanismes clés dans la tolérance périphérique. D'autres mécanismes, que je ne développerai pas dans ce manuscrit, telles que la déviation immune, l'ignorance ou encore la ségrégation antigénique interviennent également dans la mise en place de la tolérance périphérique.

1.2.5. La tolérance en transplantation

a- Transplantation et tolérance opérationnelle

Si en condition physiologique, la tolérance immunologique sert à contrôler les réactions auto-immunes en périphérie, elle va également jouer un rôle important en transplantation dans la régulation des réactions immunitaires aboutissant au rejet de greffe. La différence fondamentale entre l'auto-immunité et la transplantation d'organes réside dans le caractère allogénique de cette dernière. Ainsi, la tolérance au soi, normalement mise en place par l'éducation lymphocytaire et limitant les réactions auto-immunes en périphérie, ne sera d'aucun secours pour réguler les réactions immunitaires dirigés contre les antigènes du non-soi du greffon. Cela résulte finalement du bon fonctionnement de notre système immunitaire. La conséquence de cela est que le système immunitaire du receveur devra être biaisé afin d'accepter un greffon allogénique. La principale stratégie utilisée dans ce but aujourd'hui est de diminuer l'efficacité globale du système immunitaire grâce aux traitements immunosuppresseurs (*cf.* partie 1.1.3). Néanmoins au vu des nombreux effets indésirables liés à ses traitements, l'effort de recherche est aujourd'hui axé sur l'induction d'une tolérance dites « opérationnelle ». En transplantation, la tolérance opérationnelle est définie par une perte de réponse spécifique anti-donneur couplée au maintien d'un système immunitaire efficace (excluant ainsi les traitements immunosuppresseurs). En clinique, des cas de tolérances opérationnelles spontanées sont parfois observées après arrêts des traitements supprimeurs (dans le cas de développement de cancer ou maladies infectieuses ou de problème d'adhésion du patient). En transplantation rénale, cela ne représente que 0,03% des patients transplantés, associé à une très bonne survie du greffon et fonction rénale (Massart et al., 2016). En transplantation hépatique, le contexte est tout à fait différent. En effet, des études cliniques récentes démontrent que, en fonction du protocole de sevrage et des patients sélectionnés, près de 50% des patients transplantés font état d'une tolérance opérationnelle après arrêt des traitements immunosuppresseurs (Feng et al., 2012; Benítez et al., 2013; de la Garza et al., 2013; Bohne et al., 2014). Cet état de tolérance immunologique mis en place lors d'une greffe hépatique résulterait des capacités tolérogènes du foie qui seront discutées plus bas. Il a également été démontré que la greffe hépatique, effectuée simultanément à une autre greffe, favorisait la prise des deux greffons. Historiquement, les

premiers travaux démontrant cela ont été menés par R.Y. Calne et son équipe, dans des modèles porcins de double greffe foie-peau et foie-rein (Calne et al., 1969). Cette induction de tolérance allogénique résultant de l'allogreffe hépatique s'expliquait pour eux par le relargage d'antigènes d'histocompatibilité tolérogènes par le foie greffé, éduquant ainsi le système immunitaire à tolérer ces antigènes du non-soi. S'ensuivirent les travaux de Kamada chez le rat, qui démontra ce même bénéfice sur des doubles greffes foie-peau (Kamada et al., 1980), foie-coeur (Kamada and Wight, 1984) et foie-rein (Kamada, 1985). Des études cliniques récentes chez l'homme démontrent également l'effet protecteur de la greffe hépatique sur la greffe rénale si celles-ci sont effectués simultanément (Chava et al., 2009; Simpson et al., 2006). Des résultats similaires sont obtenus lors de greffes combinées foie-cœur (Yamaguchi et al., 2020).

Ces données cliniques et précliniques démontrent d'une part qu'une induction de tolérance allogénique est possible chez l'homme et d'autre part que les propriétés tolérogènes du foie permettent d'induire cette tolérance allogénique à l'échelle systémique. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de cette induction de tolérance allogénique sont encore mal compris.

Néanmoins, dans le cas où le foie d'un patient n'est pas touché par une défaillance organique quelconque, il est éthiquement compliqué d'envisager une greffe combinée incluant une transplantation hépatique, même si celle-ci contribuerait à une meilleure prise d'un greffon rénale ou cardiaque. Ainsi, de nouvelles stratégies d'induction de tolérance telles que le chimérisme hématopoïétique ou encore la thérapie cellulaire par injection de cellules régulatrices, sont à l'étude et présentent des résultats très encourageants.

b- Induction d'un chimérisme hématopoïétique en transplantation

L'induction d'un chimérisme hématopoïétique est rendu possible par la transplantation simultanée, après conditionnement par irradiation du receveur, de moelle osseuse et d'un organe du même donneur. Les cellules souches présentes dans la moelle osseuse permettent de reconstituer le système immunitaire du donneur chez le receveur. Ainsi, le greffon allogénique n'est pas reconnu par le système immunitaire dérivé de la moelle du donneur, diminuant largement les risques de rejet même dans des contextes d'histocompatibilité défavorables. Comme mentionné plus haut, les premiers travaux d'induction d'un chimérisme

hématopoïétique en transplantation remontent aux années 50 (Main and Prehn, 1955) par des expériences de greffe de peau et de moelle osseuse allogénique chez la souris après irradiation. Plus récemment, des études cliniques ont démontré le potentiel de cette stratégie chez l'homme, principalement en transplantation rénale. Trois grandes équipes américaines (Boston, Chicago et Stanford) travaillent activement sur ce sujet et démontrent des résultats cliniques très encourageants chez des patients conditionnés ayant reçu une double greffe moelle osseuse-rein, et tolérant pour certains les deux greffons en absence de traitements immunosuppresseurs au long cours (Mahr et al., 2017). Ces essais cliniques diffèrent principalement par leurs protocoles de conditionnement du receveur (irradiation) et de la moelle osseuse du donneur, du traitement immunosuppresseur utilisé en induction ainsi que du degré de disparité génétique sur les locus HLA entre donneur et receveur (en anglais « *mismatch-HLA* »). L'induction d'un chimérisme hématopoïétique présente cependant des risques importants liés notamment à l'irradiation corporelle totale utilisée pour le conditionnement du receveur et à la survenue de GVHD après injection de moelle osseuse et reconstitution du système immunitaire du donneur.

c- La thérapie cellulaire par injection de cellules régulatrices en transplantation

Une autre approche prometteuse pour induire une tolérance immunologique en transplantation se base sur l'injection d'une grande quantité de cellules régulatrices autologues (principalement des $LT_{Reg}s$ $CD4^+$) après la transplantation afin de contrôler les réactions immunitaires aboutissant normalement au rejet d'un greffon allogénique tout en diminuant les traitements immunosuppresseurs. Ces stratégies sont rendues possibles par l'amélioration des protocoles d'expansion *in vitro* des $LT_{Reg}s$ permettant de conserver leur phénotype et surtout leurs fonctions suppressives (MacDonald et al., 2019). De nombreux essais cliniques se portent aujourd'hui sur l'induction d'une tolérance allogénique par injection de cellules régulatrices dans des contextes de transplantations rénales mais également hépatiques (Atif et al., 2020). On notera notamment l'étude One Study, visant à comparer l'utilisation de différentes populations de cellules régulatrices en transplantation rénale, dont la première méta-analyse vient d'être publiée et présente des résultats prometteurs avec une prise de greffe comparable aux groupes contrôles sous traitements immunosuppresseurs au long cours mais sans les effets secondaires associés à ceux-ci (Sawitzki et al., 2020). En transplantation hépatique, les résultats sont également

encourageants : Todo et al. ont par exemple démontré qu'une injection de $LT_{\text{Regs}} CD4^+$ autologues cultivés pendant 14 jours en présence de lymphocytes irradiés du donneur et d'anticorps bloquant les molécules de costimulations CD80 et CD86, et injectés 13 jours après la greffe de foie permettait la diminution voir l'arrêt de tous traitements immunosuppresseurs à terme tout en conservant une fonction hépatique optimale (Todo et al., 2016).

Il est intéressant de noter qu'à ce jour, aucun essai clinique de thérapie cellulaire basé sur des $LT_{\text{Regs}} CD8^+$ n'a été mis en place, aussi bien en transplantation que dans un contexte auto-immun. Cela s'explique encore une fois par l'hétérogénéité de ces populations, compliquant l'identification et la caractérisation de ces cellules, tandis que leur pendant $CD4^+$ est aujourd'hui largement étudié et caractérisé. Néanmoins, un premier essai clinique, nommé « Eight-Treg trial » et supporté par le consortium ReSHAPE et dont la phase I est prévu pour 2021 a pour objectif d'évaluer l'intérêt des $LT_{\text{Regs}} CD8^+ Foxp3^+ CD45RC^{\text{low}}$ (décrit par l'équipe de C. Guillonnet à Nantes : Bézie et al., 2018b) en thérapie cellulaire chez des patients ayant subi une transplantation rénale (Flippe et al., 2019). Compte tenu de l'intérêt croissant porté sur les $LT_{\text{Regs}} CD8^+$ et des résultats prometteurs chez l'animal, nous pouvons nous attendre à voir émerger dans les années à venir de multiples essais cliniques de thérapies cellulaires basés sur ces populations $CD8^+$ régulatrices, au même titre que les lymphocytes $CD4^+$ voir en co-injection au vu des synergies décrites entre ces différentes sous-populations T régulatrices (Heinrichs et al., 2016).

Bien que la thérapie cellulaire soit une stratégie encourageante en transplantation, son utilisation ne peut pour le moment pas s'affranchir d'un traitement immunosuppresseur d'induction. Cela s'explique notamment par un manque d'efficacité globale pour moduler les réponses immunes, très fortement polarisées vers un profil pro-inflammatoire lors des phases précoces du rejet de greffe. La thérapie cellulaire est également limitée par des problèmes d'ordres logistique (infrastructures adaptées) et financier (coûts de production élevés) ayant trait à l'expansion des cellules régulatrices qui doit répondre à un cahier des charges stricte et permettre une reproductibilité optimale entre les différents centres d'études.

Les différentes problématiques liées à l'induction d'un chimérisme hématopoïétique ou à la thérapie cellulaire démontrent bien que l'induction d'une tolérance opérationnelle en transplantation n'en est qu'à ses débuts, et qu'il est vraisemblable que de multiples stratégies

voient le jour dans les années à venir afin d'améliorer encore un peu plus le pronostic du patient transplanté en s'affranchissant progressivement des traitements immunosuppresseurs.

Partie 2 : Détournement du potentiel tolérogène du foie par thérapie génique

Le foie est le plus gros organe de notre système digestif et est impliqué dans plus de 300 fonctions garantissant le bon fonctionnement de notre organisme. Il est notamment connu pour ses fonctions d'épuration du sang, de synthèse d'un grand nombre de protéines circulantes, et de stockage de glucose et autres micronutriments essentiels. Il est aujourd'hui également admis que le foie est un organe largement impliqué dans le système immunitaire.

Cette seconde partie a pour objectif de développer le potentiel tolérogène du foie, et l'intérêt de cibler cet organe dans le développement de nouvelles stratégies d'induction de tolérance par thérapie génique. Dans un premier temps, j'introduirai le rôle central du foie dans l'organisme et son implication dans le système immunitaire. J'aborderai ensuite les différentes stratégies d'induction de tolérance immunologique par transfert de gènes dans le foie, des modèles animaux aux réussites cliniques. Enfin, je terminerai cette partie par la présentation des travaux de mon équipe portant sur l'induction d'une tolérance immunologique en transplantation, par transfert dans le foie d'un gène codant pour une molécule de CMH allogénique.

2.1. Le foie, un organe tolérogène

2.1.1. Généralités et anatomie du foie

Le foie est un organe central chez l'homme, par son volume (plus gros organe chez l'homme) mais surtout par ses fonctions multiples et essentielles au bon fonctionnement de notre organisme. On distingue notamment ses fonctions nutritionnelles dans les métabolismes lipidique et glucidique, de détoxification sanguine, de synthèses d'hormones, de protéines et de facteurs sériques, de production de la bile et de renouvellement des érythrocytes. Placé juste sous le diaphragme, le foie est composé chez l'homme de 4 lobes de tailles inégales (5 chez la souris) eux-mêmes divisés en lobules hépatiques, entre lesquels s'insèrent des espaces portes composés des branches de la veine porte hépatique et de l'artère hépatique ainsi que des canaux biliaires. Le foie fait l'objet d'une vascularisation singulière car il représente l'un

des deux systèmes porte de notre organisme (*Figure 10*). En effet, l'apport sanguin du foie est assuré à la fois par l'artère hépatique, amenant le sang oxygéné, et par la veine porte ramenant le sang issu de la rate, du tube digestif et du pancréas, riche en nutriments et en antigènes alimentaires et bactériens dérivés de la flore intestinale (Berg, 1999).

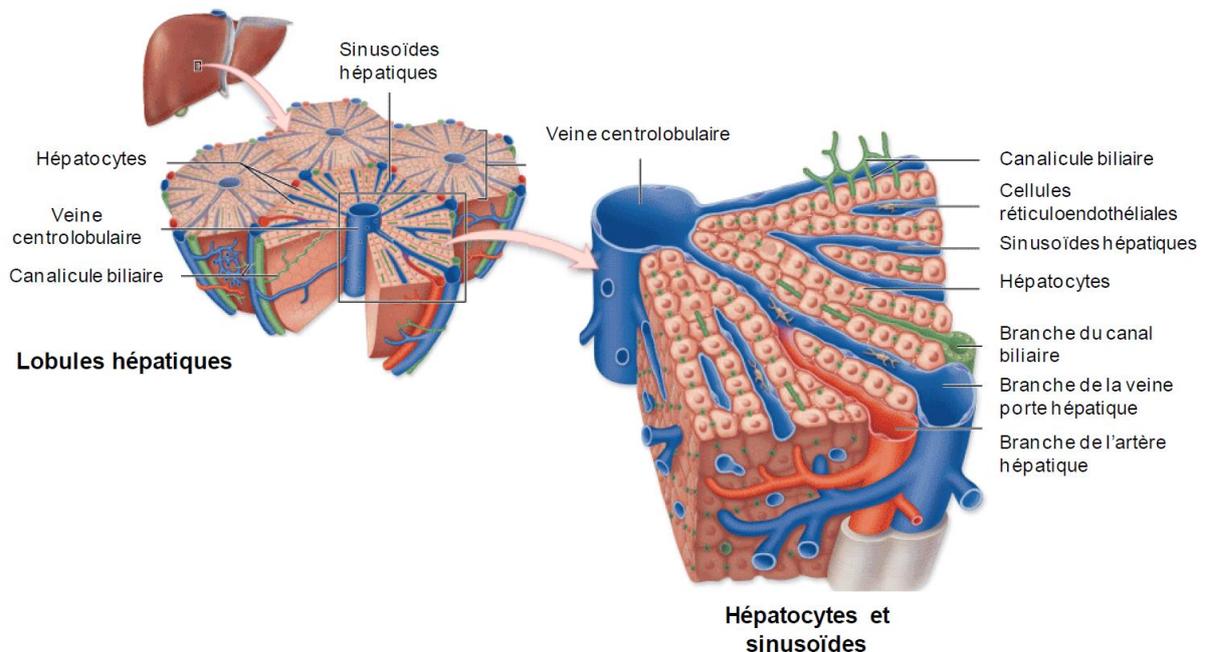


Figure 10 : Microanatomie hépatique chez l'homme. Le foie se compose de 4 lobes, eux-mêmes divisés en lobules hépatiques ponctués d'espaces portes. Point de rencontre de la veine porte, acheminant un sang riche en nutriments et antigènes provenant du tractus digestif ; et de la veine cave, acheminant le sang détoxifié dans la circulation générale ; le foie représente l'un des deux systèmes portes de notre organisme. D'après Mescher and Junqueira, "Junqueira's basic histology: text and atlas", 2013.

Le sang portal et veineux se mélange dans de petits vaisseaux, appelés sinusoides hépatiques, drainant la totalité des lobules et cheminant entre les travées hépatocytaires avant de se réunir au niveau d'une veine centrolobulaire. C'est au cours de son trajet dans le foie que le sang sera détoxifié par des mécanismes enzymatiques et d'oxydation mais également par l'action conjointe de plusieurs populations cellulaires. Les veines centrolobulaires rejoignent ensuite les veines hépatiques qui acheminent le sang désoxygéné et « nettoyé » vers la veine cave inférieur afin que celui-ci rejoigne la circulation générale. Ainsi, le foie est capable de drainer et nettoyer près de 2000 litres de sang par jour, ce qui en fait un lieu de rencontre privilégié entre cellules immunitaires circulantes et antigènes provenant du système porte.

Le foie est composé à plus de 80% de cellules parenchymateuses, parmi lesquelles l'hépatocyte est la cellule la plus largement représentée (près de 80% du volume hépatique

totale) et assure l'essentiel des fonctions métaboliques et d'épuration du sang. Les hépatocytes sont des cellules complexes, parfois binucléées, quiescentes et différenciées dans un foie au repos mais capable d'un potentiel prolifératif inégalé dotant le foie de son extraordinaire capacité de régénération ayant forgé le mythe de Prométhée. Les hépatocytes sont séparés de la circulation sanguine par une barrière endothéliale fenestrée formée par les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques (ou *LSEC* pour *liver sinusoidal endothelial cells*). Entre cette barrière endothéliale et les hépatocytes se trouve un espace appelé espace de Disse, siège de nombreuses cellules immunitaires hépatiques qui seront développées plus bas.

2.2.2. Le foie : un environnement immunitaire particulier

Le foie, en plus de ses fonctions métaboliques et physiologiques, se voit également largement impliqué dans le système immunitaire notamment par la présence constante de cellules immunitaires et de nombreux antigènes du non-soi provenant du tractus digestif et acheminés par le système porte. Ces antigènes, dérivés de métabolites alimentaires ou bactériens provenant de la flore intestinale, suffiraient à induire une forte inflammation dans un contexte immunitaire classique mais pas dans le foie, qui possède pourtant tous les acteurs essentiels à la mise en place d'une réponse immune efficace. En effet, en condition physiologique, le foie est un organe largement orienté vers la tolérance, qui, par un ensemble de mécanismes évolutifs et d'interactions complexes entre différents acteurs immunitaires, ne développera pas de réponse immune à l'encontre d'antigènes alimentaires ou bactériens sans danger pour l'organisme, protégeant ainsi l'organe d'une inflammation perpétuelle et inutile (Kubes and Jenne, 2018). Le foie sera néanmoins capable de développer des réponses immunes dans des contextes pathologiques particuliers tels que des infections virales ou des charges bactériennes importantes liées à des pathologies digestives par exemple. Cette balance immunologique, finement régulée par de nombreux acteurs immunitaires, peut présenter des dysfonctionnements aboutissant à des inflammations chroniques liées à des réactions immunitaires exacerbées ou au contraire à la mise en place d'infections chroniques par excès de tolérance.

Il est également intéressant de constater que les propriétés tolérogènes du foie jouent un rôle essentiel dans l'établissement d'une tolérance immunologique à l'échelle systémique. Les

résultats des greffes combinées mentionnés un peu plus haut en sont la principale illustration : le foie, en plus d'être facilement toléré, facilite la prise d'un autre greffon provenant du même donneur. La principale explication à cela est que les alloantigènes du donneur apportés par le foie dans un contexte tolérogène n'initieront pas de réponse immunitaire et induiront au contraire leur tolérance à l'échelle systémique. L'implication du foie dans le phénomène de la tolérance orale prouve également son potentiel dans l'induction d'une tolérance systémique. La tolérance orale, mise en lumière dans les années 1940 (Chase, 1946), est un processus permettant de limiter les réactions d'hypersensibilité envers des antigènes administrés par voie orale. L'implication du foie dans ce phénomène a été démontrée plus tardivement grâce à un modèle de dérivation portale chez le rongeur. La démonstration est simple et élégante : le développement chez le rat d'une hypersensibilité liée à l'injection sous-cutanée d'ovalbumine et d'un adjuvant est significativement altéré par l'ingestion d'ovalbumine 7 jours avant. Cette tolérance orale est abrogée chez les rats présentant une dérivation portale, empêchant la circulation hépatique d'antigènes issus du tractus digestif (Callery et al., 1989). C'est précisément cette capacité qu'a le foie à induire une tolérance systémique qui en fait une cible de choix pour de nombreuses thérapies géniques que je développerai plus bas.

2.2.3. Les cellules immunitaires du foie impliquées dans la tolérance hépatique

De nombreuses populations immunitaires siègent au sein du foie. Ces cellules contribuent à la fois à l'immunosurveillance et à l'induction de la tolérance hépatique. Parmi les cellules impliquées dans l'immunité hépatique, on retrouve des lymphocytes résidents, conventionnels ou non, des cellules dendritiques, des macrophages appelés cellules de Kupffer (ou *KC* pour *Kupffer cells*) ainsi que des cellules étoilées (ou *HSC* pour *hepatic stellate cells*). Les LSEC et hépatocytes mentionnés précédemment, joue également un rôle important dans l'induction de la tolérance hépatique. Ces populations immunitaires interagissent directement dans les sinusoides hépatiques ou au niveau de l'espace de Disse séparant le parenchyme hépatique de l'endothélium fenestré formé par les LSEC (*Figure 11*).

a- Les cellules de Kupffer

Les KC sont des macrophages résidents du foie qui représentent 35% des cellules non parenchymateuses hépatiques et plus de 80% des macrophages résidents de notre organisme

(Chen et al., 2020). Spécialisées dans la détoxification sanguine par leur fonction de phagocytose des débris cellulaires et autres toxines provenant de la veine porte, les KC sont retrouvées dans la lumière des sinusoides hépatiques, adhérentes au LSEC et au contact direct des lymphocytes circulants. Les KC, de par l'expression de molécules de CMH-I et -II et des molécules de costimulations (CD80, CD86), sont considérées comme des APC.

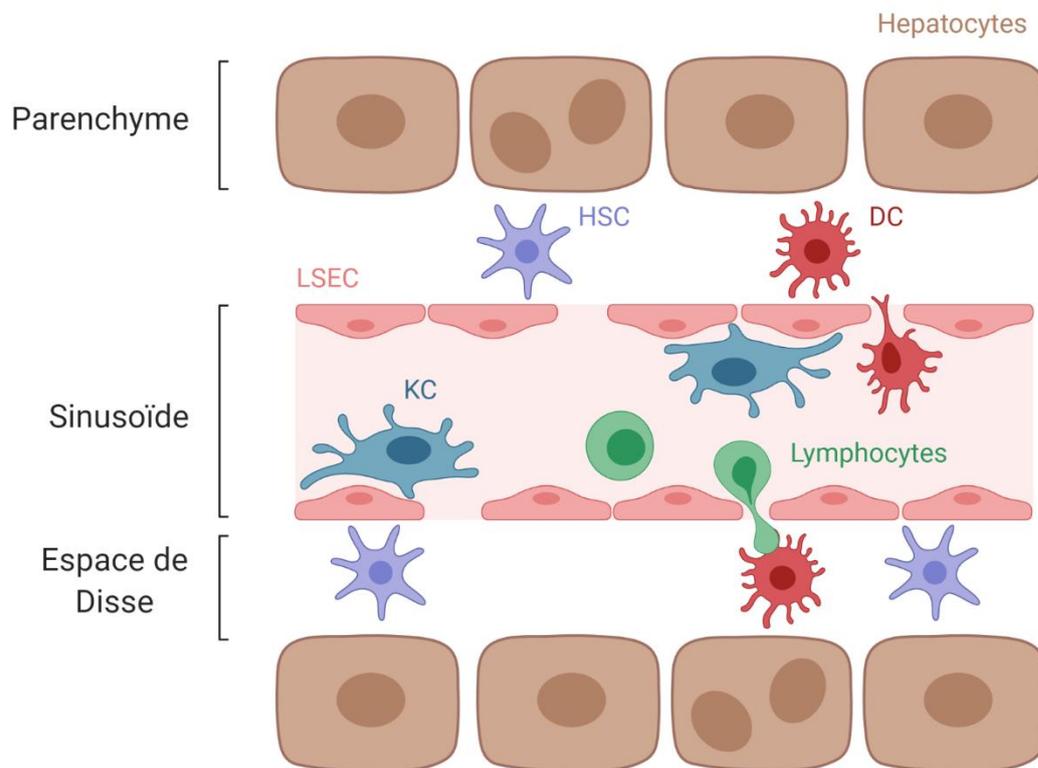


Figure 11 : Les différentes cellules immunitaires hépatiques interagissent dans les sinusoides ou dans l'espace de Disse séparant l'endothélium fenestré du parenchyme hépatique. On retrouve, les hépatocytes constituant le parenchyme hépatique, les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques (LSEC), des cellules dendritiques (DC), des lymphocytes, des cellules de Kupffer (KC) et des cellules étoilées (HSC) restreinte à l'espace de Disse.

Néanmoins, les KC jouent un rôle important dans l'induction de tolérance hépatique. En effet, elles n'expriment, en condition physiologique, que de faibles niveaux de molécules de CMH-II et de costimulation, empêchant ainsi une activation T efficace (Thomson and Knolle, 2010). Des travaux *in vitro* ont démontré en ce sens l'incapacité des KC à induire une prolifération T mais également que les KC inhibaient l'activation T normalement médié par les DC (You et al., 2008). Il a également été démontré que les KC secrètent de grande quantité d'IL-10 en réponse à un stimulus à concentration physiologique de LPS (lipopolysaccharide, composant majeur des membranes bactériennes) (Knolle et al., 1995) et secrètent également du TGF- β en

condition normale (Bissell et al., 1995). La sécrétion de ces cytokines anti-inflammatoires permet ainsi la mise en place d'un environnement tolérogène au sein des sinusoides hépatiques.

b- Les cellules dendritiques

Le foie contient une proportion importante de DC résidentes impliquées à la fois dans la mise en place d'une immunité adaptative (lors d'infections chroniques par exemple) mais également dans la tolérance hépatique. Les DC immatures accèdent au foie par la circulation porte et vont maturer au cours de leur transit dans les lobules hépatiques. Ainsi, les DC hépatiques (hDC) sont retrouvées majoritairement dans les sinusoides hépatiques, mais également dans l'espace de Disse, par transmigration au niveau des fenêtres endothéliales. Chez l'homme, deux populations majeures de hDC sont décrites : les DC myéloïdes (mDC) caractérisées par une forte expression du marqueur CD11c, et les DC plasmacytoïdes (pDC) qui expriment la chaîne alpha du récepteur à l'IL-3 (CD123) (Crispe, 2009). Chez la souris, des populations supplémentaires de hDC sont retrouvées dans le foie : les DC CD8 α ⁺ (O'Connell et al., 2000) et les NKDC NK1.1⁺ (Pillarisetty et al., 2005). Les hDC sont, au même titre que les KC, considérées comme des APC tolérogènes. En effet les hDC présentent un profil immature par comparaison au DC retrouvées dans les OLS : elles expriment faiblement les molécules de CMH-II et de costimulation (CD80 et CD86) et présentent donc des capacités de stimulations T largement diminuées (Pillarisetty et al., 2004). Les DC hépatiques ont également un profil cytokinique majoritairement anti-inflammatoire *via* la sécrétion d'IL-10, d'IL-27 et de TGF- β (Thomson and Knolle, 2010).

c- Les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques

Les LSEC constituent la barrière endothéliale fenestrée caractéristique des sinusoides hépatiques. Les LSEC présentent également des caractéristiques d'APC et sont donc largement impliqués dans le système immunitaire hépatique. Elles sont capables de phagocyter et de présenter des antigènes circulants sur des molécules de CMH-I ou -II. Elles expriment les molécules de costimations CD40, CD80 et CD86 à leur surface et sont donc capables d'activer les LT CD4⁺ et CD8⁺. Les LSEC peuvent également internaliser des antigènes et les relarguer dans l'espace de Disse par un phénomène de transcytose, favorisant le contact entre ces antigènes et les hépatocytes ainsi qu'aux cellules immunitaires présentes dans cet espace

(Jenne and Kubes, 2013). En condition physiologique, les LSEC présentent également un profil tolérogène notamment par l'expression constitutive de PD-L1 (Diehl et al., 2007), ligand du récepteur inhibiteur PD1, et du ligand du récepteur de mort Fas (Onoe et al., 2005) tous deux impliqués dans la tolérisation T.

d- Les hépatocytes

Comme introduit plus haut, les hépatocytes sont les cellules les plus représentées dans le foie, et assurent de nombreuses fonctions métaboliques, de productions de protéines et de détoxification. Ces cellules sont retrouvées dans le parenchyme hépatique et ne sont donc pas en contact direct avec la circulation sanguine. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les hépatocytes sont également capables de présenter des antigènes aux lymphocytes T (Bertolino et al., 2001; Balam et al., 2012). Une étude récente a récemment démontré par des techniques de microscopies de pointe alliant microscopie intravitale et microscopie électronique, que l'interaction hépatocyte-LT CD8⁺ était permise *in vivo* par extension cytoplasmique des LT CD8⁺ au niveau des fenestrations endothéliales (Guidotti et al., 2015)). Comme les autres APC hépatiques présentées précédemment, les hépatocytes présentent en conditions physiologiques un profil tolérogène, par l'expression de PD-L1 ainsi que de faibles niveaux de molécules de CMH-I et de costimulations et l'absence de CMH-II (Thomson and Knolle, 2010). Si les hépatocytes sont donc capables d'activer les LT CD8⁺, le défaut de costimulation induira rapidement leur apoptose (Holz et al., 2008). En condition pro-inflammatoire, les hépatocytes peuvent exprimer des molécules de CMH-II et ainsi présenter des antigènes au LT CD4⁺. Néanmoins, cela conduira à une différenciation majoritairement en lymphocytes Th2 ou en LT_{regs} contribuant à la tolérance hépatique (Wiegard et al., 2007). Il est important de noter que les hépatocytes primaires sont des cellules complexes qui présentent une faible stabilité (*ie.* morphologie, adhésion, phénotype, fonction) en culture, ce qui complique grandement leur étude *in vitro* (Severgnini et al., 2012; Shulman and Nahmias, 2012).

e- Les cellules étoilées

Les HSC, ou cellules de Ito, sont des cellules exclusivement situées au niveau de l'espace de Disse. Elles sont majoritairement décrites dans la mise en place de la fibrose hépatique en condition inflammatoire, en se différenciant en myofibroblastes producteurs de matrice

extracellulaire (Puche et al., 2013). Leur implication dans le système immunitaire hépatique est encore controversée, certaines études démontrent leur rôle à la fois dans la mise en place d'une réponse immune et dans le maintien de la tolérance hépatique. Il a par exemple été démontré dans des travaux *in vitro* que les HSC de souris activées régulaient l'activation T par des mécanismes dépendant de PD-L1 ou du récepteur de mort TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) (Yu et al., 2004; Yang et al., 2010), ou indirectement, par l'expansion spécifique de LT_{Regs} CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Jiang et al., 2008). Cependant il a été également montré que les HSC permettaient la mise en place de réponses immunitaires effectrices en induisant, par la production d'IL-15, la prolifération de cellules NKT résidentes du foie et l'activation des LT CD8⁺ par présentation croisée (Winau et al., 2007).

2.2.4. Activation et tolérisation lymphocytaire dans le foie

Le foie est donc un organe riche en cellules présentatrices d'antigènes. Étant hautement perfusé, à la fois par le système porte et l'artère hépatique, il est également continuellement exposé à un transit important de lymphocytes T circulants et d'antigènes alimentaires et bactériens. Néanmoins, le foie est aujourd'hui bien décrit comme naturellement orienté vers un profil tolérogène. Dans cette partie seront discutés les mécanismes immunologiques spécifiques au foie, liés à l'activation T et aboutissant à cet état de tolérance caractérisant l'organe.

a- Le foie, un organe lymphoïde secondaire ?

La présence d'une grande diversité de cellules capables de présenter des antigènes au sein du foie, ainsi que son architecture vasculaire particulière ont rapidement soulevé la question d'une potentielle activation T intra-hépatique à une époque où le dogme de l'activation lymphocytaire était centré sur les organes lymphoïdes secondaires.

La microscopie a largement contribué à mettre en évidence des interactions directes entre lymphocytes circulants et cellules présentatrices d'antigènes au sein du foie. Ando et collaborateurs furent les premiers à décrire de telles interactions par des observations histopathologiques, dans un modèle de souris exprimant un antigène de l'HBV (*hepatitis B virus* ou virus de l'hépatite B) à la membrane des cellules parenchymateuses (incluant les hépatocytes). Ils notèrent que dans ce modèle l'injection de LT CD8⁺ cytotoxiques spécifiques

de l'HBV induisait des dommages tissulaires important au niveau du foie mais pas dans d'autres organes (Ando et al., 1994). L'hypothèse avancée est que la barrière endothéliale sinusoidale, par ses fenestrations, permet un contact entre hépatocytes infectés et LT CD8⁺ cytotoxiques. Cette hypothèse sera confirmée en 2006 par microscopie électronique (Warren et al., 2006). Il faudra attendre 10 ans pour ensuite visualiser de telles interactions chez l'animal vivant, par microscopie intravitale, en ajoutant un contexte de spécificité antigénique (HBV) confirmant ainsi la possibilité d'une activation T intra-hépatique (Guidotti et al., 2015). Des travaux ont également démontré que des hépatocytes isolés de souris C57Bl/6 (sur fond génétique H-2b) induisaient l'activation de LT CD8⁺ spécifiques de la molécule de CMH allogénique H-2K^b (LT CD8⁺ Des-TCR) *in vitro* mais que l'absence de signaux de costimulations conduisait à leur « mort par négligence » (Bertolino et al., 1998). Des résultats similaires sont obtenus après injection de LT CD8⁺ Des-TCR dans des souris exprimant la molécule de CMH allogénique H-2K^b dans le foie (souris transgénique Met-K^b). Dans ce modèle, les LT CD8⁺ Des-TCR sont retrouvés dans le foie dans les minutes suivant l'injection, acquièrent un phénotype activé dans les 2 heures suivantes (CD69⁺) avant d'être retrouvées en périphérie, confirmant l'activation T intra-hépatique (Bertolino et al., 2001).

De nombreuses études, qu'il serait trop long de développer dans ce manuscrit, confirment l'activation potentielle de LT par les hépatocytes et autres CPA hépatiques, et conduisent aujourd'hui à envisager le foie comme un organe lymphoïde secondaire.

b- Devenir des lymphocytes T activés dans le foie

Néanmoins, l'activation T n'est que la première étape dans la mise en place de la réponse immunitaire. Ainsi, de nombreuses observations faites chez l'homme et l'animal suggèrent l'incapacité du foie à induire une réponse immune efficace. Les résultats de Bertolino et collaborateurs mentionnés un peu plus haut démontrent la capacité des hépatocytes à induire une activation des LT CD8⁺ *in vitro* mais pas leur survie. Cela va dans le sens d'observations préalablement effectuées dans différents modèles murins de tolérance hépatique (transplantation et infection chronique principalement) qui décrivent le foie comme un « cimetière » à LT (Qian et al., 1997; Nuti et al., 1998). Les infections chroniques aux HBV et HCV (*hepatitis C virus* ou virus de l'hépatite C) soulèvent également la question de l'efficacité de la réponse immune hépatique : cette chronicité est-elle due à des mécanismes évolutifs,

propres au virus, permettant son échappement immunitaire ? Ou est-elle le résultat d'une réponse immune incomplète et/ou inefficace au sein du foie ?

Il a en effet été démontré chez des patients atteints d'hépatites chroniques au HCV que les LT CD8⁺ spécifiques d'antigènes HCV retrouvés au niveau du foie présentaient un phénotype d'épuisement (*cf.* partie 1.2.3.b-), par la faible expression du récepteur à l'IL-7 (CD127) et par la surexpression du récepteur inhibiteur PD1 (Radziewicz et al., 2007). Des études sur le HCV et le HIV chez l'homme, ainsi que sur le LCVM chez la souris ont de plus montré que les LT CD8⁺ présentant un tel phénotype sont incapables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires de type IL-2 ou IFN- γ (interféron γ) (Gruener et al., 2001; Barber et al., 2006; Day et al., 2006). Les infections chroniques au HCV sont également caractérisées par une faible réponse CD4⁺ (Wedemeyer et al., 2002) associée à une production d'IL-10 (Godkin et al., 2001). Ce défaut de réponse CD4 est une caractéristique commune des infections chroniques du foie et résulte de l'incapacité des LT CD4⁺ à reconnaître les antigènes hépatocellulaires (présentés uniquement par les molécules de CMH-I à la surface des hépatocytes) en absence de présentation par des CPA professionnelles. Cela conduit à un défaut de signaux helper, apportés normalement par les populations auxiliaires de lymphocytes CD4⁺, induisant une activation incomplète des LT CD8⁺ (Wuensch et al., 2010) ou une génération défectueuse de LT CD8⁺ mémoires (Janssen et al., 2005). Les LT CD4⁺ auxiliaires contribuent également à la mise en place d'un environnement inflammatoire par sécrétion de quantité importante d'IL-2. Ainsi, l'hyporéactivité CD4 dans la réponse immunitaire cellulaire hépatique semble être un élément d'importance dans l'établissement de la chronicité des pathologies infectieuses hépatiques.

L'un des mécanismes clés dans la mise en place de l'épuisement T au sein du foie se base sur l'interaction inhibitrice PD1/PD-L1. En effet, comme mentionné au-dessus, un grand nombre de cellules du foie capable de présenter les antigènes (hépatocytes, LSEC, KC) expriment également la molécule inhibitrice PD-L1 (Diehl et al., 2007; Iwai et al., 2003; Mühlbauer et al., 2006). En ce sens, il a été démontré que des souris déficientes en PD-L1 sont plus à même de développer une hépatite auto-immune médiée par les LT CD8⁺ (Dong et al., 2004). Chez l'homme, l'expression de PD-L1 par les hépatocytes péri-tumoraux est également associée à un mauvais pronostic de carcinome hépatocellulaire (Dai et al., 2017), confirmant l'implication de la voie PD1/PD-L1 dans l'inhibition de la réponse immunitaire hépatique. D'autres ligands

de récepteurs inhibiteurs tels que Gal9 (Galectine-9) ou CTLA-4 sont exprimés, dans certaines conditions, par les cellules non-parenchymateuses hépatiques et pourraient intervenir dans la mise en place de l'épuisement lymphocytaire.

L'environnement cytokinique hépatique, largement orienté vers un profil anti-inflammatoire (TGF- β , IL-10, IL-27), ainsi que la présence de lymphocytes T régulateurs dans le microenvironnement hépatique joue également un rôle dans la tolérisation des lymphocytes T et l'induction de la tolérance hépatique.

c- Les lymphocytes régulateurs dans l'induction de tolérance hépatique et systémique

Si la tolérisation des lymphocytes T spécifiques d'antigènes initiée dans le foie semble être l'un des mécanismes clés dans la mise en place d'une tolérance systémique, d'autres résultats suggèrent l'implication majeure des lymphocytes régulateurs dans ce processus. Des travaux de transplantation hépatique menés chez la souris ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'abondance de LT_{Regs} CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ CTLA-4⁺ dans le foie greffé et la rate du receveur après la transplantation, et que la délétion de ces cellules avec un anti-CD25 déplétant induisait un rejet aigu du greffon (Li et al., 2006). Ces résultats démontrent l'implication des LT_{Regs} dans les processus de tolérisation hépatique, et par extension, de tolérisation systémique. En clinique, il a été démontré en 2008 par deux équipes que la tolérance opérationnelle observée en transplantation hépatique était associée à un enrichissement de LT_{Regs} CD4⁺ au niveau hépatique (Li et al., 2008) et en périphérie (Pons et al., 2008).

Les CPA hépatiques, majoritairement orientées vers un profil tolérogène, jouent un rôle important dans la différenciation des LT CD4⁺ en LT_{Regs}. En ce sens, il a été démontré par des travaux *in vitro* que les LSEC sont capables d'induire efficacement la différenciation TGF- β -dépendante de LT CD4⁺ périphériques en LT_{Regs} CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ conventionnels, pourvu de capacités suppressives démontrées *in vivo* dans un modèle d'EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*) (Carambia et al., 2014) mais également en LT_{Regs} CD4⁺ non-conventionnels, nommés « T_{LSEC} » (CD25^{low} Foxp3⁻) dotés de propriétés immunorégulatrices démontrées *in vivo* dans un modèle d'hépatite auto-immune (Kruse et al., 2009). Les KC sont également capables d'induire *in vivo* une différenciation de LT CD4⁺ en LT_{Regs} CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ sécréteurs d'IL-10 (Heymann et al., 2015). Il en est de même pour les HSC qui, malgré leur

capacité de présentation controversée, ont également été démontré comme capable d'induire la différenciation *in vitro* de LT CD4⁺ en LT_{Regs} CD4⁺ Foxp3⁺ en présence de DC et de TGF-β (Dunham et al., 2013).

Enfin, l'implication des lymphocytes régulateurs dans la mise en place d'une tolérance systémique envers un antigène hépatocellulaire a également été démontrée empiriquement dans des modèles murins où l'expression d'un antigène est forcée au niveau hépatique par thérapie génique. Dans ces modèles, qui seront développées ci-dessous, l'expression d'une protéine étrangère spécifiquement à la surface des hépatocytes permet d'induire sa tolérance à l'échelle systémique, tolérance souvent reliée à l'expansion dans le foie et/ou en périphérie, de lymphocytes régulateurs.

2.2. Thérapie génique dans le foie

2.2.1. Généralités

La thérapie génique est une stratégie thérapeutique moderne, dont les premiers succès virent le jour au début des années 2000, visant à insérer du matériel génétique dans les cellules ou les tissus d'un individu afin de traiter une maladie. Si à ses commencements, cette approche était principalement destinée à traiter des maladies monogéniques héréditaires par remplacement du gène défectueux, l'effort de recherche dans ce domaine permet aujourd'hui son application à de nombreuses situations pathologiques incluant par exemple les cancers ainsi que les maladies infectieuses, cardiovasculaires et neurologiques. Les vecteurs viraux, de par leurs propriétés infectieuses, sont vite devenus les acteurs principaux permettant de véhiculer du matériel génétique dans des cellules. Même s'il serait trop long de détailler ici l'ensemble des vecteurs viraux utilisés en thérapie génique, il convient quand même de citer les principaux utilisés aujourd'hui à travers le monde à savoir les adénovirus, les lentivirus, les rétrovirus et les AAV (*adeno-associated virus* ou virus adéno-associés) représentant à eux seuls plus de 50% des essais cliniques de thérapies géniques lancés entre 1997 et 2019 (source : The Journal of Gene Medicine, Gene Therapy Clinical Trials Worldwide - <http://www.abedia.com/wiley>). Aujourd'hui, les avancées technologiques permettent une ingénierie importante des vecteurs viraux, assurant un contrôle sur leur tropisme, leur caractère intégratif ainsi que leur immunogénicité.

Pour plus d'informations, deux très bonnes revues parues récemment font états des différents vecteurs utilisés en thérapie génique (Lundstrom, 2018) et des multiples essais cliniques de thérapies géniques depuis ses débuts à aujourd'hui (Ma et al., 2020).

2.2.2. La thérapie génique dans le foie pour le traitement des maladies héréditaires et auto-immunes

a- Le foie, un organe de choix pour la thérapie génique

Le foie est rapidement devenu une cible de choix pour la thérapie génique, particulièrement dans le traitement de maladies héréditaires et auto-immunes, de par ses propriétés tolérogènes développées plus haut, mais également anatomophysiologiques. En effet, de par son haut degré de perfusion et son endothélium fenestré, le foie est particulièrement susceptible de capter des vecteurs viraux administrés par voie veineuse. De plus, les hépatocytes sont des cellules quiescentes et présentent une durée de vie importante allant de 5 à 12 mois, ce qui représente un atout pour les thérapies non-intégratives dont la pérennité est mise en cause par la mort ou la prolifération des cellules infectées. Ainsi, la thérapie génique dans le foie est capable de répondre à deux problèmes majeurs caractérisant ces conditions pathologiques. Premièrement, le remplacement d'un gène défectueux lié à une maladie héréditaire monogénique permet, en fonction de l'efficacité du transfert de gène, un bénéfice thérapeutique important par production de la protéine manquante. Deuxièmement, et c'est ce qui donne tout son intérêt au foie, l'expression d'une protéine au niveau hépatique permet d'induire sa tolérance à l'échelle systémique. Cela se révèle particulièrement intéressant dans le cas de maladies héréditaires caractérisées par une déficience protéique totale. Dans ce contexte, l'organisme développera une réponse immune envers cette protéine, limitant les ouvertures thérapeutiques (Herzog et al., 2001; Zhang et al., 2007). Cette stratégie permet également de rétablir un état de tolérance envers un autoantigène dans le cas de maladies auto-immunes. L'enjeu majeur de la thérapie génique dans le foie est de mettre au point des protocoles permettant un transfert de gène efficace, ciblant spécifiquement les hépatocytes, sans déclenchement de réponse immune délétère pour l'induction de la tolérance hépatique (LoDuca et al., 2009).

b- Les vecteurs AAV pour la thérapie génique dans le foie

Le développement récent de l'ingénierie virale des virus adéno-associés (AAV) a grandement facilité la mise en place de tels protocoles. En effet, les AAV sont des virus naturellement dépendants de la présence de virus helper, et n'induisent que de faibles réponses immunitaires contrairement, par exemple, aux adénovirus (Shirley et al., 2020; Zais and Muruve, 2008). Cela s'explique en partie par leur inefficacité à infecter les CPA professionnelles (Jooss et al., 1998). Les vecteurs AAV recombinants utilisés en thérapie génique sont composés d'une capsid virale icosaédrique qui contient le matériel génétique, à savoir, le gène thérapeutique d'intérêt et son promoteur (Figure 12). L'une des principales barrières à l'utilisation des vecteurs AAV est la capacité d'encapsulation maximale limitée à 5kb (reflet de la taille du génome du virus naturel), limitant les possibilités d'insertion de certain gène d'intérêt (Wu et al., 2010). 13 sérotypes d'AAV (AAV1 à AAV13) différents ont été identifiés chez l'homme, et présentent des tropismes cellulaires et tissulaires variés, dépendants de l'expression à leur surface de glycorécepteurs variés (Srivastava, 2016).

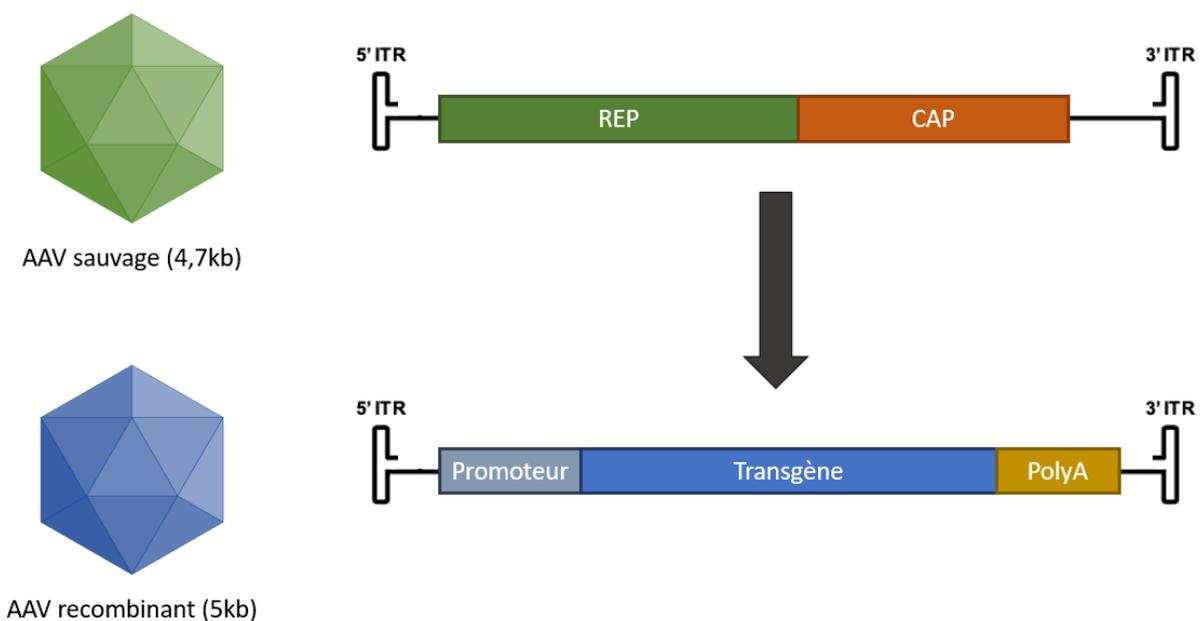


Figure 12 : Les vecteurs AAV recombinants en thérapie génique. Les AAV sauvages sont composés d'une capsid icosaédrique entourant un génome d'ADN simple brin de 4,7kb contenant les gènes *rep* et *cap*, respectivement impliqués dans le cycle de répllication du virus et dans l'encapsidation. Les AAV recombinants utilisés en thérapies géniques sont vidés du matériel génétique d'origine et une séquence maximale de 5kb est insérée contenant un promoteur, le gène d'intérêt et une queue poly-A. Figure fournie par Malo Journou (UMR 1089).

Le premier à avoir été découvert est logiquement l'AAV2 (Atchison et al., 1965) de par son très large tropisme. Si les différents tropismes des vecteurs AAV permettent de préciser les organes ciblés lors de la thérapie génique, aucun de ces sérotypes ne présentent un tropisme exclusif à un organe.

Par exemple l'AAV8, utilisé dans les transferts de gène hépatique, présente effectivement un tropisme hépatique mais également cardiaque, pancréatique et neurologique. Ainsi, l'utilisation de promoteur hépatospécifique tels que les promoteurs mTTR (*mouse transthyretin*) chez la souris, hTTR (*human transthyretin*) ou LP1 (*liver-specific promoter 1*) chez l'homme, permettent l'expression du gène transféré exclusivement dans les hépatocytes. Une autre limite importante à l'utilisation des vecteurs AAV en clinique est la haute prévalence d'une immunité préexistante, due à une forte représentation des AAV sauvages, dirigée contre les protéines de la capsid. Des études suggèrent en effet que 60% de la population mondiale présente des anticorps anti-AAV (Mingozzi and Büning, 2015). Les techniques de pseudotypage récemment mises au point permettent de contourner en partie cette limite en intégrant le génome d'un AAV (contenant le gène thérapeutique d'intérêt) dans la capsid d'un AAV de sérotype différent (Burger et al., 2004; Ronzitti et al., 2020). Cela permet à la fois un contrôle sur le tropisme du vecteur AAV, mais également sur son immunogénicité, en utilisant par exemple des capsides d'AAV naturellement moins représentées (Paulk et al., 2018). D'autres techniques d'ingénierie moléculaire, dont le but commun est de diminuer l'immunogénicité du vecteur, permettent par exemple de muter les épitopes de la capsid ou d'établir une capsid « mosaïque » composés de protéines de différents sérotypes d'AAV (Barnes et al., 2019). Malgré ces obstacles, l'AAV est aujourd'hui un outil de choix dans la thérapie génique hépatique, et continue de démontrer son efficacité thérapeutique dans des modèles animaux mais également en clinique.

c- Des réussites précliniques aux succès cliniques

La thérapie génique dans le foie permet d'induire une tolérance systémique envers le produit du transgène. Ainsi, son utilisation dans les maladies héréditaires monogéniques et dans les maladies auto-immunes a vite été reconnue comme une alternative de choix pour le traitement de ces pathologies. Comme mentionné un peu plus haut, la stratégie commune est d'induire dans le foie l'expression d'une protéine manquante (maladie héréditaire

monogénique) ou non-tolérée par l'organisme (maladie auto-immune) en vue d'induire sa production dans un contexte tolérogène. Pour ce faire, de nombreuses constructions virales sont utilisées pour permettre l'expression spécifique d'un gène dans les hépatocytes. Ces études permettent également de mettre en avant l'implication de cellules régulatrices dans la mise en place de la tolérance systémique après transfert de gène dans le foie. Les principaux travaux de thérapie génique dans le foie sont résumés dans la *Table 4*. En pré-clinique, les études sont facilitées par l'existence de nombreux modèles de souris associés aux maladies héréditaires et maladies auto-immunes chez l'homme.

Parmi les travaux notables, nous retenons ceux de Lüth et collaborateurs qui démontrèrent en 2008 l'intérêt du transfert de gène dans le foie dans un modèle d'EAE, couramment utilisé comme modèle neurodégénératif associé à la sclérose en plaque. Dans cette étude, un vecteur adénoviral est utilisé pour induire au niveau hépatique l'expression de la MBP (*myelin basic protein*), une protéine impliquée dans les processus de myélinisation du SNC (système nerveux central). Ainsi, les souris injectées avec cet adénovirus 15 jours avant l'induction d'EAE présenteront des symptômes largement diminués par rapport au groupe contrôle. Ils démontrèrent dans un deuxième temps que cette protection est apportée par l'expansion d'une population de $LT_{Reg5} CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ MBP-spécifique, reproduisant les résultats énoncés ci-dessus lors d'expériences de transferts adoptifs. Néanmoins, peu d'informations sont apportées sur la construction du vecteur viral, son hépato-spécificité et son immunogénicité (Lüth et al., 2008). Des travaux similaires sont menés quelques années plus tard dans un modèle murin de diabète auto-immun de type 1 (souris NOD pour *non-obese diabetic*). Dans ces travaux, l'expression d'un peptide immunodominant de l'insuline est forcée au niveau hépatocytaire par l'utilisation d'un vecteur lentiviral sous contrôle du promoteur hépato-spécifique ET (*enhanced transhyretin*). Les souris NOD traitées avec ce vecteur présentent des valeurs de glycémie normales dans les semaines suivants l'injection, contrairement aux souris contrôles ou traitées avec un vecteur sous promoteur ubiquitaire. Dans ce modèle, la tolérance systémique est une fois de plus apportée par l'expansion de $LT_{Reg5} CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ malgré la présence de $LT_{Eff} CD8^+$ spécifiques de l'insuline dans le foie et en périphérie (Akbarpour et al., 2015).

Table 4 : Principales études pré-cliniques et cliniques de thérapie génique dans le foie. NR : non renseigné ; EAE : experimental autoimmune encephalomyelitis ; MBP : myelin basic protein ; GAA : acid alpha-glucosidase ; ASM : acid sphingomyelinase ; UGT1A1 : UDP-glucuronosyltransferase 1 polypeptide A1 ; FIX : factor IX ; scAAV : self-complementary AAV.

	Espèce	Modèle/maladie	Gène d'intérêt thérapeutique	Vecteur viral	Réponse immunitaire	Cellules régulatrices impliquées	Id. essai clinique	Référence
Études pré-cliniques	Souris	EAE	MBP	Adénovirus	NR	LT _{Regs} CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺		Lüth, 2008
	Souris	Diabète de type 1	Insuline	Lentivirus	LT _{Eff} CD8 ⁺ Ag-spécifique	LT _{Regs} CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺		Akbarpour, 2015
	Souris	Maladie de pompe	GAA	AAV	NR	NR		Colella, 2019 Salabarria, 2020
	Souris	Maladie de Niemann-Pick	ASM	AAV	Absence de réponse humorale	NR		Passini, 2007
	Souris	Syndrome de Crigler-Najjar	UGT1A1	AAV	NR	NR		Greig, 2018
	Souris	Hémophilie B	FIX	AAV	Absence de réponse humorale	LT _{Regs} CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ GITR ⁺		Drobrzynski, 2006
	Souris	Hémophilie B	FIX	AAV	Neutralise immunité préexistante anti-FIX	Cellules Foxp3 ⁺ régulatrices		Markusic, 2013
	Chien	Hémophilie B	FIX	AAV	NR	NR		Niemeyer, 2008
Essais cliniques	Homme	Maladie de pompe	GAA	AAV	NR	NR	NCT03533673 (<i>en cours</i>)	Bond, 2019
	Homme	Hémophilie B	FIX	scAAV	Légère, corrigée par court traitement prédnisolone	NR	NCT00979238	Nathwani, 2014
	Homme	Syndrome de Crigler-Najjar	UGT1A1	AAV	NR	NR	NCT03466463 (<i>en cours</i>)	Aronson, 2019

On ne saurait rendre compte de la portée thérapeutique de la thérapie génique dans le foie sans mentionner le cas de l'hémophilie B, et la réussite clinique associée. L'hémophilie est une maladie génétique le plus souvent héréditaire, liée à un déficit en protéines de coagulations aboutissant à des saignements incontrôlés par défaut de coagulation. On distingue 3 formes d'hémophilie selon le facteur de coagulation touché : l'hémophilie A, la plus fréquente, liée à un déficit en facteur VIII ; l'hémophilie B, plus rare, liée à un déficit en facteur IX ; et l'hémophilie C, très rare, liée à un déficit en facteur XI. Si cette maladie est à l'étude depuis plus de 40 ans, la thérapie génique ne fit son apparition dans son traitement qu'au début du XXI^{ème} siècle. En effet les premières thérapeutiques utilisées pour soigner cette maladie consistaient en l'injection prophylactique de facteur de coagulation par voie générale. Néanmoins, les patients s'immunisaient rapidement envers ces protéines inconnues à leur organisme (Franchini and Mannucci, 2012). L'hémophilie fût rapidement propulsée au centre des recherches en thérapie génique dans le foie due à son caractère monogénique, mais également car les facteurs de coagulations sont normalement synthétisés dans le foie. De plus, l'observation clinique de patients présentant une forme modérée d'hémophilie (>13% de facteurs de coagulations circulants contre <1% dans les formes graves) permis de mettre en évidence qu'une faible proportion de facteurs de coagulation circulants suffit à drastiquement contrôler les épisodes de saignements (Den Uijl et al., 2011). La conséquence à cela est qu'une thérapie modérément efficace pourrait théoriquement suffire à diminuer les symptômes et améliorer le confort de vie des patients hémophiles.

Au même titre que pour le diabète et l'EAE présentés un peu plus haut, le traitement par thérapie génique de souris avec des AAV codant pour le FIX a vite présenté des résultats très encourageants. Drobrzynski et collaborateurs démontrèrent que des souris immunocompétentes injectées avec un AAV codant pour le FIX humain, sous contrôle d'un promoteur hépato-spécifique (ApoE-hAAT), ne déclenchaient pas de réponse immunitaire envers le FIX, même après un challenge avec un adénovirus immunogène codant pour le FIX humain. Des expériences de transferts adoptifs de LT_{Regs} CD4⁺ CD25⁺ isolés à partir de la rate de ces souris tolérantes dans des souris naïves avant challenge adénoviral reproduisent les résultats ci-dessus (Dobrzynski et al., 2006). L'émergence des modèles de souris hémophiles permit également d'analyser le bénéfice thérapeutique associé à l'injection d'un AAV hépato-spécifique codant pour le FIX, une fois de plus relié à l'expansion de cellules régulatrices

(Markusic et al., 2010, 2013). Des résultats similaires furent également obtenus chez le chien hémophile (Niemeyer et al., 2009).

Il faudra attendre 2011 pour voir le premier essai clinique de thérapie génique dans l'hémophilie B couronné de succès. Dans cette étude, 10 patients atteints d'hémophilie B sont injectés avec un vecteur AAV optimisé, sous contrôle d'un promoteur hépato-spécifique, portant la séquence du gène du FIX. Une légère augmentation des transaminases hépatiques est observée chez les patients quelques semaines après injection du vecteur, contrôlée par un court traitement à la prédnisolone. Si cette thérapie ne permet qu'une augmentation de seulement 5% de FIX circulant, elle améliore toutefois grandement le pronostic des patients hémophiles avec une diminution de près de 90% des épisodes de saignements (Nathwani et al., 2011, 2014). Dès lors, et encouragé par ce succès clinique, de nombreux essais cliniques se succèdent, optimisant encore un peu plus le vecteur viral et le potentiel thérapeutique, et permettant également d'appréhender la réponse immune préexistante dirigée contre les capsides AAV chez les patients. Néanmoins, la question de la stabilité de l'expression du FIX au niveau hépatique se pose étant donné le caractère non-intégratif de l'AAV et donc de la perte d'expression potentielle associée au renouvellement hépatocytaire. Le traitement de l'hémophilie B par thérapie génique dans le foie représente aujourd'hui un cas d'école, étudié par de très nombreuses équipes à travers le monde, et permet, au-delà du potentiel thérapeutique, une meilleure compréhension des mécanismes d'induction de tolérance par transfert de gène dans le foie.

2.2.3. Induction d'une tolérance allogénique par transfert de gène dans le foie, perspective en transplantation

Au vu du succès lié à l'induction de tolérance systémique par transfert de gène dans le foie dans les maladies génétiques héréditaires et auto-immunes, son application à d'autres contextes pathologiques faisant état d'une rupture de tolérance tels que la transplantation fait l'objet d'études récentes menées par notre équipe ainsi que l'équipe australienne de P. Bertolino. La stratégie est similaire à celles exposées précédemment et consiste en l'induction d'une tolérance allogénique systémique par transfert de gène codant pour des alloantigènes dans le foie. Les molécules de CMH-I du donneur représentent des alloantigènes de choix car exprimés par l'ensemble des cellules du greffon. Pour faciliter la compréhension

des travaux présentés ci-après, le système CMH de la souris et ses différents haplotypes sont fournies en **Table 5** et *Table 6* (Stuart, 2015).

Table 5 : Le complexe d'histocompatibilité murin ou système H2. Protéines C' : protéines du complément.

Complexe	CMH						
Classe du CMH	I			II		III	
Région	K	D		A	E	S	
Produit du gène	H-2K	H-2D	H-2L	A α A β	E α E β	Protéines C'	TNF- α/β

Table 6 : Les haplotypes H2 des différentes souches de souris utilisées au laboratoire. / : délété, non fonctionnel ou indéterminé.

Souche	H-2 haplotype	H-2K	H-2D	H-2L	H-2A α	H-2A β	H-2E α	H-2E β
C57Bl/6 C57Bl/10 C57L LP1 129	H-2^b	K ^b	D ^b	/	A α ^b	A β ^b	/	E β ^b
Balb/c DBA/2 NZB SEA	H-2^d	K ^d	D ^d	L ^d	A α ^d	A β ^d	E α ^d	E β ^d
C3H CBA B10.BR C57BR	H-2^k	K ^k	D ^k	/	A α ^k	A β ^k	E α ^k	E β ^k

a- Travaux de l'équipe de P. Bertolino

La première étude de Bertolino et collaborateurs (Cunningham et al., 2013) se portent sur l'induction d'une tolérance allogénique par transfert de gène codant pour la molécule de CMH-I allogénique H-2K^b au niveau hépatique, grâce à un vecteur AAV recombinant pourvu d'un promoteur hépato-spécifique (AAV2/8-ApoE-hAAT H-2K^b résumé à AAV K^b). Dans ces travaux, les souris B10.BR (H-2^k) injectées avec l'AAV K^b expriment stablement la molécule H-2K^b au niveau hépatocytaire uniquement, sans dommage tissulaire apparent, et tolèrent une greffe de peau présentant la molécule de CMH allogénique H-2K^b dans un contexte H-2^k (souris 178.3 - modèle « single mismatched ») mais pas une greffe de peau ou une greffe cardiaque allogénique provenant de souris C57Bl/6 (H-2^b - modèle « fully allogeneic »).

Ils démontrent également que cette induction de tolérance est dépendante de la quantité de vecteur injecté, et qu'une quantité sous-optimale ($5 \cdot 10^6$ vgc pour « *vector genome copy* » contre $5 \cdot 10^{10}$ vgc normalement) conduit à un rejet accéléré par immunisation contre le produit du transgène à savoir, la molécule de CMH allogénique H-2K^b. Ils mettent ensuite en évidence que cette thérapie génique permet d'inhiber une réponse immunitaire mémoire préexistante, spécifique de l'alloantigène H-2K^b et que cette tolérance systémique envers H-2K^b est associée à un défaut fonctionnel (mais pas quantitatif) des LT CD8⁺ spécifiques de l'alloantigène.

Dans une deuxième étude parue plus récemment (Paul-Heng et al., 2018), l'induction de tolérance observée précédemment est étendue à un contexte CMH différent (H-2K^d dans H-2^b) identique à celui de notre étude, sans toutefois démontrer de tolérance envers un greffon « fully allogeneic » H-2^d. Cette étude se démarque par l'investigation des voies de présentation de l'alloantigène transféré à la surface des hépatocytes, en utilisant des vecteurs codant pour des molécules de CMH-I (H-2K^b ou H-2K^d) mutées sur les domaines impliqués dans leur reconnaissance directe par les LT CD8⁺ (mutation D227K). Ainsi, ils démontrent que la présentation indirecte de peptides issus des molécules de CMH-I allogéniques aux LT CD4⁺ de l'hôte n'est pas suffisante pour induire une tolérance systémique envers le transgène mais que l'interaction entre les molécules de CMH-I allogéniques intactes à la surface des hépatocytes et les LT CD8⁺ de l'hôte est quant à elle primordiale. Pour finir, des expériences de déplétion de LT_{Regs} CD4⁺ sont effectuées, sans toutefois démontrer de rupture de la tolérance induite par thérapie génique. Ces résultats mettent en avant le rôle de la voie de reconnaissance semi-directe (présentée en *Figure 3*) dans la mise en place de la tolérance après transfert de gènes dans le foie et suggèrent l'implication de cellules régulatrices non-conventionnelles. En ce sens, il est intéressant de constater que cet article met en lumière l'expansion d'une population qualifiée d'alloréactive de LT CD8⁺ PD1⁺ CD44⁺ dans le foie des souris traitées avec l'AAV H-2K^d sans toutefois y associer de propriétés régulatrices.

b- Travaux de notre équipe

Basé sur les travaux de Valentin Le Guen, publiés en 2017 dans Journal of Hepatology :

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

Mon équipe, menée par le Dr S. Conchon, travaille également sur un modèle d'induction de tolérance allogénique en transplantation par transfert de gène. En effet, nous avons démontré, dans des travaux concomitants à ceux de P. Bertolino, que le transfert d'une molécule de CMH allogénique H-2K^d spécifiquement au niveau du foie de souris C57Bl/6 (H-2^b) à l'aide d'un AAV sous promoteur hépato-spécifique, induit un état de tolérance opérationnelle systémique envers ce transgène, transmis à un greffon « fully allogeneic » d'îlots pancréatiques provenant de souris Balb/c (H-2^d).

De plus, l'utilisation d'un AAV contrôle (portant une séquence d'ADN non codante) permet dans cette étude d'analyser les potentielles réponses immunitaires spécifiquement dirigées contre l'AAV en lui-même et non le produit du transgène.

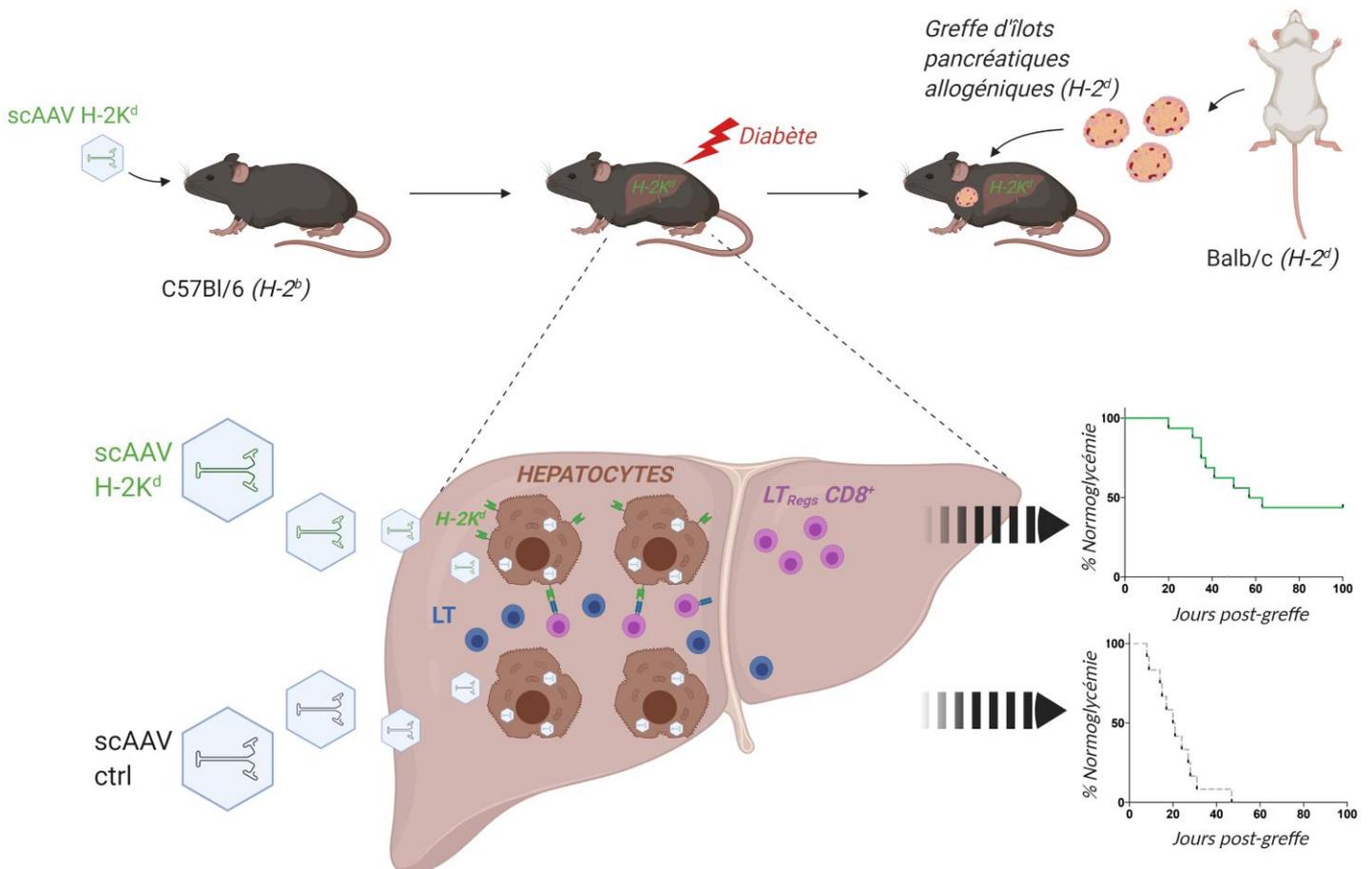


Figure 13 : Travaux de l'équipe sur l'induction de tolérance allogénique dans le foie par thérapie génique. L'injection d'un vecteur scAAV2/8 codant pour la molécule de CMH allogénique H-2K^d induit une tolérance systémique envers le produit du transgène, transmise à un greffon allogénique H-2^d. Cet état de tolérance systémique est dépendant de l'expansion, dans le foie des souris traitées, d'une population de LT_{Regs} CD8⁺. Inspiré de la présentation du projet de l'équipe pour l'événement O'tablo organisé par la SFR-santé (<https://sfrsante.univ-nantes.fr/evenements-scientifiques/o-tablo/o-tablo-6-2585843.kjsp?RH=1559729553135>).

Dans ce modèle, 50% des souris injectées avec le vecteur scAAV-H-2K^d présente une normoglycémie stable au long terme, reflet d'un greffon pancréatique fonctionnel (Le Guen et al., 2017) (*Figure 13*).

Nous avons par la suite démontré que cet état de tolérance systémique était dépendant de la voie PD1/PD-L1 et n'était pas rompu par l'injection d'un vecteur adénoviral hautement immunogène codant pour H-2K^d. Finalement, nous avons mis en évidence que cette tolérance dépendait de l'expansion exclusivement dans le foie de LT CD8⁺ exprimant les marqueurs PD1 et CD44, similairement au LT CD8⁺ allospécifiques décrit ultérieurement par Bertolino et collaborateurs (Paul-Heng et al., 2018). Ces LT CD8⁺ expriment également fortement les chaînes α et β du récepteur à l'IL-2 (respectivement CD25 et CD122), ainsi que les récepteurs inhibiteurs CTLA-4, LAG-3 et 2B4 (CD244), les rapprochant ainsi d'un phénotype épuisé (Wherry and Kurachi, 2015). Néanmoins, l'expression stable du marqueur d'activation (et de homing) CD69 ainsi que du marqueur de prolifération Ki-67 ne vont pas en ce sens. De plus, ces cellules présentent un potentiel suppressif démontré aussi bien *in vitro*, dépendant de la sécrétion d'IL-10, que *in vivo* lors d'expérience de transfert adoptif aboutissant, similairement aux souris traitées par thérapie génique, à une tolérance envers un greffon d'îlots pancréatiques H-2^d. Ensemble, ces résultats permettent d'envisager cette population de LT CD8⁺ comme une nouvelle population de lymphocytes régulateurs, pourvue de fonctions suppressives permettant le contrôle des réactions immunitaires liées au rejet de greffe.

Les intérêts de ces travaux sont multiples et permettent d'appréhender de nouveaux mécanismes régulateurs liés aux LT_{Regs} CD8⁺, une population cellulaire mal définie aujourd'hui, mais également d'approfondir le phénomène d'induction de tolérance dans un contexte hépatique allogénique, reflétant la condition clinique de patients transplantés. Néanmoins de nombreuses interrogations demeurent autour de cette population de LT_{Regs} CD8⁺ nouvellement décrite.

Synthèse du projet

Les travaux de notre équipe s'inscrivent donc à l'interface des problématiques modernes de la transplantation, notamment par le développement de thérapies d'induction de tolérance alternatives ; et de la compréhension des mécanismes hépatiques permettant la mise en place de cette tolérance. Ils permettent également de mettre en lumière l'existence d'une nouvelle population de lymphocytes CD8⁺ régulateurs.

Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité directe des travaux de l'équipe et se porte sur l'approfondissement de la caractérisation de ces LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins induits dans un contexte allogénique. En effet, comme énoncé en fin d'introduction, de nombreuses questions et incertitudes demeurent quant à ces cellules. Comment sont-elles générées dans le foie allogénique ? Quelles sont les acteurs impliqués dans leur génération et leur maintien ? Quelles sont les bases moléculaires de leurs fonctions suppressives ? Existe-t-il une population similaire chez l'homme ? Cette liste n'est bien sûr pas exhaustive mais permet toutefois de dresser les objectifs principaux de mon travail de thèse.

Ainsi, ces objectifs étaient initialement :

(i) de caractériser de façon transcriptomique et phénotypique cette population de LT_{Regs} CD8⁺ afin de mieux appréhender leurs mécanismes suppressifs et leur génération dans le foie allogénique.

(ii) d'étudier par microscopie le comportement de ces cellules et les interactions potentielles avec les acteurs immunitaires hépatiques, présentés en introductions, que l'on sait impliqués dans les phénomènes d'induction de tolérance hépatique.

(iii) de rechercher une population CD8⁺ régulatrice équivalente chez l'homme, induite dans un contexte allogénique hépatique.

Pour répondre à ces questions pluridisciplinaires, j'ai pu profiter de l'expertise de nombreuses personnes et me former aux techniques de microscopie de pointe mais également d'analyse transcriptomique.

Résultats

Résultats

I- Étude des $LT_{\text{Regs}} CD8^+$ induit dans un contexte allogénique hépatique

La première partie de mes travaux s'est portée sur l'étude des lymphocytes T $CD8^+$ régulateurs présentés un peu plus haut, induits dans le foie de souris après transfert de gène codant pour une molécule de CMH allogénique, et repose en grande partie sur son analyse transcriptomique. En effet, l'analyse transcriptomique représente une méthodologie de choix permettant la caractérisation exhaustive et non-supervisée d'une population cellulaire. De plus, la bioinformatique permet aujourd'hui de comparer, par méta-analyse, le transcriptome de multiples populations cellulaires analysées indépendamment. Cette analyse, détaillée ci-dessous, a dans un premier temps permis de mettre en évidence un profil transcriptomique bien particulier des $LT_{\text{Regs}} CD8^+$ par l'expression différentielle de nombreux gènes. Dans un second temps, je me suis particulièrement intéressé au profil d'expression des gènes impliqués dans la régulation du système immunitaire afin d'approfondir le caractère suppressif de cette population. Enfin, me basant sur le transcriptome des $LT_{\text{Regs}} CD8^+$, j'ai pu valider et approfondir le phénotype de ces cellules chez la souris et débiter la recherche d'une population équivalente chez l'homme, dans une cohorte de patients transplantés hépatiques tolérants.

1- Analyse transcriptomique des $LT_{\text{Regs}} CD8^+$ murins

L'analyse transcriptomique repose sur les techniques de séquençage haut débit permettant d'identifier et quantifier un nombre important de transcrits de gènes ou ARN (acide ribonucléique). On parle ainsi plus couramment de « RNA-Seq ». Ainsi, le RNA-Seq est une technique moderne à l'interface de la biologie cellulaire, moléculaire et de la bioinformatique, dont les premières descriptions firent leur apparition dans les journaux scientifiques au milieu des années 2000 (Bainbridge et al., 2006; Mortazavi et al., 2008; Nagalakshmi et al., 2008). De nos jours, le RNA-Seq est devenu une analyse courante et indispensable dans la

caractérisation biologique de type cellulaire avec plus de 17 000 articles apparentés publiés entre 2019 et 2020 (source : pubmed). Si le RNA-Seq est aujourd'hui décliné selon de nombreuses modalités techniques, la stratégie commune de préparation des échantillons peut se résumer à : (i) l'isolation des cellules d'intérêt, (ii) l'extraction de l'ARN, (iii) la retro-transcription en ADN complémentaire (ADNc), (iv) l'amplification et (v) la fragmentation. Ces étapes constituent la préparation de la collection d'ADNc (ou librairie) qui sera ensuite séquencée et analysée. S'ensuivent des étapes d'analyses bioinformatiques permettant l'alignement des « reads » (résultat du séquençage), le démultiplexage (permettant de réattribuer les transcrits analysés à l'échantillon initial), la normalisation des échantillons et enfin l'établissement d'une matrice de comptage permettant une analyse quantitative des transcriptomes étudiés (Stark et al., 2019).

1.1. Matériels et méthodes

La préparation des échantillons pour l'analyse RNA-Seq est détaillée en *Figure 14*. Brièvement, 8 souris C57Bl/6 mâles de 7 semaines sont injectées en AAV-H-2K^d ou AAV-Ctrl 3 semaines avant le tri cellulaire de 3 populations hépatiques de LT CD8⁺ :

(i) Les LT_{Regs} CD8⁺ CD44⁺ PD1⁺ issus du foie de souris injectées avec l'AAV-H-2K^d (n=8)

(ii) Les LT CD8⁺ CD44⁺ PD1⁻ issus de ces mêmes foies (n=8)

(iii) Les LT CD8⁺ CD44⁺ PD1⁻ issus du foie de souris injectées avec l'AAV-Ctrl (n=8)

Ces groupes nous assurent une comparaison de lymphocytes présentant un phénotype mémoire CD44⁺ dans un contexte hépatique allogénique (AAV-H-2K^d) ou non (AAV-Ctrl).

Après marquage membranaire (CD3, CD8, CD44 et PD1), les cellules sont triées (800 cellules par condition) à l'aide du FACS ARIA II (BD) en plaque 96 puit dans 5,5µl de tampon de lyse TCL avant d'être congelée et envoyée au Broad Institut à Boston, pour le RNA-Seq.

Le séquençage du transcriptome a été effectué, sur conseil du Broad Institut, selon le protocole « SmartSeq2 » optimisé pour les faibles quantités d'ARN (Picelli et al., 2013, 2014). L'analyse a ensuite été effectuée au sein de notre équipe en collaboration avec Richard Danger. Le contrôle qualité des échantillons nécessaire à toute analyse transcriptomique a permis de mettre en évidence la présence de 4 échantillons de mauvaise qualité qui ont été

exclues de l'analyse. Dans les échantillons restants, et bien que leur préparation ait été effectuée sur 2 jours, aucun effet batch n'a été détecté.

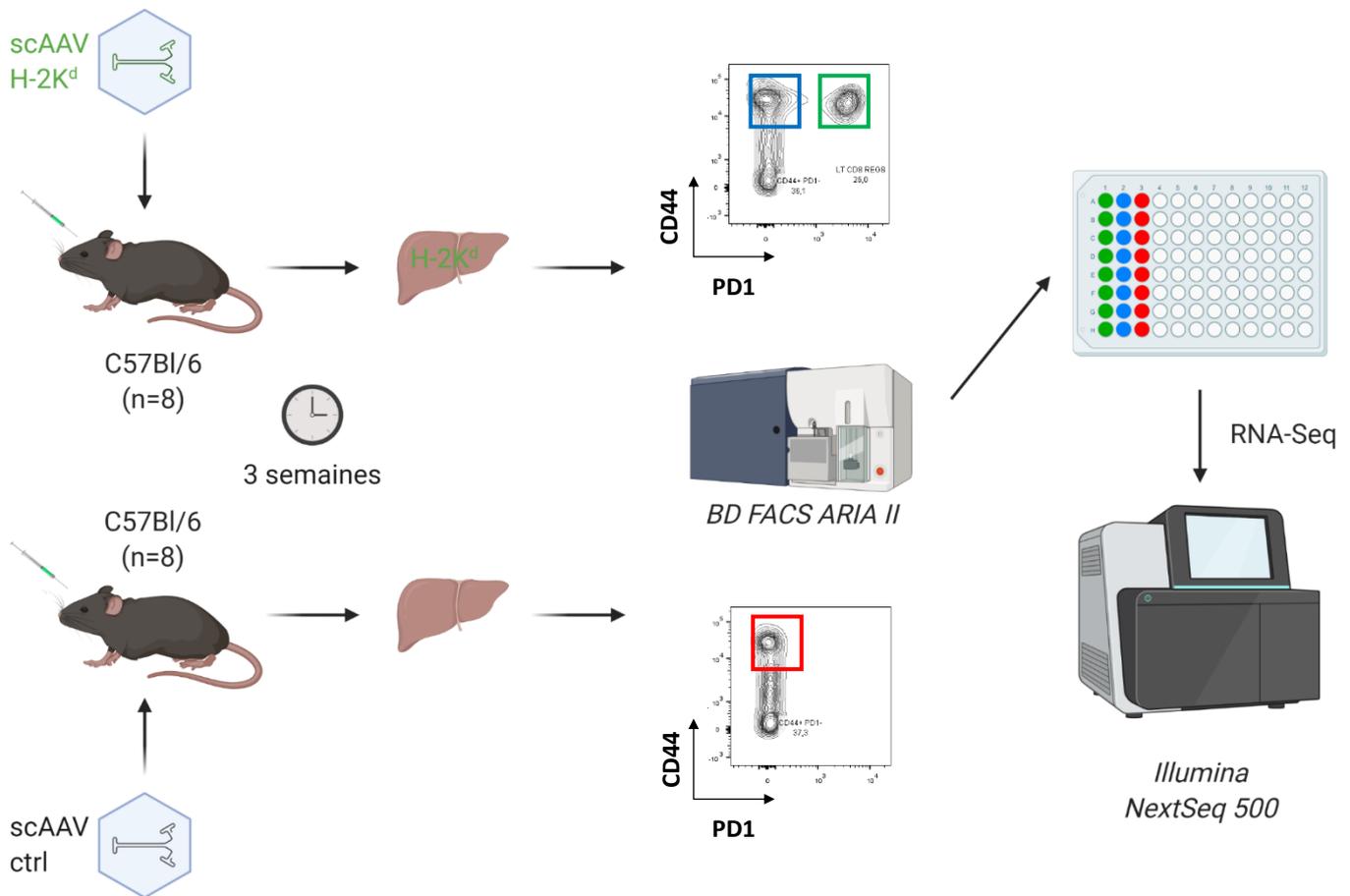


Figure 14 : Préparation des échantillons pour le RNA-Seq. 3 populations cellulaires sont triées à partir du foie de souris injectées en AAV-H-2K^d (n=8) ou AAV-ctrl (n=8) : **vert** : LT_{Regs} CD8⁺ CD44⁺ PD1⁺ (AAV-H-2K^d) ; **bleu** : LT CD8⁺ CD44⁺ PD1⁻ (AAV-H-2K^d) ; **rouge** : LT CD8⁺ CD44⁺ PD1⁻ (AAV-Ctrl). 800 cellules sont déposées par puit en tampon de lyse TCL (5,5µl/puit), la plaque est ensuite congelée et envoyée au Broad Institute à Boston pour le RNA-Seq.

1.2. Profil transcriptomique des LT_{Regs} CD8⁺ murins

a- Un transcriptome hautement différentiel

L'analyse transcriptomique a permis l'identification de près de 10 800 transcrits de gènes dans les différentes populations étudiées dont près de 2000 gènes différentiellement exprimés entre les LT_{Regs} CD8⁺ et les populations contrôles (ii) et (iii) à des valeurs seuils classiques ($\log_2|FC| >1$; adj p.value <0,05). De surcroît, aucune expression différentielle significative n'est observée entre les groupes contrôles, suggérant que les LT CD8⁺ CD44⁺ PD1⁻ hépatiques

ne sont pas influencés par l'expression d'un alloantigène au niveau du foie. En accentuant d'avantage les valeurs seuils de significativité et d'expression différentielle ($\log_2|FC| > 2$; adj p.value $< 10^{-5}$), nous obtenons une liste restreinte de 147 gènes hautement différentiellement exprimée entre $LT_{\text{Regs}} CD8^+ CD44^+ PD1^+$ et populations CD8 contrôles. Parmi ces 147 gènes, 80 sont surexprimés dans les $LT_{\text{Regs}} CD8^+$ et 67 sous-exprimés (Figure 15). Cette liste restreinte, présentée en annexe (Table 7) à la fin de ce manuscrit, constitue un point de départ pertinent dans l'analyse de gènes discriminants associés au $LT_{\text{Regs}} CD8^+$. Cette première analyse permet de mettre en évidence un profil transcriptomique homogène et hautement différentiel des $LT_{\text{Regs}} CD8^+$ induits dans le foie après transfert de gène codant pour une molécule de CMH allogénique, et suggère ainsi un état de différenciation phénotypique et fonctionnelle particulier de ces cellules.

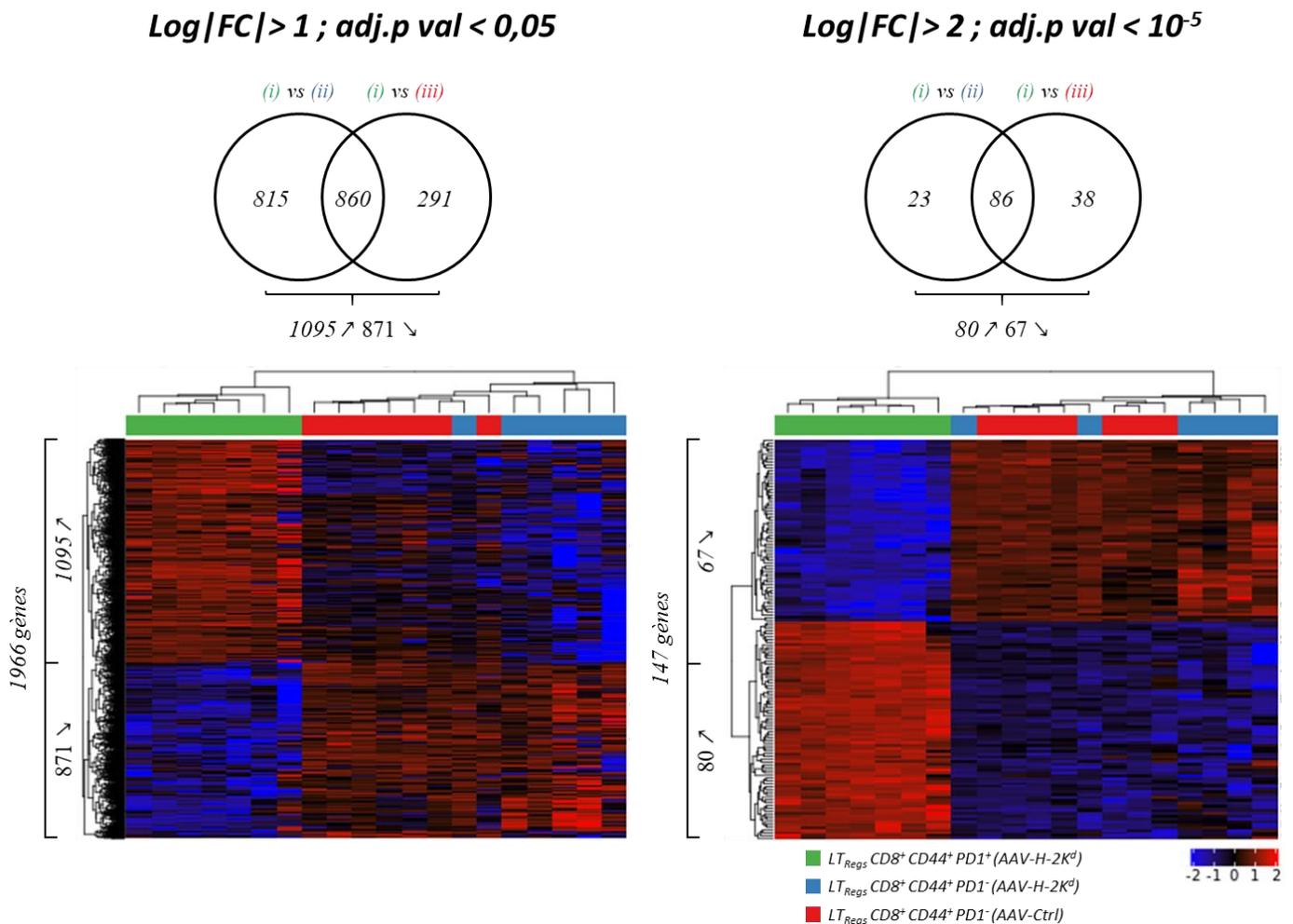


Figure 15 : Analyse transcriptomique des $LT_{\text{Regs}} CD8^+ CD44^+ PD1^+$ (i) et des deux populations contrôles associées ((ii) et (iii)) à différents degrés de seuillages statistiques et d'expressions différentielles. Gauche : seuillage permissif : $\text{Log}|FC| > 1$, adj.p value $< 0,05$. Droite : seuillage stringent : $\text{Log}|FC| > 2$, adj.p value $< 10^{-5}$. Sont représentés dans les cercles le nombre de gènes différentiellement exprimés à ces différents seuillages, entre chaque condition. Une heatmap représentative des profils transcriptomiques est donnée pour chaque seuillage.

b- L'analyse transcriptomique pour une meilleure compréhension des mécanismes de génération et de régulation des LT_{Regs} CD8⁺

L'analyse transcriptomique nous a également permis de mettre en lumière de nouveaux gènes et voies de régulations potentiellement impliquées dans la génération et le caractère suppressif des LT_{Regs} CD8⁺. Basée sur la littérature et les bases de données bioinformatiques des gènes impliqués dans la régulation négative du système immunitaire (Gene Ontology : GO:0050777), une liste restreinte de 30 gènes différentiellement exprimée entre les LT_{Regs} CD8⁺ et les populations contrôles a été dressée. La heatmap représentative de cette liste ainsi que le niveau d'expression moyen de quelques gènes d'intérêts sont données en Figure 16.

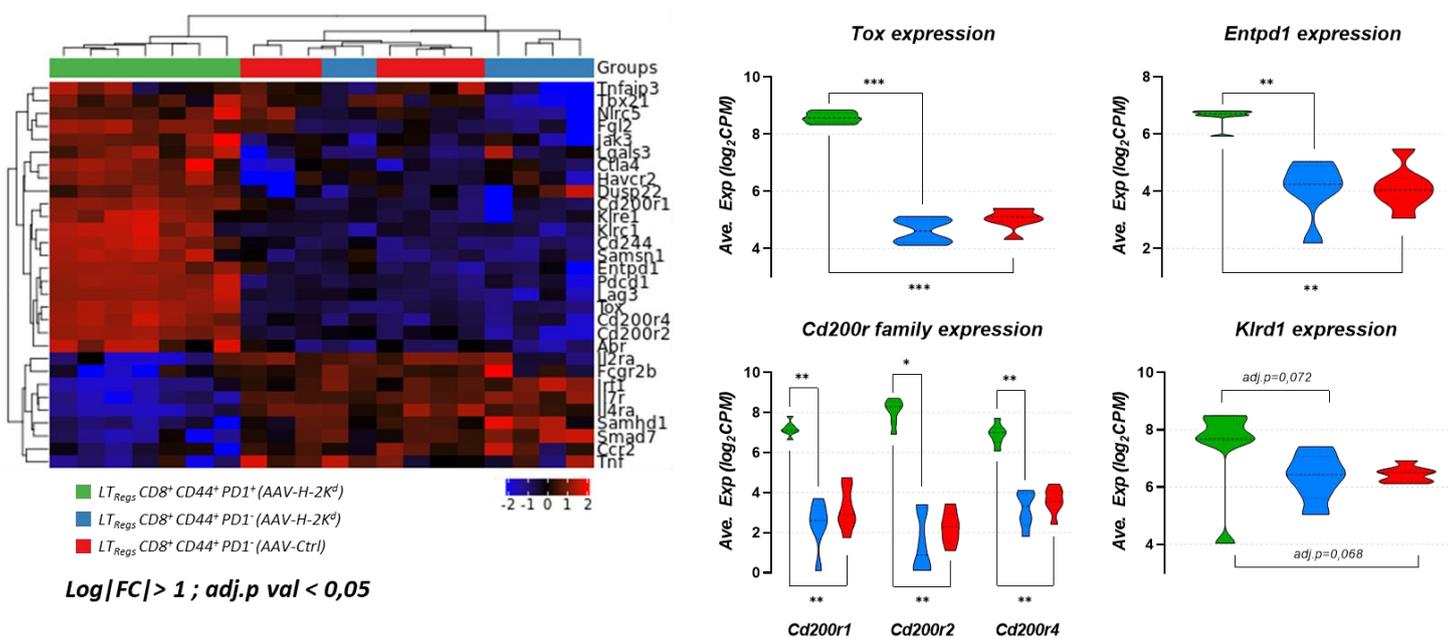


Figure 16 : Analyse transcriptomique des gènes impliqués dans la régulation négative du système immunitaire. Gauche : heatmap représentative du profil transcriptomique des populations LT_{Regs} CD8⁺ CD44⁺ PD1⁺ (i) et contrôles (ii) et (iii) associée à ces gènes. Droite : violin plots représentatifs du niveau d'expression moyen (log₂CPM pour « count per millions reads ») des gènes Tox, Entpd1 (codant pour CD39), Cd200r et Klr1d1 (codant pour CD94). * : adj.p val < 0,05 ; ** : adj.p val < 10⁻⁵ ; *** : adj.p val < 10⁻¹⁰.

Premièrement, la surexpression par les LT_{Regs} CD8⁺ du gène *Pdcd1* codant pour PD1, est un élément rassurant, attestant de la qualité de la préparation des échantillons étant donné que ceux-ci sont triés sur la présence ou non de ce marqueur. En ce sens, il est également intéressant de constater que les gènes codants pour les molécules inhibitrices CTLA-4, Lag3 et CD244 (2B4) sont surexprimés dans les LT_{Regs} CD8⁺, en accord avec le phénotype précédemment décrit de ces cellules (Le Guen et al., 2017).

Parmi les gènes surexprimés dans les LT_{Regs} CD8⁺ on retrouve le gène *Tox* codant la protéine du même nom. *Tox* (*Thymocyte selection-associated HMG bOX protein*) est un facteur de transcription initialement décrit pour son rôle dans le développement des lymphocytes T et des cellules NK (Aliahmad et al., 2012). Des études récentes suggèrent également son implication dans l'établissement et le maintien d'un phénotype épuisé des LT CD8⁺ dans des contextes d'infections chroniques (LCMV chez la souris, HCV chez l'homme), associée à l'expression des récepteurs inhibiteurs PD1, CTLA-4 et Lag3 (Alfei et al., 2019; Khan et al., 2019). En ce sens, la délétion de *Tox* dans des cellules T spécifiques d'un antigène viral est corrélée à la surexpression de gènes associés au caractère effecteur des cellules T (Khan et al., 2019). Ainsi, *Tox* semble être un régulateur important de la différenciation des LT CD8⁺ dans des contextes de persistance antigénique et pourrait donc être également indirectement impliqué dans les phénomènes d'inductions de tolérance dans le foie, en dirigeant la réponse T vers un phénotype épuisé plutôt qu'effecteur. Néanmoins, aucune étude ne permet pour l'instant d'associer l'expression de *Tox* à un phénotype régulateur. En ce sens, il serait intéressant d'évaluer notre stratégie d'induction de tolérance allogénique dans le foie des souris TOX KO décrites par Alfei et collaborateurs (Alfei et al., 2019).

La surexpression des récepteurs au CD200 par les LT_{Regs} CD8⁺ est également très intéressante. En effet, la molécule CD200 et ses récepteurs sont aujourd'hui considérés comme un nouveau checkpoint inhibiteur et sont de ce fait largement étudiés dans l'immunothérapie pour le traitement des cancers (Śledzińska et al., 2015). Ainsi, il a été démontré que les hauts niveaux d'expression de CD200 par la tumeur étaient associés à un mauvais pronostic et au développement tumoral (Moreaux et al., 2008; Siva et al., 2008). Le blocage de la voie CD200/CD200R par l'administration d'anticorps bloquants permet de stopper la croissance tumorale dans un modèle de lymphome de Burkitt chez la souris humanisée (Kretz-Rommel et al., 2008). En transplantation, la voie CD200/CD200R semble également d'importance (même si moins étudiée) : l'injection de CD200Fc permet une survie prolongée de greffe de peau allogénique chez la souris naïves, mais pas chez la souris CD200R1 KO (Boudakov et al., 2007). Il a également été démontré par des travaux *in vitro* que des APC exprimant CD200 sont capables d'inhiber des LT CD8⁺ présentant une spécificité antigénique par diminution de la production d'IFN- γ et de la mobilisation de la molécule CD107a nécessaire à la dégranulation des lymphocytes activés (Misstear et al., 2012). Au vu de ces

résultats et de la forte expression des récepteurs au CD200 à la surface des LT_{Regs} CD8⁺, il serait pertinent d'évaluer l'expression de la molécule CD200 à la surface des CPA hépatiques. Cela permettrait d'envisager la voie CD200/CD200R comme un nouvel acteur immunomodulateur impliqué dans les phénomènes d'induction de tolérance hépatique par inhibition localisée de la réponse T CD8 et/ou induction d'une réponse régulatrice CD8. En ce sens, il serait intéressant d'étudier la possibilité d'expansion des LT_{Regs} CD8⁺ dans le foie de souris CD200KO traitées avec le vecteur scAAV-H-2K^d.

Les surexpressions des gènes *Klrd1* et *Klrc1* codant respectivement pour les molécules CD94 et NKG2A sont également à souligner. Pour rappel, la molécule CD94 est exprimée par les cellules NK et quelques sous-types de cellules T CD8⁺ et sa signalisation requiert sa dimérisation avec une molécule de la famille des NKG2. Ainsi, le dimère CD94/NKG2C transmettra un signal activateur à la cellule qui le porte alors que le dimère CD94/NKG2A transmettra un signal inhibiteur (Borrego et al., 2006). Le ligand des récepteurs de type CD94/NKG2 est la molécule de CMH non-conventionnelle de classe I HLA-E chez l'homme, et son homologue Qa-1 chez la souris. De nombreuses études suggèrent l'implication de populations CD8 régulatrices restreintes à Qa-1 dans le contrôle de l'auto-immunité, *via* l'inhibition des LT CD4⁺ activés surexprimant Qa-1 (Jiang and Chess, 2000; Hu et al., 2004). Une étude menée en 2008 par Chattopadhyay et collaborateurs a également permis de mettre en évidence l'implication du dimère CD94/NKG2A dans les phénomènes d'induction de tolérance dans la chambre antérieure de l'œil (ou *ACAID* pour *Anterior Chamber-Associated Immune Deviation*). Dans ces travaux, il est démontré que l'injection d'antigène dans la chambre antérieure de l'œil de souris DBA/2J (démunie de molécules CD94 et NKG2A) ne permet pas l'induction de tolérance envers l'antigène injecté, normalement médiée par l'expansion de LT_{Regs} CD8⁺ chez les souris contrôles (Chattopadhyay et al., 2008). Néanmoins, ces travaux sont à nuancer par le fait que le modèle de souris utilisé (DBA/2J) est initialement décrit dans l'étude de pathologies oculaires telles que les glaucomes. Ainsi, l'environnement immunitaire oculaire peut être drastiquement modifié, au-delà du simple défaut d'expression des molécules CD94 et NKG2A. Ainsi, le couple CD94/NKG2A semble jouer un rôle important dans l'induction de certaines populations régulatrices CD8 même si son rôle biologique et les bases moléculaires sous-jacentes restent à déterminer. Cet exemple illustre bien l'intérêt de

l'analyse transcriptomique dans la caractérisation de populations cellulaires supposément hétérogènes, qui semblent au final présenter des propriétés communes.

L'analyse transcriptomique a également permis de mettre en évidence la surexpression par les LT_{Regs} CD8⁺ du gène *Entpd1* codant pour l'enzyme CD39 impliquée dans la régulation des niveaux d'ATP circulants et largement décrite comme l'un des mécanismes régulateurs majeurs des LT_{Regs} conventionnels CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (cf. introduction, partie 1.2.3.a-). De nombreuses études décrivent également l'expression de CD39 à la surface de populations de lymphocytes CD8 régulateurs, aussi bien chez l'homme que la souris (Vieyra-Lobato et al., 2018). Cela confirme la signature régulatrice des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins et suggère leur contribution dans l'établissement et le maintien de l'environnement tolérogène hépatique dans notre modèle d'induction de tolérance allogénique.

L'étude du transcriptome permet ainsi de mettre en avant de nouvelles voies potentiellement impliquées dans la génération et/ou le caractère régulateur des LT_{Regs} CD8⁺. Il convient néanmoins de valider l'expression protéique associée à ces gènes avant d'approfondir leur étude fonctionnelle.

2- Phénotypage des LT_{Regs} CD8⁺ murins

L'étude du transcriptome de nos LT_{Regs} CD8⁺ et de la littérature associée aux diverses populations de LT_{Regs} CD8⁺ chez la souris nous a permis de dégager un ensemble de marqueurs membranaires et intracellulaires pertinents pour l'analyse phénotypique des LT_{Regs} CD8⁺ induits dans le foie de souris après transfert de gène codant pour la molécule de CMH allogénique H-2K^d. L'étude a été menée sur 6 souris injectées en AAV-H-2K^d et 6 souris injectées en AAV-contrôle. 3 semaines après injection des vecteurs, les souris sont sacrifiées, leur foie récolté pour isolation des NPC (*non-parenchymal cells*) et phénotypage au FACS LSRII. Dans la continuité de l'analyse transcriptomique, la comparaison des phénotypes a été effectuée sur les 3 populations hépatiques de lymphocytes CD8⁺ précédemment décrites, pour rappel :

(i) Les LT_{Regs} CD8⁺ CD44⁺ PD1⁺ issus du foie de souris injectées avec l'AAV-H-2K^d (n=6)

(ii) Les LT CD8⁺ CD44⁺ PD1⁻ issus de ces mêmes foies (n=6)

(iii) Les LT CD8⁺ CD44⁺ PD1⁻ issus du foie de souris injectées avec l'AAV-Ctrl (n=8)

Le phénotypage a pour l'instant été effectué sur 14 marqueurs (dont ceux permettant la discrimination des 3 populations), les résultats sont visibles ci-dessous en *Figure 17*. La surexpression des gènes *Klrd1* et *Entpd1* Les protéines CD94 et CD39 se trouvent bien être fortement exprimées par les LT_{Regs} CD8⁺, confirmant la surexpression des gènes associés observée en RNA-seq. On retrouve également une surexpression de la protéine CD27 de la famille des récepteurs aux facteurs de nécrose tumorale. La protéine CD27 est principalement exprimée par les lymphocytes CD8⁺ et CD4⁺ (incluant les LT_{Regs} CD4⁺ Foxp3⁺) ainsi que par les lymphocytes B mémoires et une faible proportion de cellules NK. Son ligand principal décrit est la protéine CD70, exprimée principalement par les APC et les cellules T activées. Si l'interaction CD27-CD70 est depuis longtemps associée à la co-activation des cellules T (Hintzen et al., 1995), des études plus récentes suggèrent au contraire son rôle dans la prolifération, la survie et la potentialisation du caractère suppressif des LT_{Regs} CD4⁺ Foxp3⁺ (Duggleby et al., 2007; Claus et al., 2012). Néanmoins, très peu d'études font état de l'expression de ce marqueur sur des populations de LT_{Regs} CD8⁺.

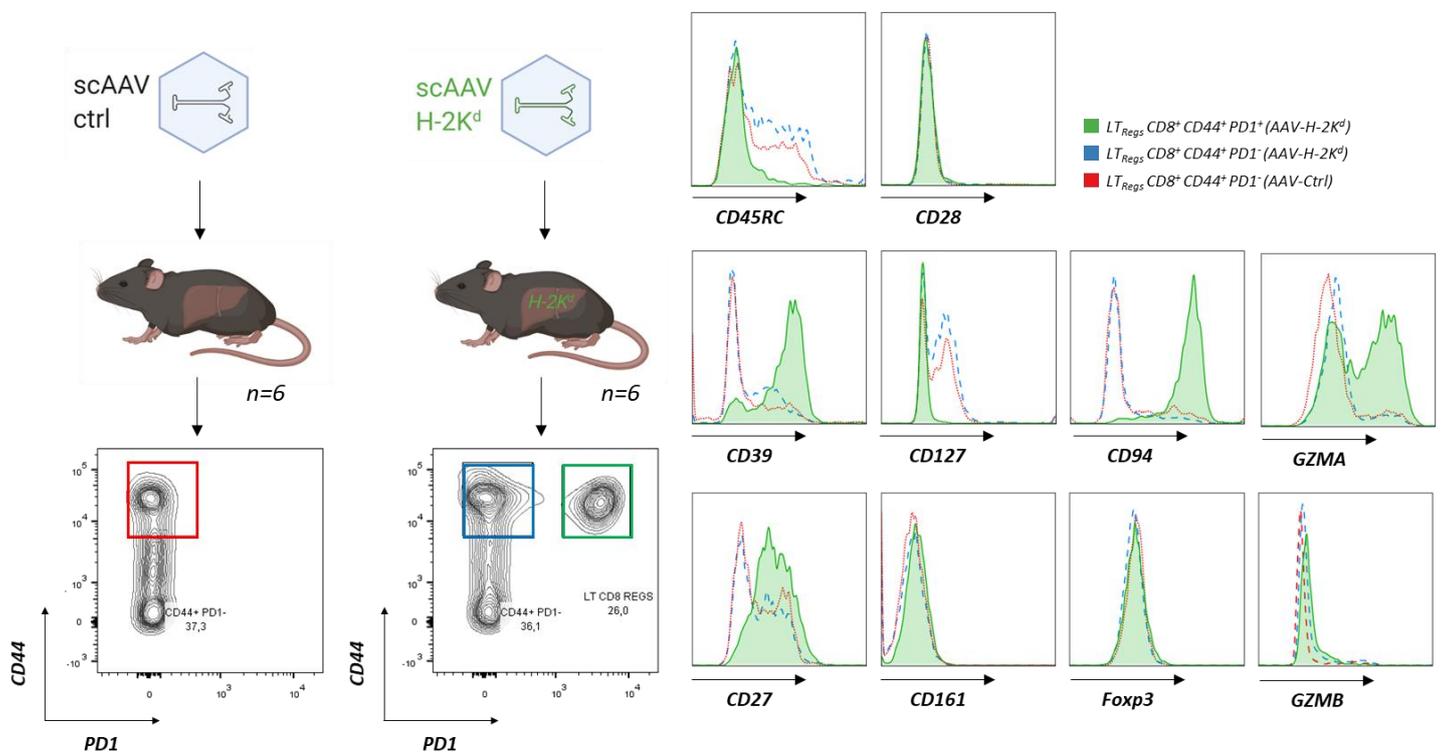


Figure 17 : Phénotypage des LT_{Regs} CD8⁺ CD44⁺ PD1⁺ (i) et des deux populations contrôles associées (ii) et (iii), isolées à partir de foies de souris injectées en scAAV-Ctrl (n=6) ou scAAV-H-2K^d (n=6). Les marqueurs membranaires CD45RC, CD28, CD39, CD127 (IL-7R), CD94, CD27, CD161 et intracellulaires GZMA (Granzyme A), Foxp3 et GZMB (Granzyme B) ont été étudiés. Gauche : protocole expérimental et stratégie de gating ; droite : histogrammes représentatifs.

Ainsi, cela soulève la question du rôle de l'interaction CD27-CD70 dans la génération et le maintien de la population de LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques.

La sous-expression de la sous-unité α du récepteur à l'IL-7 (ou CD127) observée sur nos LT_{Regs} CD8⁺ est également une caractéristique commune permettant la discrimination des lymphocytes régulateurs conventionnels CD4⁺ Foxp3⁺ (au même titre par exemple que l'expression de CD39) mais également de nombreuses populations régulatrices CD8⁺ (Flippe et al., 2019; Yu et al., 2018).

En ce sens, la faible expression du marqueur CD45RC par les LT_{Regs} CD8⁺ comparé aux populations contrôles est également informative, et confirme un peu plus le profil régulateur de ces cellules. La molécule CD45 est une tyrosine phosphatase impliquée dans de multiples fonctions biologiques et le niveau d'expression de ces différentes isoformes permet de discriminer de nombreuses populations lymphocytaires aussi bien chez l'homme que chez la souris. En effet, il a été démontré qu'une forte expression des isoformes CD45RC et CD45RB était associé à un profil effecteur aussi bien pour les LT CD4⁺ (Xystrakis et al., 2004) que pour les LT CD8⁺ (Ordonez et al., 2013). Au contraire, la sous-expression de ces molécules est quant à elle reliée au profil régulateur des lymphocytes T impliqués dans le contrôle du rejet de greffe (Davies et al., 1999; Guillonnet et al., 2007).

L'analyse RNA-seq a également mis en avant un profil d'expression particulier des LT_{Regs} CD8⁺ pour les gènes codant des molécules impliquées dans la cytotoxicité, notamment par une surexpression de la perforine ainsi que de certains granzymes (données non-montrées). Ainsi, si l'analyse du transcriptome permet de mettre en évidence la surexpression du gène *GZMA* (cf. *Table 7* en annexe), l'analyse phénotypique complète cette étude et démontre l'existence d'une sous-population de LT_{Regs} CD8⁺ GZMA⁺. Cette observation est assez singulière car, à ma connaissance, il n'existe pas de population de lymphocytes régulateurs décrite pour son expression du granzyme A, contrairement au granzyme B (Gondek et al., 2005; Li et al., 2012) qui lui ne semble pas du tout exprimé par nos LT_{Regs} CD8⁺. Il serait maintenant pertinent de comparer fonctionnellement les LT_{Regs} CD8⁺ exprimant ou non le granzyme A afin d'évaluer leur suppression, et d'identifier ainsi une potentielle nouvelle voie de régulation par cytotoxicité directe. Néanmoins, cela est grandement compliqué par la localisation intracytoplasmique de cette molécule. Ainsi, la solution serait d'utiliser un gène rapporteur

fluorescent couplé au granzyme A, qui nous permettrait de trier les cellules GZMA⁺ sans altérer leur intégrité. Enfin, l'analyse du phénotype des LT_{Regs} CD8⁺ a permis de confirmer l'absence d'expression du facteur de transcription Foxp3⁺.

Par ailleurs, une analyse a également été effectuée sur la rate de ces souris sur un très grand nombre de splénocytes (>5M) dans le but de rechercher cette population de LT_{Regs} CD8⁺ jusqu'alors exclusivement retrouvée dans le foie des souris injectées en scAAV-H-2K^d. Néanmoins, aucun signal CD8⁺ CD44⁺ PD1⁺ n'est observé aussi bien dans les rates des souris contrôles que dans celles des souris injectées en AAV-H-2K^d (données non-montrées).

Cette étude permet ainsi d'enrichir les travaux précédents de l'équipe (Le Guen, 2017) et le phénotype associé aux LT_{Regs} CD8⁺ (CD8⁺ CD44⁺ CD62L⁻ CD69⁺ PD1⁺ CD122⁺ CD25⁺ CD94⁺ CD39⁺ CD27⁺ CD127⁻ CD45R^{low}) induits dans le foie après transfert de gène codant pour la molécule de CMH allogénique H-2K^d et souligne un peu plus leur profil régulateur. En effet, en l'absence d'un marqueur discriminant tel que Foxp3 pour les LT_{Regs} CD4⁺ conventionnels, il est très important d'enrichir au maximum le phénotype cellulaire des LT_{Regs} CD8⁺ pour mieux appréhender leurs mécanismes d'actions mais également pour faciliter leur comparaison avec d'autres populations régulatrices CD8⁺. Néanmoins, l'analyse phénotypique d'une population cellulaire est exclusivement descriptive et nécessite d'être complétée par des études fonctionnelles afin de confirmer l'implication de nouveaux marqueurs dans leurs fonctions suppressives.

3- Recherche d'une signature CD8⁺ régulatrice chez le patient transplanté hépatique

En parallèle de la caractérisation des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins, j'ai également pu débiter la recherche d'une population lymphocytaire équivalente chez l'homme. En effet notre modèle murin d'induction de tolérance allogénique par transfert de gène dans le foie est un modèle se rapprochant de la situation clinique de tolérance opérationnelle d'allogreffe hépatique et d'allogreffes combinées (développé en partie 1.2.3.b-). Au vu de l'implication de la population régulatrice CD8⁺ hépatique dans notre modèle murin d'induction de tolérance allogénique par transfert de gènes dans le foie, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'une population similaire chez des patients tolérants une greffe de foie. Nous avons ainsi

débuté la recherche, chez le patient transplanté hépatique, de populations lymphocytaires CD8⁺ présentant une signature phénotypique tolérogène comme marqueur prédictif dans la mise en place d'une tolérance opérationnelle après arrêt des traitements immunosuppresseurs.

Dans la continuité de mes travaux, cette signature tolérogène est basée sur la littérature et les analyses du transcriptome et du phénotype de la population CD8⁺ régulatrice induite dans un contexte allogénique hépatique présentée un peu plus haut. La principale problématique étant que la population de LT_{Regs} CD8⁺ induite chez la souris après transfert de gènes est restreinte au foie et que l'accès à des échantillons de foie de patients transplantés est assez complexe. Nous avons donc choisi d'analyser dans un premier temps les PBMC de ces patients. Pour ce faire, nous avons accès à des échantillons de PBMC de patients transplantés hépatiques intégrés dans l'essai clinique « LIFT » (*Liver Immunosuppression Free Trial* - NCT02498977) mené par le Professeur A. Sanchez Fueyo. Pour résumer, cet essai clinique vise à confirmer la pertinence de marqueurs transcriptomiques prédictifs d'un état de tolérance opérationnelle permettant d'envisager l'arrêt des traitements immunosuppresseurs chez des patients transplantés hépatiques (Vionnet and Sánchez-Fueyo, 2018). Nous avons ainsi analysé les PBMC de 16 patients transplantés hépatiques, collectées juste avant arrêt des traitements immunosuppresseurs, dont 50% ont finalement présentés une tolérance opérationnelle après arrêt des traitements (*Figure 18*). L'analyse phénotypique des PBMC est effectuée au cytomètre de flux sur une quinzaine de marqueurs, similairement à l'analyse du phénotype des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins présentée juste au-dessus.

L'objectif de cette étude est d'analyser la réponse CD8 des patients transplantés pour éventuellement mettre en évidence l'enrichissement d'une population présentant une signature tolérogène chez les patients tolérants leur allogreffe de foie après arrêt des traitements immunosuppresseurs. Les PBMC des patients transplantés sont également comparées aux PBMC d'individus sains comme contrôle négatif.

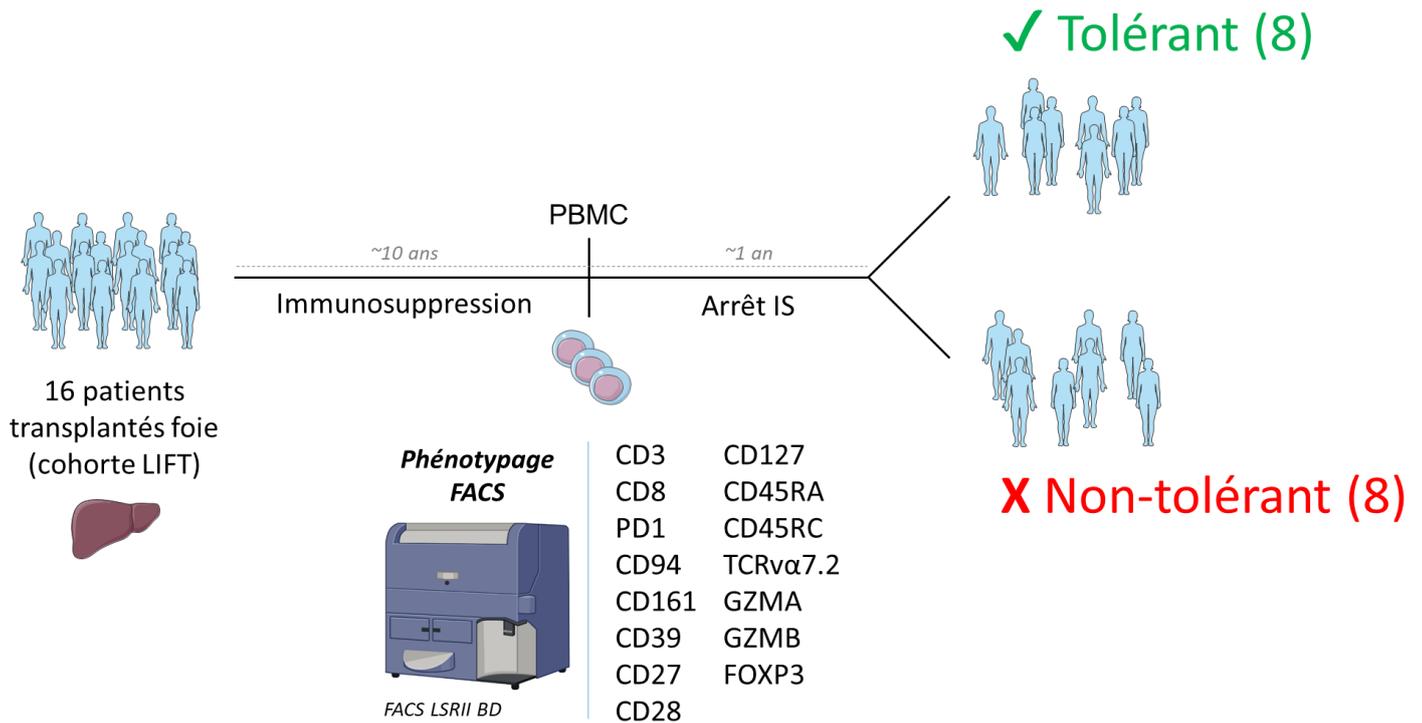


Figure 18 : Recherche d'une population CD8⁺ tolérante chez des patients transplantés hépatiques (cohorte LIFT) avant arrêt des traitements immunosuppresseurs. Environ 1 an après l'arrêt des traitements immunosuppresseurs (IS), le statut de l'allogreffe hépatique est évalué et 50% des patients analysés présentent une tolérance opérationnelle envers leur greffon.

Ainsi, notre stratégie d'analyse, présentée en *Figure 19A*, permet l'étude des LT CD8⁺ vivants, en excluant les lymphocytes MAIT (*Mucosal-Associated Invariant T cells*) CD161⁺ TCR α 7.2⁺ décrits pour leurs propriétés effectrices et pro-inflammatoires (Godfrey et al., 2019). Les résultats de cette analyse sont donnés en *Figure 19B*. Malgré une analyse optimale des différents marqueurs, nous n'avons pas mis en évidence d'enrichissement significatif de sous-populations CD8⁺ PD1⁺ chez les patients tolérants. Ce manque de puissance statistique s'explique par une grande hétérogénéité lymphocytaire entre les patients transplantés mais également par un effectif réduit par la viabilité de certains échantillons, ne permettant pas l'analyse de l'intégralité des marqueurs.

Ces résultats suggèrent néanmoins que certains patients tolérants présentent une proportion plus importante de LT CD8⁺ PD1⁺ circulants. Il est intéressant de noter que les LT CD8⁺ PD1⁺ de ces quelques patients tolérants présentent un profil se rapprochant d'une signature CD8 régulatrice par la sous-expression du récepteur à l'IL-7 (CD127) et de la molécule de costimulation CD28 ; et par la surexpression de CD94, CD27 et des molécules de granzyme A

et B. Il est cependant nécessaire d'accroître l'effectif analysé avant de pouvoir conclure quant à l'enrichissement spécifique de cette population chez les patients tolérants.

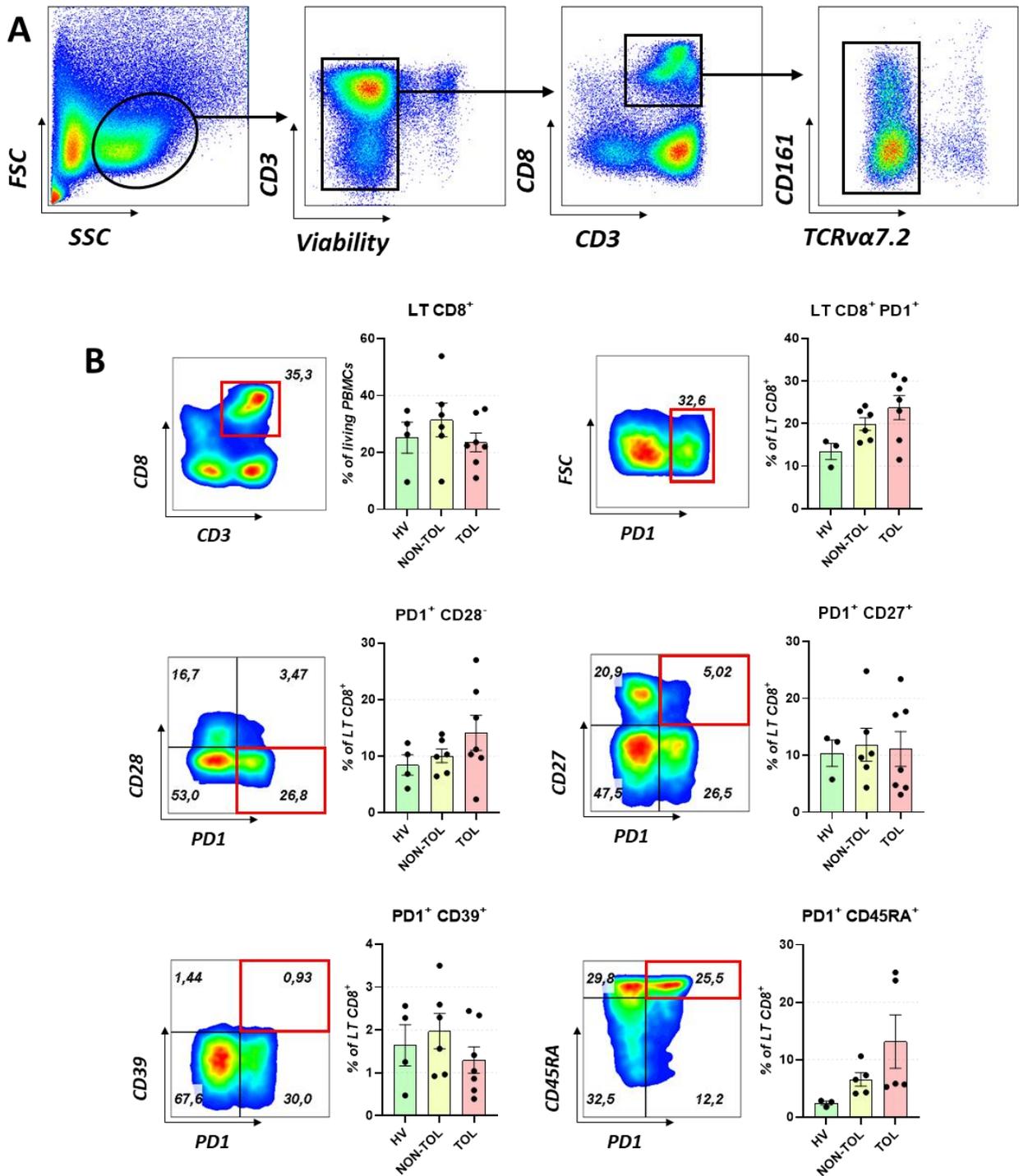


Figure 19 : Analyse phénotypique des PBMC de patients transplantés hépatiques avant arrêt des traitements immunosuppresseurs. (A) Stratégie de gating. (B) Analyse de la co-expression des marqueurs étudiés avec le marqueur PD1. Gauche : dotplot représentatif ; Droite : histogrammes synthétisant les résultats de tous les patients analysés. TOL : patients présentant une tolérance opérationnelle envers leur greffon hépatique après arrêt des traitements ; NON-TOL : patients ne présentant pas de tolérance opérationnelle envers leur greffon après arrêt des traitements (retour à un traitement immunosuppresseur) ; HV : donneurs sains.

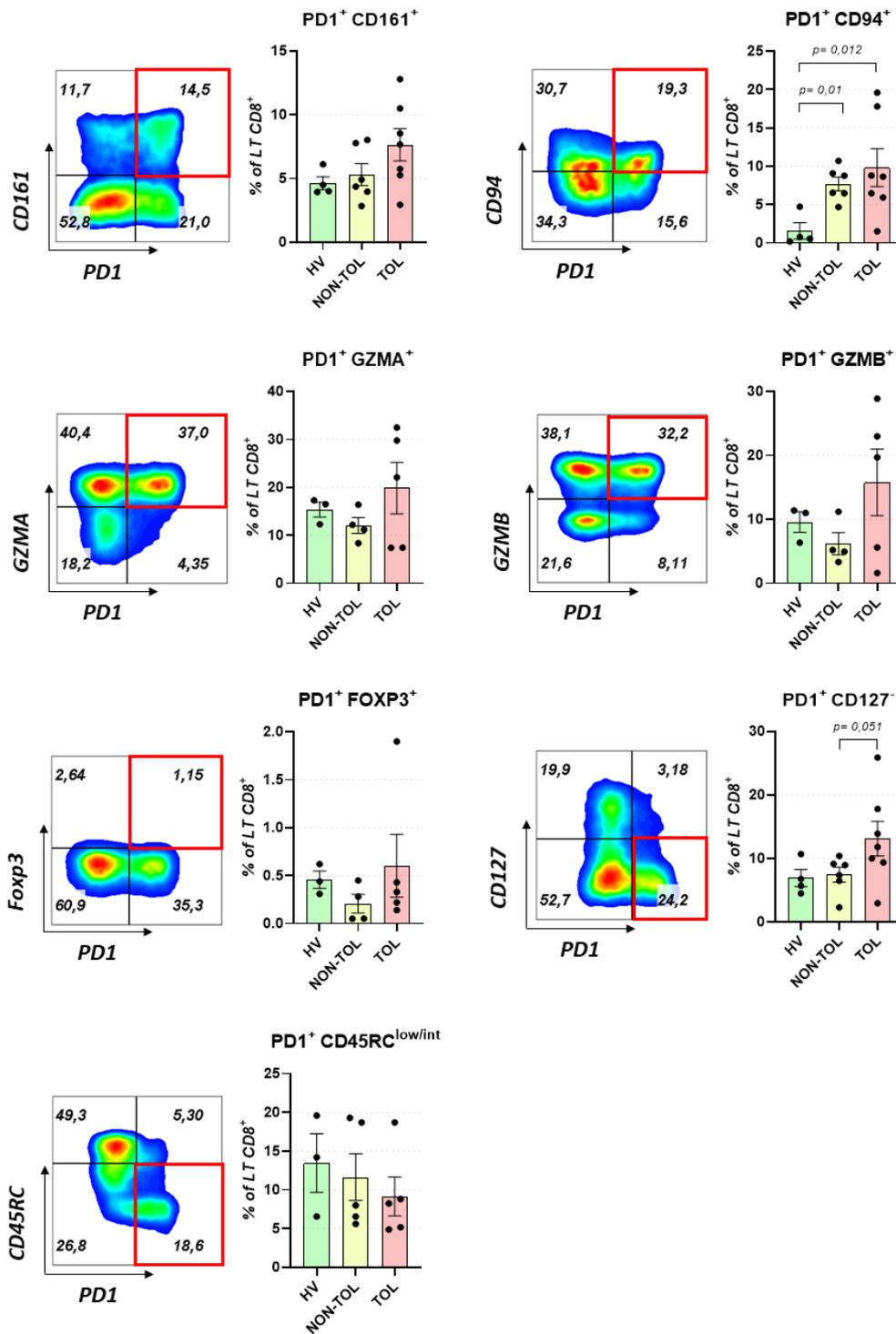


Figure 18 : suite.

Discussion

1- De la caractérisation des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins à la recherche d'une équivalence chez l'homme

Dans cette première partie de mes résultats de thèse, j'ai présenté l'analyse transcriptomique des LT_{Regs} CD8⁺ induits dans le foie des souris traitées avec l'AAV-H-2K^d et l'intérêt de celle-ci dans la caractérisation d'une population cellulaire. Cette analyse RNA-seq a permis de mettre en évidence un profil transcriptomique hautement différentiel des LT_{Regs} CD8⁺ associé à la surexpression de nombreux gènes impliqués dans la régulation négative du système immunitaire (*e.g.* *CD200r*, *Entpd1* [CD39], *Klrd1* [CD94]) mais également dans l'épuisement cellulaire (*e.g.* *Tox*, *Pdcd1* [PD1], *Prdm1* [BLIMP-1], *Havcr2* [Tim-3]). En ce sens, les LT_{Regs} CD8⁺ induits dans notre modèle se rapprochent grandement d'un phénotype « épuisé », notamment par la surexpression de PD1, Tim-3 et des facteurs de transcriptions *Tox* et BLIMP-1 (*B-lymphocyte-induced Maturation Protein 1*) mais également par leur sécrétion d'IL-10 (Yi et al., 2010). En ajoutant à cela l'absence de *Foxp3* dans ces cellules, le caractère régulateur de ces cellules a de nombreuses fois été remis en question. Nous pouvons néanmoins affirmer que ces LT CD8⁺ sont bien régulateurs grâce aux tests fonctionnels effectués, démontrant le potentiel suppressif de ces cellules aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Le Guen et al., 2017). De plus, nous développons actuellement un autre test de suppression *in vivo* (présenté un peu plus bas) afin de confirmer les fonctions suppressives de ces cellules dans un modèle différent.

En associant l'analyse du transcriptome avec des données de la littérature, nous avons approfondi la caractérisation phénotypique de ces cellules et précisé leur signature régulatrice par la surexpression des marqueurs CD27, CD39, CD94 et la sous-expression des marqueurs CD127 et CD45RC. De façon intéressante, l'analyse du phénotype a mis en évidence une sous-population de LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins exprimant fortement le granzyme A, là où le RNA-seq ne démontre qu'une surexpression globale du gène *GZMA*. Cela démontre en fait les limites du « *bulk* » RNA-seq (sur cellules totales) qui dresse un profil transcriptomique global de la population étudiée contrairement au « *single-cell* » RNA-seq (sur cellule unique) qui permet d'étudier le profil transcriptomique à l'échelle unicellulaire et de mettre en avant l'existence de sous-populations cellulaires.

Enfin, se basant sur les caractérisations du transcriptome et du phénotype des LT_{Regs} CD8⁺ murins induits dans un contexte hépatique allogénique, nous avons débuté la recherche d'une signature CD8 régulatrice similaire dans la situation clinique se rapprochant le plus de notre modèle à savoir des patients tolérants leur greffe allogénique de foie. Nous avons eu accès à des échantillons de PBMC prélevés chez des patients transplantés hépatiques inclus dans la cohorte LIFT (NCT02498977) juste avant l'arrêt des traitements immunosuppresseurs. Cependant, le screening phénotypique d'une quinzaine de marqueurs membranaires et intracellulaires associés à notre signature régulatrice n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives chez les patients qui développeront par la suite une tolérance opérationnelle. Une explication possible est que le traitement immunosuppresseur au tacrolimus (inhibiteur de la calcineurine bloquant l'activation T - cf. introduction, partie 1.1.3.b-) suivi pendant près de 10 ans par l'ensemble des patients étudiés a profondément remodelé le système immunitaire de ceux-ci. En ce sens, il serait intéressant d'analyser les PBMC des patients présentant aujourd'hui une tolérance opérationnelle envers leur greffon hépatique après sevrage complet des traitements immunosuppresseurs. Cela peut également s'expliquer par un manque de puissance statistique lié au faible nombre d'échantillons analysés pour le moment. En effet, l'analyse des marqueurs s'effectue par le biais de 4 panels d'anticorps fluorescents dont la combinaison est techniquement limitée par le cytomètre de flux utilisé (LSRII - BD). La quantité de cellules analysées par patient est donc divisée par 4. Ainsi, nous avons fait le choix pour certains échantillons pauvres en cellules viables de n'intégrer qu'un ou deux panels afin de travailler sur une quantité suffisante de cellules. Afin de palier à cette contrainte technique, nous pouvons désormais compter sur le nouveau cytomètre spectral Aurora (Cytec) installé il y a peu dans notre laboratoire, permettant d'augmenter les combinaisons d'anticorps fluorescents jusqu'à 40 au sein d'un même panel (Park et al., 2020) et ainsi d'analyser un très grand nombre de marqueurs sur une quantité de cellules réduite. Enfin, il se peut également que, à l'instar de notre modèle murin, l'enrichissement d'une population CD8 régulatrice soit, chez ces patients, restreint au niveau du foie allogénique transplanté. Ainsi, si l'analyse phénotypique des PBMC des patients transplantés ne donne pas de résultats probants, il pourra être envisagé d'étudier les LT hépatiques de ces patients, à l'échelle transcriptomique en single-cell RNA-seq grâce aux biopsies effectuées après arrêt des traitements immunosuppresseurs.

Une perspective plus lointaine est aussi de travailler sur l'étude longitudinale d'une cohorte rennaise de patients transplantés hépatiques, stables sous immunosuppression, à 1 an et 5 ans post transplantation, afin de rechercher un enrichissement lymphocytaire associée à notre signature CD8 régulatrice. Nous prévoyons également de travailler en collaboration avec S. Brouard sur une cohorte de patients tolérants leur greffe de rein en l'absence de traitements immunosuppresseurs, afin d'étendre la recherche d'une signature CD8 régulatrice à un contexte allogénique lié à un autre organe que le foie.

2- Vers l'expansion des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins

L'un des principaux obstacles dans l'étude des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins est le très faible nombre de cellules que nous pouvons récupérer dans le foie des souris traitées avec l'AAV-H-2K^d: entre 20 000 et 40 000 cellules par souris. Cela reflète en fait le faible nombre global de CD8 résidents dans le foie des souris (autour de 100 000 par foie). Ainsi, la stratégie utilisée aujourd'hui consiste à regrouper les LT_{Regs} CD8⁺ provenant de plusieurs souris donneuses, afin de travailler sur un nombre de cellules plus conséquent mais également de « miniaturiser » certains protocoles, comme la coculture hépato-lymphocytaire présentée plus bas. Néanmoins, cette stratégie qui nous permet de récupérer de 2 à 3.10⁵ LT_{Regs} CD8⁺ sur 10 souris donneuses, présente des limites éthiques liées au grand nombre de souris donneuses nécessaire aux diverses manipulations que nous effectuons. Ainsi, il nous apparait aujourd'hui indispensable de débiter l'étude de l'expansion *ex vivo* des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins afin d'approfondir leur caractérisation. L'analyse du phénotype et du transcriptome des cellules ainsi que des données de la littérature nous permettent d'envisager certains protocoles d'expansion.

Premièrement, la surexpression de la sous-unité α du récepteur à l'IL-2 (CD25) suggère l'intérêt de cette cytokine dans l'expansion des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins, comme démontré pour les LT_{Regs} CD4⁺ Foxp3⁺ conventionnels exprimant eux aussi fortement le CD25 (Liu et al., 2010; Hippen et al., 2011). De plus, les LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins se distinguent, contrairement au LT_{Regs} CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, par la forte expression de CD122, sous-unité β du récepteur à l'IL-2 et à l'IL-15. Cette forte expression de CD122 est une caractéristique commune à de nombreuses populations CD8 régulatrices et permet leur expansion et la potentialisation de leurs fonctions suppressives en présence d'IL-2 et d'IL-15 (Suzuki et al.,

2012; Churlaud et al., 2015; Bézie et al., 2018b). Parmi les autres cytokines d'intérêt pour l'expansion des LT_{Regs} CD8⁺, nous retenons également l'IL-27, récemment décrite pour son rôle associé aux fonctions suppressives des LT_{Regs} conventionnels. En effet, des injections d'IL-27 permettent le contrôle de l'EAE dans des souris naïves mais pas dans des souris T_{Regs}^{ΔIL27ra} (Do et al., 2016, 2017), suggérant l'importance de la signalisation IL-27 dans les fonctions suppressives des LT_{Regs}. L'analyse transcriptomique de nos cellules a permis de mettre en avant une forte expression du récepteur à l'IL-27 bien que similaire aux groupes contrôles (*données non-montrées*). Il serait donc intéressant d'évaluer le potentiel suppressif des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins cultivés avec et sans IL-27.

La question de la stimulation TCR pour l'expansion des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins est également d'importance. Nous avons précédemment démontré que ces cellules sous-expriment le complexe CD3-TCR et ne secrètent de l'IL-10 qu'en présence d'APC syngéniques (JAWSII - ATCC® CRL-11904™) présentant la molécule de CMH H-2K^d à leur surface (Le Guen et al., 2017), suggérant une clonalité spécifique d'H-2K^d (qu'il reste cependant à confirmer par des tests de clonalité). Ainsi, il serait intéressant de comparer leur prolifération et surtout leur potentiel suppressif après expansion en présence d'agoniste CD3/CD28 (stimulation polyclonale) ou en présence de JAWSII-H-2K^d (stimulation antigénique).

La principale difficulté dans l'expansion d'une population cellulaire et surtout d'une population régulatrice est de conserver leurs fonctions suppressives après expansion. Il est donc impératif de développer des tests suppressifs robustes permettant d'évaluer la suppression des LT_{Regs} CD8⁺.

3- Mise en place d'un test fonctionnel *in vivo* pour confirmer le potentiel suppressif des LT_{Regs} CD8⁺

Nous développons actuellement un test fonctionnel *in vivo* permettant :

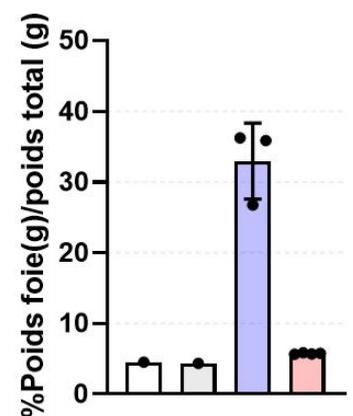
- (i) de confirmer l'induction de tolérance allogénique induite par transfert de gènes dans le foie.
- (ii) d'évaluer le potentiel suppressif des LT_{Regs} CD8⁺ dans un autre modèle que la transplantation d'îlots pancréatiques.

Il s'agit d'un modèle murin de carcinome hépatocellulaire (ou HCC) induit par l'injection intra-portale à des souris C57Bl/6 (H-2^b) d'une lignée hépatocytaire tumorale murine syngénique Hepa1.6 (ATCC® CRL-1830™). Ce modèle tumorale, maitrisé au sein de notre équipe (Gauttier et al., 2014), est particulièrement intéressant pour nous car plus aisé à mettre en place que le modèle de greffe d'îlots pancréatiques (qui nécessite des souris donneuses). De plus, les cellules Hepa1.6 sont facilement cultivables et modifiables : la transduction à l'aide d'un lentivirus codant pour H-2K^d sous promoteur ubiquitaire (PGK pour *phosphoglycerate kinase*) permet l'obtention d'une lignée Hepa1.6 H-2K^d stable (sur fond génétique H-2b). Cela permet d'enrichir le modèle Hepa1.6 en le portant à l'interface d'un modèle tumorale, de par sa facilité de mise en place, et d'un modèle de transplantation, de par le contexte allogénique apporté par les Hepa1.6 H-2K^d.

Nous avons posé l'hypothèse que, dans la continuité du modèle de transplantation d'îlots pancréatiques, l'expression de l'alloantigène H-2K^d au niveau hépatique était un critère nécessaire au développement tumoral après injection d'Hépa1.6 H-2K^d. Des souris C57Bl/6 naïves ou traitées au préalable avec le vecteur AAV-H-2K^d sont injectées dans la veine porte avec 2,5 10⁶ Hepa1.6 ou Hepa 1.6 H-2K^d. Les souris sont sacrifiées 2 semaines après challenge tumoral et la prise tumorale évaluée par la mesure du ratio poids du foie/poids total.

Prise tumorale

	inj. Hepa 1.6	inj. Hepa 1.6 K ^d
<i>Souris naïves</i>	2/2 	0/4 
<i>Souris sc-AAV-H-2K^d</i>	∅	3/3 



	C57Bl/6	+	+	+	+
scAAV-H-2K ^d	-	+	+	+	+
Hepa 1.6 WT	-	-	-	-	+
Hepa 1.6 K ^d	-	-	+	-	-

Figure 20 : Modèle de prise tumorale associée à l'injection de cellules Hepa1.6 et Hepa1.6 H-2K^d. Les cellules Hepa1.6 H-2K^d n'induisent d'hépatomes que chez les souris ayant préalablement reçues une injection d'AAV-H-2K^d, exprimant ainsi l'alloantigène au niveau hépatique. Gauche: aspect macroscopique des foies des souris après injection des cellules Hepa1.6 et ratio de prise tumorale associée. Droite : évaluation de la prise tumorale par la prise de poids du foie. WT : wild type

Ainsi, les souris C57Bl/6 naïves présentent bien un fort développement tumoral hépatique après injection avec des Hepa1.6 naïfs, comme établi précédemment. Cependant, du fait d'un rejet allogénique, aucun développement tumoral n'est observé chez ces souris naïves après injection d'Hepa1.6 H-2K^d. Enfin, les souris traitées au préalable avec l'AAV-H-2K^d présentent bien un fort développement tumoral après injection d'Hepa1.6 H-2K^d. La prise de la tumeur est reflétée par un aspect macroscopique du foie très caractéristique, et une augmentation du volume hépatique (*Figure 20*).

Bien que ces résultats aillent dans le sens de ceux obtenus dans le modèle de transplantation d'îlots pancréatiques, il convient de les contextualiser. En effet, ce modèle tumoral présente un caractère allogénique moindre (« single mismatch ») comparé à celui de la greffe d'îlots pancréatiques « fully allogeneic », pouvant expliquer le taux de prise tumorale Hepa1.6 H-2K^d dans les souris injectées en AAV-H-2K^d largement supérieur (100%) à celui de la prise de greffe d'îlots pancréatiques allogéniques (50%) dans ces mêmes souris. De plus ce modèle ne permet de conclure qu'à une tolérance hépatique et non systémique envers l'alloantigène.

Nous souhaitons maintenant enrichir ces résultats par des expériences de transfert adoptif de LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins simultanément à l'injection des cellules Hepa1.6. L'hypothèse que nous posons est que, à l'instar du modèle de transplantation d'îlots pancréatiques allogéniques, l'injection *i.v.* de 2 à 5 10⁵ LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques soit suffisante pour induire une prise tumorale allogénique d'Hepa1.6 H-2K^d chez des souris naïves. La condition contrôle est représentée par l'injection de LT CD8⁺ CD44⁺ PD1⁻ issus de souris également traitées avec l'AAV-H-2K^d (*Figure 21*). Si notre hypothèse s'avère exacte et que les LT_{Regs} CD8⁺ suffisent effectivement à induire une tolérance allogénique envers les cellules Hepa1.6 H-2K^d nous disposerons ainsi d'un test fonctionnel *in vivo* robuste, plus facile à mettre en place que le modèle de transplantation d'îlots pancréatiques mais également plus éthique car limitant largement le nombre de souris utilisées. Cela permettra également de confirmer le potentiel suppressif des LT_{Regs} CD8⁺ avant et après expansion. À l'heure où je rédige ce manuscrit, nous procédons aux premiers essais de transfert adoptif de LT_{Regs} CD8⁺.

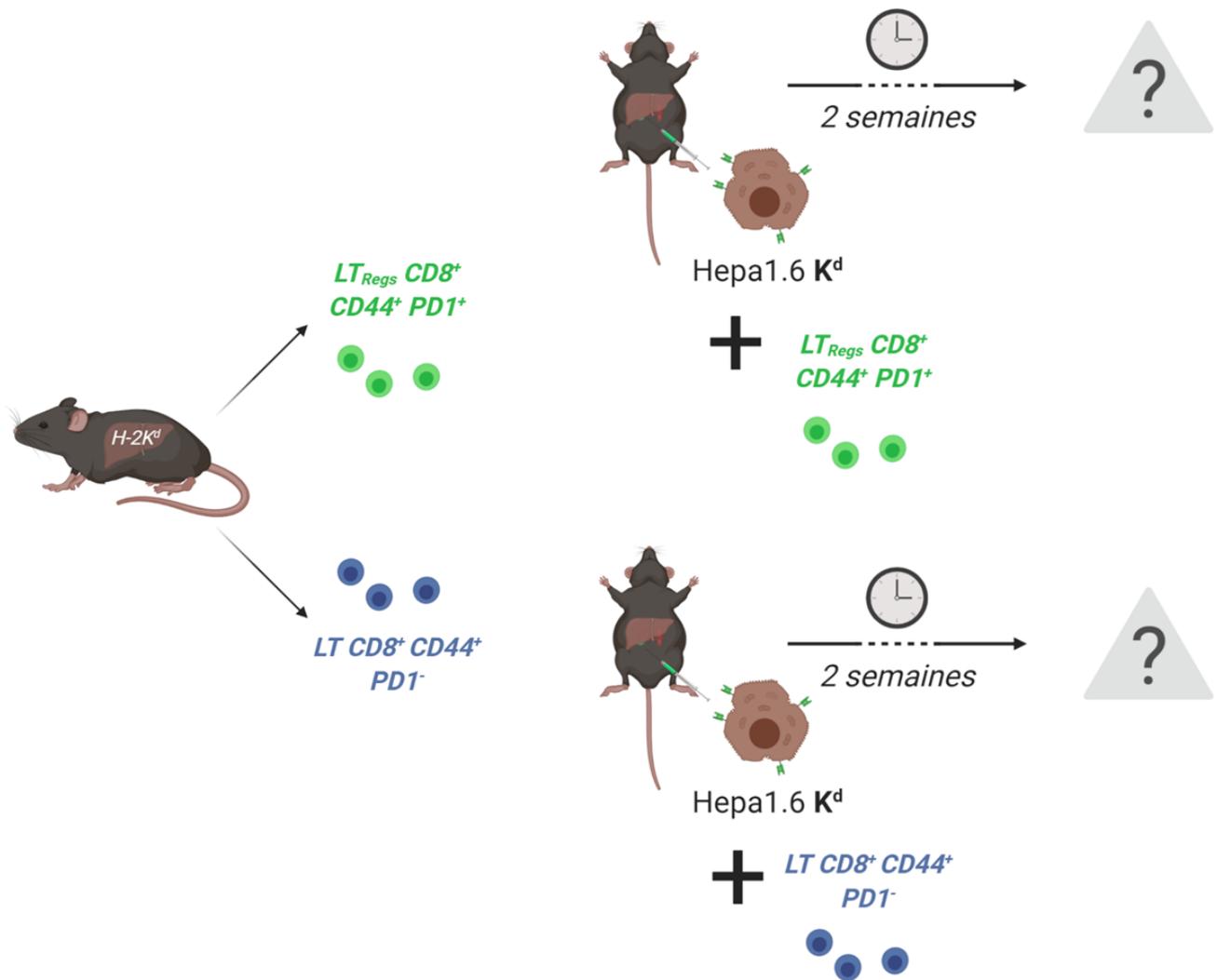


Figure 21 : Étude du potentiel suppressif des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins dans le modèle d'hépatocarcinome allogénique induit par les cellules Hepa1.6 H-2K^d. Des souris C57Bl/6 naïves sont injectées dans la veine porte avec 2,5 10⁶ Hepa1.6 H-2K^d simultanément à une injection i.v. de 2 à 5 10⁵ LT_{Regs} CD8⁺ CD44⁺ PD1⁺ ou LT CD8⁺ CD44⁺ PD1⁻ provenant du foie de souris injectées en AAV-H-2K^d. Les souris sont sacrifiées 2 semaines plus tard et la prise tumorale évaluée comme précédemment.

II- Caractérisation microscopique des LT_{Regs} CD8⁺

Introduction

Dans cette seconde partie de mes travaux, je me suis particulièrement intéressé au développement d'outils microscopiques permettant l'étude des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins *in situ*. En effet, comme mentionné dans la synthèse du projet, l'un de mes objectifs de thèse est d'étudier le comportement de ces cellules vis-à-vis de leur environnement naturel, à savoir, le foie. En effet, nous sommes convaincus que ces cellules, générées dans le foie des souris injectées en scAAV-H-2K^d, et impliquées dans l'induction de tolérance systémique, sont étroitement liées aux multiples acteurs immunitaires hépatiques (*cf.* introduction, partie 2.2.3.). Pour ce faire, j'ai pu travailler en collaboration avec la plate-forme d'expertise microscopique Apex (Nantes) dirigée par Laurence Dubreil, mais également avec l'équipe Lyonnaise de Marie-Thérèse Charreyre spécialisée dans la production et l'optimisation de sondes fluorescentes de dernière génération. L'objectif de ce travail étant de développer une approche multimodale permettant le tracking optimisé de cellules immunitaires dans le foie de souris. Bien que ces travaux aient été initialement menés sur des LT CD8⁺ primaires spléniques par soucis de disponibilités de cellules, l'objectif final est d'appliquer cette méthodologie et ses avancées technologiques à la caractérisation des LT_{Regs} CD8⁺ *in situ*. Le fruit de ce travail a fait l'objet d'un article transdisciplinaire publié dans Scientific Reports, démontrant l'intérêt de la sonde 19K-6H pour le tracking de cellules immunitaires dans le foie de souris. Brièvement, l'intérêt de cette sonde fluorescente réside en : (i) son émission dans le rouge lointain, permettant de s'affranchir de l'autofluorescence tissulaire (particulièrement intense au niveau du foie), (ii) sa haute biocompatibilité assurant l'intégrité des cellules primaires marquées, (iii) son internalisation par endocytose conduisant à un marquage brillant et stable au cours du temps, (iv) son excitation optimale permettant une analyse multimodale des cellules marquées, de la cytométrie en flux à la microscopie biphotonique pour l'analyse microscopique en profondeur. Ainsi, cette sonde présente de nombreux intérêts pour l'analyse de cellules primaires rares telles que les LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins.

Cet article sera présenté en son intégralité à la suite de cette brève introduction, et fera l'objet d'une discussion permettant de remettre ces travaux dans le contexte de mes recherches sur les $LT_{Reg5} CD8^+$.

Article

Article

Multiscale fluorescence-based tracking of immune cells in the liver with a highly biocompatible far-red emitting polymer probe.

Publié dans Scientific Reports le 16/10/2020,

Également disponible en ligne : <https://www.nature.com/articles/s41598-020-74621-9>



OPEN

Multiscale fluorescent tracking of immune cells in the liver with a highly biocompatible far-red emitting polymer probe

Malo Daniel¹, Laurence Dubreil², Romain Fleurisson², Jean-Paul Judor¹, Timothée Bresson³, Sophie Brouard¹, Arnaud Favier³, Marie-Thérèse Charreyre³ & Sophie Conchon^{1✉}

The development of innovative immune cell therapies relies on efficient cell tracking strategies. For this, multiscale fluorescence-based analyses of transferred cells into the host with complementary techniques, including flow cytometry for high-throughput cell analysis and two-photon microscopy for deep tissue imaging would be highly beneficial. Ideally, cells should be labelled with a single fluorescent probe combining all the properties required for these different techniques. Due to the intrinsic autofluorescence of most tissues and especially the liver, far-red emission is also an important asset. However, the development of far-red emitting probes suitable for two-photon microscopy and compatible with clearing methods to track labelled immune cells in thick samples, remains challenging. A newly-designed water-soluble far-red emitting polymer probe, 19K-6H, with a large Stokes shift, was thus evaluated for the tracking of primary immune CD8 T cells. These cells, prepared from mouse spleen, were efficiently labelled with the 19K-6H probe, which was internalized via endocytosis and was highly biocompatible at concentrations up to 20 μM . Labelled primary CD8 T cells were detectable in culture by both confocal and two-photon microscopy as well as flow cytometry, even after 3 days of active proliferation. Finally, 19K-6H-labelled primary CD8 T cells were injected to mice in a classical model of immune mediated hepatitis. The efficient tracking of the transferred cells in the liver by flow cytometry (on purified non-parenchymal cells) and by two-photon microscopy on 800 μm thick cleared sections, demonstrated the versatility of the 19K-6H probe.

Immune cell-based therapy is today considered as a major avenue for the regulation of immune responses in pathological situations such as cancer¹ or transplantation^{2,3}. In this context, the development of *in vivo* tracking of primary immune cells in animal model is of paramount importance to better understand the migration and behaviour of implanted cells in the host⁴. The main challenge in this field is to efficiently discriminate transferred cells from host tissue thanks to multiscale techniques including microscopy and flow cytometry. Therefore, optical strategies based on fluorescence detection have been developed, ranging from genetic engineering to exogenous labelling⁵. For this later purpose, various fluorescent probes have been designed for the labelling of immune cells prior to their engraftment⁶. Their most important properties should be: biocompatibility, as primary cells are fragile and difficult to maintain in an unaltered state prior to transfer; brightness and stability of the fluorescent signal, to ensure an efficient visualisation of the labelled cells over time. The range of absorption and emission wavelengths of the fluorescent probe is also critical considering the possible autofluorescence of the imaged tissue and the type of microscopy implemented for the tracking⁷. Fluorescence microscopy observations are often complicated by tissue autofluorescence, which mainly occurs in the UV and visible ranges, making far-red (650–750 nm) and near-infrared (750–950 nm) emission wavelengths highly attractive^{8–10}. Moreover, when deep-tissue imaging of the transferred cells is desired, it is relevant to switch from one- to two-photon (2P) excited fluorescence (TPEF) microscopy^{11,12}.

¹Université de Nantes, INSERM, UMR1064, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, ITUN, 44000 Nantes, France. ²PAnTher, INRAE, École nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), Université Bretagne Loire (UBL), 44307 Nantes, France. ³Laboratoire Ingénierie des Polymères (IMP), CNRS UMR5223, Université Lyon1, Université de Lyon, Lyon, France. ✉email: sophie.conchon@univ-nantes.fr

TPEF-microscopy enables deep tissue imaging, as the near-infrared excitation by a pulsed laser induces less absorption and scattering in biological samples compared to the continuous visible light used in widefield and confocal microscopy¹³. The 2P-excitation wavelength being almost twice the one-photon excitation value, it is very easy to efficiently separate the emitted fluorescence signal from the excitation light with appropriate filters. Another advantage of TPEF-microscopy is the low out-of-focus phototoxicity thanks to a highly localized excitation volume ($\sim 0.1 \mu\text{m}^3$) at the focal point of the laser and thus the high compatibility with *in vivo* biological analysis^{14,15}. In addition, no parasite fluorescence signal is generated below and above the focal plane. In order to further increase imaging penetration depth, several clearing protocols have been developed¹⁶. Most of them are based on tissue refractive index homogenization, and the resulting high tissue transparency drastically reduces light scattering in biological samples. Clearing protocol coupled with TPEF-microscopy enables an imaging depth of up to 4 mm in most tissues which is highly attractive to study tissue complexity and to image rare events.

One remaining challenge is to reconcile far-red fluorescence emission with a high 2P-absorption for bio-imaging. Indeed, most of the common far-red emitting fluorophores are efficiently excited in the 600–700 nm wavelength range, thus implying an optimal 2P-absorption above 1200 nm which is currently out of the range of standard femto-second pulse laser used on TPEF-microscopes used in core facilities. Therefore, fluorescent probes exhibiting a large Stokes shift (with excitation around 500 nm and emission in the far-red range) as well as high 2P-absorption cross section values are highly desirable.

Far-red emitting nanoparticles¹⁷ have been synthesized in the last decade but with limited evidence of biocompatibility in primary cells or TPEF-microscopy applications. For instance, cell labelling with quantum dots (QDs), fluorescent inorganic semiconductor nanoparticles displaying unique optical features depending on their size, has recently emerged¹⁸. However, their cytotoxicity, mainly due to the liberation of free ions, is now well documented^{19,20}. A new generation of far-red emitting QDs has been recently described to efficiently label breast cancer cell line in culture without cytotoxicity²¹. Primary cell or *in vivo* imaging and TPEF-microscopy applications have not been reported yet. Organic semiconducting polymer nanoparticles or dots (Pdots) represent the main competitor of QDs with an expected low intrinsic cytotoxicity²². Far-red emitting Pdots have been used for *in vivo* tumor imaging in mouse brain by confocal microscopy²³ and very recently for multiphoton imaging of microvasculature in mice²⁴. However, Pdots have not been used so far to label primary cells and their biocompatibility remains to be thoroughly investigated. Harmonic nanoparticles have been already described as powerful tool for muscle stem cell tracking in tissue²⁵ but currently there is no flow cytometer capable to detect second harmonic generation. It is the reason why we have focused our interest on a different family of polymer probes offering a versatile alternative, compatible with both flow cytometry and various types of fluorescence microscopy investigations.

Such polymer probes are not nanoparticles but water-soluble polymer chains²⁶, bearing several far-red emitting fluorophores²⁷ exhibiting large Stokes shifts (around 180 nm) and high 2P-cross section values (around 440 GM in water for a similar fluorophore surrounded by a star-shaped polymer shell)²⁸ for an efficient 2P-absorption. They have a controlled chain structure (molecular weight, dispersity of the chains, number of fluorophores per chain, possible presence of an anchoring group like a lipid). Previous results demonstrated an efficient labelling of enveloped viruses²⁹, living cells and zebrafish embryos³⁰ with convenient TPEF-imaging and reported a low cytotoxicity on Jurkat and HeLa cell lines³⁰. However, up until now, these polymer probes have not been used to label primary cells.

In this article, we investigated the newly designed far-red emitting polymer probe 19K-6H for *in vivo* tracking of murine primary CD8 T lymphocytes (pCD8 T cells). This polymer probe bears an average of 6 fluorophores per chain and exhibits numerous carboxylate groups (up to 45 per chain) that contribute to its water-solubility. As opposed to previous probes of the same family, the chain is not terminated by a lipid group since preliminary tests showed that this structural characteristic was not necessary to get an efficient labelling of lymphocytes. The hydrodynamic diameter of this polymer probe that adopts a coil conformation in aqueous solution is estimated to be in the range of 5–8 nm³¹ (schematic representation in Fig. 1A, chemical structure in Figure S1). The absorption and fluorescence emission spectra of the polymer probe in water are provided in Figure S2.

We first thoroughly characterized the optical properties, the biocompatibility and the internalization route of the 19K-6H probe in primary CD8 T cells. Then, we carried out evaluation of the 19K-6H probe for tracking the labelled primary CD8 T cells in a mouse model of immune cell infiltration in the liver parenchyma, by confocal and TPEF-microscopy as well as by flow cytometry.

Material and methods

19K-6H polymer probe synthesis. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich at the highest purity available and used without further purification. Solvents were used as received, either from Fisher Scientific or Acros Organic. Poly(*N*-acryloylmorpholine-*co*-*N*-acryloxysuccinimide), P(NAM-*co*-NAS), copolymer chains (number average molecular weight = 19,400 g mol⁻¹, dispersity = 1.07) have been synthesized from a *tert*-butyl dithiobenzoate RAFT agent according to a previously reported process³². The organic fluorophore (isophorone derivative) has already been described²⁷.

The synthesis of the 19K-6H polymer probe was performed as follows: 25.1 mg of P(NAM-*co*-NAS) copolymer were dissolved in 1 mL of chloroform in a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer. Fluorophore (3.7 mg, dissolved in 0.5 mL of chloroform) was added together with 2 molar equivalents of triethylamine (0.98 mg). Polymer concentration was adjusted to 10 mg mL⁻¹ with chloroform. The reaction was carried out at 30 °C in the dark under stirring for 2 h. The binding yield was followed by size exclusion chromatography (SEC) with a UV-Visible detector according to a previously described method³³ and reached 75% (corresponding to an average of 6 fluorophores per polymer chain). In order to eliminate the residual fluorophores, the mixture was precipitated in a large volume of diethyl ether and the fluorescent polymer was recovered as a powder by

centrifugation (10,000 t min⁻¹, 10 min, 4 °C). The procedure was repeated until full discoloration of the supernatant. The fluorescent polymer was finally dried under vacuum.

Hydrolysis of the residual succinimide ester units along the polymer chain was carried out using 50 mL of borate buffer (50 mM, pH = 9.3) directly added to 25 mg of the fluorescent polymer, and let at room temperature under stirring for 48 h. Then, the fluorescent polymer was purified by dialysis (SPECTRUM LABS, Spectra/Por 6, MWCO: 2000 g mol⁻¹) against deionized water (2 baths) and milliQ water (1 bath). The dark-red-colored fluorescent polymer was dried by lyophilization. After this hydrolysis step, the polymer probe exhibits numerous carboxylate groups (-COO⁻) along the polymer chain: a maximum of 45 per chain (depending on the pH and on the distribution of these groups). Consequently, the molecular weight of the polymer chain (under the -COONa form) decreased to 17,500 g mol⁻¹.

Characterization of the 19K-6H polymer probe. Size exclusion chromatography (with a UV-Visible detector), absorption and fluorescence emission spectra were recorded as previously described²⁶. The molar extinction coefficient (ϵ) of the polymer probe and its fluorescence quantum yield (ϕ) in water were determined, following a previously described protocol³³, from the absorption and emission spectra, respectively ($\epsilon = 43,400 \pm 700 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ at $\lambda_{\text{abs max}} = 504 \text{ nm}$; $\phi = 0.064$ at $\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$). Reference was erythrosin B in methanol ($\phi = 0.09$ at $\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$). Therefore, the brightness ($\epsilon \cdot \phi$) of the polymer probe in water was calculated to be $2800 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$.

Mice. Male C57Bl/6 mice were purchased from JANVIER LABS (France), used between 7 and 12 weeks of age and housed at the UTE IRS-UN (Nantes-France) animal facilities. Mice were fed ad libitum and allowed continuous access to tap water. All procedures were approved by the regional ethical committee for animal care and use and by the French Ministry of Research (agreement APAFIS #13742). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

Tissue and cell preparations. Livers were PFA-fixed for 48 h or included in OCT Compound (TISSUE-TEK) and frozen in liquid nitrogen (-196 °C)-cooled isopentane after in vivo elimination of blood by perfusion of HBSS 1× buffer (GIBCO). For confocal imaging, frozen liver samples were acetone-fixed and cryo-sectioned at 15 μm then analysed on the laser confocal scanning microscope LSM780 ZEISS (CARL ZEISS MICROSCOPY, Jena, Germany). For multiphoton imaging, PFA-fixed liver samples were sectioned with a scalpel to get 0.8–1 mm thick sections then cleared by using CUBIC protocol and analysed on the AIR-MP NIKON multiphoton microscope (technical parameters below).

Liver non-parenchymal cells (NPC) were isolated as previously described³⁴. Briefly, after perfusion with HBSS 1× buffer (GIBCO), livers were digested with collagenase IV (SIGMA-ALDRICH—C5138) and NPC enriched by Percoll (GE HEALTHCARE—17-0891-01) density gradient centrifugation and red blood cells lysis.

pCD8 T cells used in biocompatibility, labelling study and adoptive transfer experiments were isolated from C57Bl/6 mice spleen after red blood lysis (ACK buffer: NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM EDTA 0.1 mM) and negatively sorted with MILTENYI CD8a⁺ T cell isolation kit (130-104-075).

CUBIC clearing. Clearing of 800 μm PFA-fixed sections were performed with the CUBIC Protocol I for Adult Mouse Organ Samples and Marmoset Brain described by Tainaka et al.³⁵. PFA-fixed livers were washed with gentle shaking in PBS for 15 h at room temperature then incubated in CUBIC-L (TCI - T3740) for 4 days with gentle shaking at 37 °C. After another PBS wash, organ sections were incubated with 1:1 water-diluted CUBIC-R+ (TCI - T3741) with gentle shaking for 1 day at room temperature then in CUBIC-R+ for one more day in the same conditions.

In vitro biocompatibility assay. pCD8 cells were cultured during 5 days (from Day 0 to Day 4) in RPMI medium (GIBCO—31870074) supplemented with 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamine, 10 mM Hepes (GIBCO—15630056), 1 mM Sodium Pyruvate (GIBCO—11360039), 1× Non-Essential Aminoacids (GIBCO—11140035) and 50 μM 2-mercaptoethanol (SIGMA-ALDRICH—M6250). From Day 0 to Day 1, pCD8 T cells were incubated with increasing concentrations of 19K-6H probe (0; 0.5; 5; 20 μM). On Day 1, cells were washed and resuspended in complete RPMI medium, with IL-2 (CELLGENIX 10 U mL⁻¹) and T activator CD3/CD28 Dynabeads (GIBCO—ratio cell/bead 1:1) to induce their proliferation. Cells were analysed on LSR II flow cytometer (BECTON DICKINSON). Viability and proliferation were monitored with the LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (INVITROGEN) and 123 count eBeads Counting Beads (INVITROGEN), respectively. The cell activation state was analysed by flow cytometry with antibodies directed towards early activation marker CD69 (FITC—BD 553236), and late activation markers CD44 (APC—BD 559250) and CD25 (PE—BD 553866).

Characterization of 19K-6H labelling on primary immune cells. pCD8 T cells were prepared as described above. From Day 1 to Day 4, cells were plated in chambered coverslips (IBIDI μ -Slide 18 well—81826—15,000 cells/well) coated with Poly-L-Lysine (SIGMA-ALDRICH—P4707) then imaged on the laser confocal scanning microscope LSM780 ZEISS (CARL ZEISS MICROSCOPY, Jena, Germany) at 63× magnification. Transmission light was used to localize the cells and laser line 561 nm to analyse the 19K-6H fluorescence. Spectral detection was performed with ZEISS 32 Channel GaAsP spectral detectors and images analysed with FIJI image analyse software. A minimum of 100 cells were imaged for each condition.

Internalization pathway investigation. HeLa cells (ATCC CCL-2) were cultured in DMEM medium (GIBCO—11960085) supplemented with 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin and 1% Glutamine. The cells (50% of confluency) were transfected with 100 ng of Rab5a-mCherry³⁶ or Rab7-GFP³⁷ plasmids, preincubated with 0.5 μ L Lipofectamine (INVITROGEN—15338100), during 24 h at 37 °C in complete DMEM as described above (without Penicillin/streptomycin). Cells were then washed and plated in chambered coverslips (IBIDI μ -Slide 18 well—81826—3000 cells/well) and allowed to adhere overnight. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (THERMOFISHER—H1399) diluted at 1:2000 in complete DMEM medium during 10 min at 37 °C. Medium was carefully replaced with complete DMEM containing 10 μ M of 19K-6H probe right before imaging. Confocal imaging was performed with the laser confocal scanning microscope LSM780 ZEISS (CARL ZEISS MICROSCOPY, Jena, Germany) at 63 \times magnification. 405 nm, 488 nm and 561 nm laser lines was used to excite Hoechst 33342, GFP, mCherry and 19K-6H probe, respectively. Spectral detection was performed with ZEISS 32 Channel GaAsP spectral detectors and images analysed with FIJI image analyse software.

Inhibition of endocytosis was performed by pre-incubating HeLa cells or pCD8 T cells at 4 °C or in presence of 80 μ M Dynasore³⁸ (SIGMA-ALDRICH—D7693) or DMSO (Dynasore-vehicle—SIGMA-ALDRICH—276855) for 1 h. Cells were then incubated 8 h with 19K-6H probe, at 4 °C or in presence of 80 μ M Dynasore or DMSO. 19K-6H internalization was assessed by flow cytometry.

pCD8 T cell adoptive transfer. pCD8 T cell isolated from C57Bl/6 mice were incubated overnight in complete RPMI medium, with IL-2 (CELLGENIX 10 U mL⁻¹) and activator antibodies : 1 μ g mL⁻¹ anti-CD3 (BD 553057—*coated*) and 1 μ g mL⁻¹ anti-CD28 (BD 553294), with or without 20 μ M of 19K-6H probe (1.5 \times 10⁷ cells and 0.5 \times 10⁷ cells respectively). The next day, cells are washed in PBS 1 \times then injected *i.v.* in 2 C57Bl/6 mice for systemic delivery. Recipient mice are then injected *i.v.* with 15 mg kg⁻¹ Concanavalin A (SIGMA-ALDRICH—C2010) to induce a T cell-mediated acute liver hepatitis³⁹. Mice were then sacrificed and livers and NPC were prepared as described above. Tissues were analysed by both confocal and TPEF-microscopy as described above. Cells were analysed on LSR II flow cytometer (BECTON DICKINSON) with antibodies directed towards CD3 (V450—BD 560801), CD8 (APC—BD 553035) and CD69 (FITC—BD 553236) markers. 19K-6H fluorescence was detected in the Pe-Cy5.5 channel (λ_{ex} 561 nm, λ_{em} 710/50 nm).

Confocal microscopy. The inverted laser scanning microscope LSM780 ZEISS (CARL ZEISS MICROSCOPY, Jena, Germany) was equipped with solid state lasers 405, 561 and 633 nm and argon laser 455, 488, 514 nm and ZEISS 32 Channel GaAsP spectral detectors. Spectral sequences of 32 images were obtained using 8 nm band pass filters in the 405–700 nm range. Linear unmixing process of data obtained from spectral imaging was performed for matching the spectral variations in the lambda stack of the cells labelled with the 19K-6H probe and autofluorescence spectra recorded from control specimen (unstained cells and non-injected liver). The objectives used were Immersion 63X objective lens (NA 1.4 Oil DIC Plan-Apochromat) and 20 \times objective lens (NA 0.8 Plan-Apochromat).

Two-photon imaging. The A1R-MP NIKON microscope was equipped with an Insight Deepsee laser from SPECTRA-PHYSICS, tunable in the 680–1300 nm range, <120 fs pulse width with a dual output at 1040 nm for simultaneous two-photon imaging. The system was equipped with three high sensitive channels GaAsP Non Descanned Detectors (NDD) and one supplementary channel PMT NDD. Auto laser alignment was performed when changing multiphoton excitation wavelength. The configuration of the filters attached to NDD were (1) band-width 400–492 nm, (2) band-width (500–550 nm), (3) band-width (563–588 nm), (4) band-width (601–657 nm). The immersion objective used was an apochromat 25 \times MP1300 objective lens (NA 1.10, WD 2.0 mm).

Results

Fluorescence imaging of murine primary CD8 T cells labelled with 19K-6H probe. The synthesis and characterization of the 19K-6H polymer probe (Fig. 1A) are presented in the “Material and methods” section. The labelling of murine primary CD8⁺ T lymphocytes (pCD8 T cells) isolated from C57Bl/6 mice spleen with the 19K-6H probe was first assessed by fluorescence imaging. Freshly isolated pCD8 T cells were incubated overnight (15 h) with 20 μ M of the 19K-6H polymer probe and imaged by confocal spectral microscopy. Four different excitation wavelengths (405, 488, 561, 633 nm) were tested to identify the best excitation/emission wavelengths for the visualisation of the probe (Fig. 1B). Emission spectra were recorded for the 488 nm and 561 nm excitation wavelengths and showed emission peaks at 650 nm and 660 nm, respectively (Fig. 1C). Spectral acquisitions for the 561 nm excitation wavelength that provided the highest fluorescence signal (Fig. 1B) confirmed a maximal emission around 650 nm (Figure S3), and this excitation was chosen for further confocal microscopy analyses. Morphologically, the 19K-6H signal appears intracytoplasmic and displays a specific sub-cellular localisation profile, with spots of high fluorescence intensity (diameter: 0.86 μ m \pm 0.55), suggesting an accumulation in vesicles. TPEF-microscopy on labelled primary CD8 T cells was performed after an overnight incubation with 20 μ M of 19K-6H probe then nuclear counterstained. The 1040 nm excitation wavelength gave the best signal-to-noise ratio (data not shown) and resulted in strong fluorescence signal in the red/NIR channel around the nucleus of the 19K-6H labelled cells (Fig. 1C) with an absence of signal in the negative control (pCD8 T cells without 19K-6H probe, Fig. 1D).

Stability of 19K-6H labelling in primary immune cells. The stability of the primary cell labelling with the 19K-6H probe was assessed in conditions of cell proliferation. pCD8 T cells isolated from splenocytes of C57Bl/6 mice were incubated for 15 h with increasing concentrations of 19K-6H probe (0 to 20 μ M). Cells were

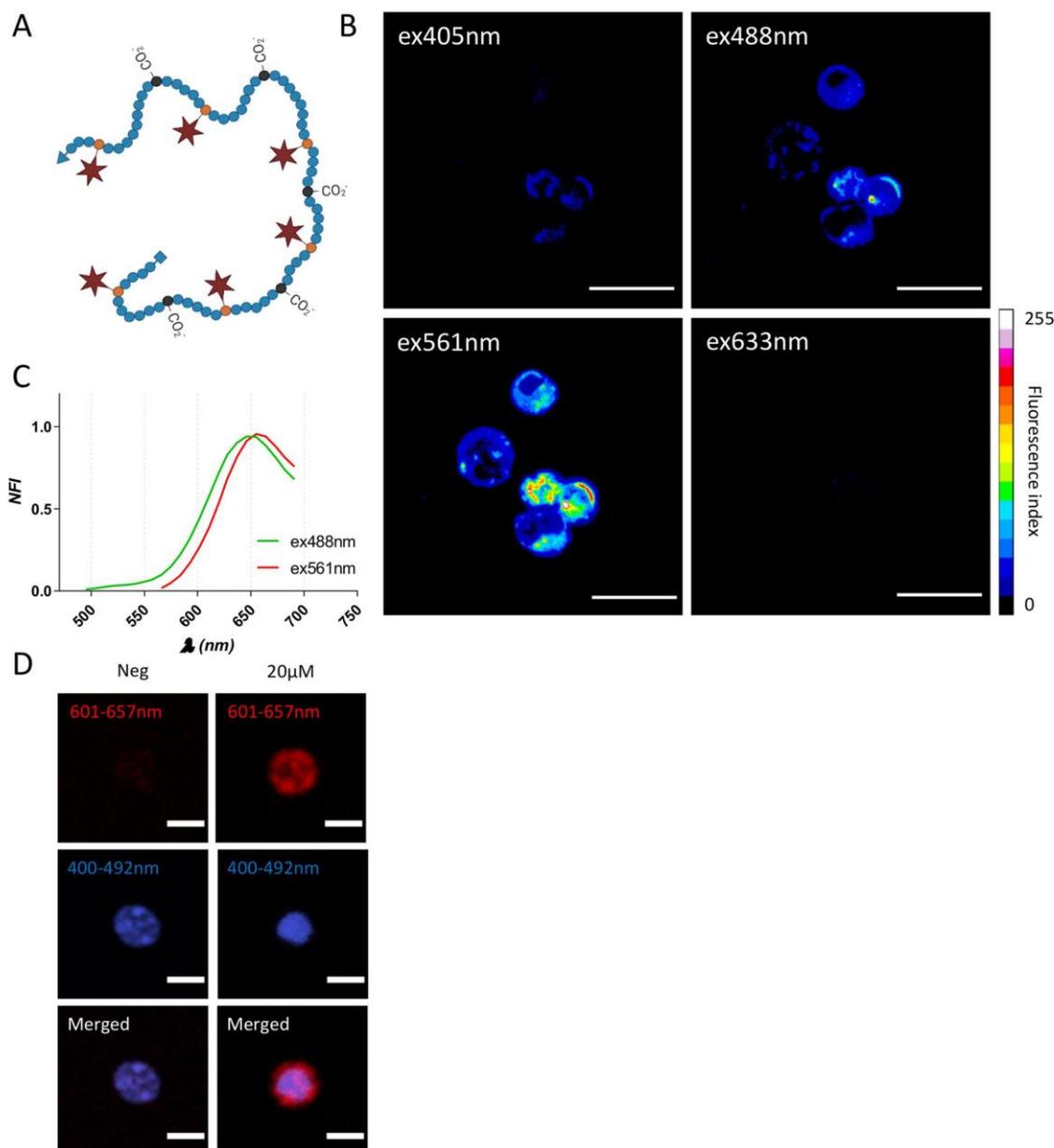


Figure 1. (A) Schematic representation of the 19K-6H polymer probe. (B) Confocal spectral imaging (objective $\times 63$) of living pCD8 T cells labelled with 19K-6H probe ($20 \mu\text{M}$, 15-h incubation) from excitation at 405 nm, 488 nm, 561 nm and 633 nm. Each image is a representation of maximum intensity projection obtained between 566 and 700 nm. Grey levels (8bits) were color-coded with the 16 colors look-up-table (LUT) from FIJI. Scale bar: $10 \mu\text{m}$. (C) Emission spectra of 19K-6H in cellulo, from 488 and 561 nm excitation, determined with spectral imaging (fluorescence intensity collected every 8.9 nm between 566 and 700 nm). (D) TPEF-imaging (objective $\times 25$) of living pCD8 T cells counterstained with Hoechst nuclear probe, labelled with 19K-6H probe ($20 \mu\text{M}$, 15-h incubation) (top panel) compared to negative control (bottom panel, only Hoechst nuclear probe). Dual sequential excitation at 900 nm and 1040 nm for respective observation of nuclear Hoechst staining (blue channel, 400–492 nm) and internalized 19K-6H probe (red channel, 601–657 nm). Fluorescent images (visualized in blue and red, false colors) are presented separately on left and middle panel and merged on right panel. Scale bar: $5 \mu\text{m}$.

then washed and cultured for 4 days (from Day 1 to Day 4) in the presence of stimulatory signals (anti-CD3/anti-CD28 agonists and Interleukin-2 (IL-2)) to induce their activation and proliferation (Fig. 2A). The 19K-6H labelling was assessed by confocal spectral microscopy at 561 nm excitation from Day 1 (before activation) to Day 4, then analysed with the FIJI software. First, after a 15-h incubation at the highest probe concentrations (20 and 5 μM), 95% of cells were labelled, whereas only 30% were labelled for the 0.5 μM concentration (*data not shown*). The intracellular fluorescence increased proportionally from 0.5 to 5 μM (MFI from 33.61 ± 2.81 to 306.5 ± 41.39), and reached a maximum for the 20 μM condition (MFI: 503 ± 57.89) (Fig. 2B). From Day 1 to Day 4, in the presence of anti-CD3/anti-CD28 agonists and IL-2, a progressive decrease of the 19K-6H-labelled pCD8 T cell fluorescence was observed, concurrently with their proliferation (Fig. 2C, Figure S4). On Day 4, while pCD8 T cells had divided at least twice, those labelled with 5 μM and 20 μM of 19K-6H probe were still detectable (MFI: 73.80 ± 10.21 and 84.4 ± 11.94 respectively). These results were confirmed by flow cytometry experiments (Figure S5). Spectral microscopy analysis of the fluorescence within cells demonstrated the very stable emission profile of the 19K-6H probe, with identical emission spectrum over time (Fig. 2D). These results showed that the 19K-6H probe, used at 5 μM to 20 μM concentrations, optimally labelled pCD8 T cells and enable detection even after 3 days of active proliferation. Moreover, no events indicative of a potential cytotoxicity (e.g. plasma membrane blebbing, cell shrinkage) were observed, even at the highest 19K-6H concentration tested (20 μM).

19K-6H polymer probe biocompatibility. Following the same experimental protocol (Fig. 2A), the innocuity of the 19K-6H polymer probe was further investigated on the cellular biology of pCD8 T cells isolated from the spleen of C57Bl/6. The proliferation, viability and expression of activation markers were assessed by flow cytometry from Day 0 (before adding 19K-6H) to Day 4. The 19K-6H polymer probe did not induce either short-term or long-term cell mortality. More than 70% of the cells remained alive 15 h post-incubation (Day 1) with 19K-6H probe, even at the highest 20 μM concentration, similarly to what was measured for the primary cells incubated without the probe (Fig. 3A).

In addition, the 19K-6H probe did not alter pCD8 T cells proliferation in response to the mitogenic signals. After 4 days of culture, the viability and proliferation of pCD8 T cells shared the same trend, independently of the 19K-6H concentration, with approximately 8×10^5 cells and 60% of cell viability (no statistical differences).

Potential effect of 19K-6H probe on cell activation was studied before and after adding mitogenic signals (i.e. anti-CD3/anti-CD28 agonists and IL-2) in the culture medium. Expression of CD69, an early and transient activation marker, and of CD44 and CD25, late activation markers, were analysed at different time points by flow cytometry (Fig. 3B, and detailed histograms in Figure S6). After a 15-h incubation with the 19K-6H probe from 0 to 20 μM , there was no significant difference in the expression of activation markers by pCD8 T cells. In line with what was previously observed by confocal microscopy for cell viability and proliferation, the 19K-6H probe did not alter the activation of pCD8 T cells in response to mitogenic factors. For each tested concentration, the expression of CD69 marker in pCD8 T cells reached a peak of 80% by Day 2 and then progressively decreased to the basal level by Day 4. CD44 and CD25 were expressed respectively by 95% and 80% of cells by Day 4, comparable to what was measured for cells incubated without the probe.

Altogether, these results demonstrated that a 15-h incubation of pCD8 T cells with the 19K-6H probe did not induce short- or long-term cytotoxicity or cell activation, even at 20 μM . In addition, the 19K-6H probe did not disrupt nor alter the activation and proliferation abilities of the pCD8 T cells in response to mitogenic signals for 3 days.

19K-6H polymer probe internalization pathway. 19K-6H-labeled pCD8 T cells displayed a heterogeneous subcellular distribution with vesicular spots of high fluorescence intensity, which suggested an internalization process via endocytosis. In order to investigate this possibility, we used a previously described model of transfected cells specifically expressing fluorescent proteins in the endosomal compartment^{36,37}. HeLa cells were transfected with plasmids coding for early (Rab5a) or late (Rab7) endosomal markers fused with mCherry or GFP fluorescent proteins, respectively. 19K-6H probe was added 24 h after transfection and time-lapse acquisition was performed using spectral confocal microscopy. As shown in Fig. 4A, more than 95% of intracellular 19K-6H probe was found within Rab5a-mCherry positive early endosomes in the very first minutes after addition to the culture medium. After 2 h of incubation, the 19K-6H probe colocalized strongly with Rab7-GFP labelled late endosomes (Fig. 4B). Finally, even after a 24-h incubation, no 19K-6H fluorescence signal was detected in the nucleus of the HeLa cells (Fig. 4C). In a control experiment, endocytosis was then blocked either by incubating the cells at 4 °C or by adding Dynasore that inhibits dynamin, a key protein for several pathways of endocytosis, including clathrin-mediated endocytosis and other dynamin-dependent mechanisms³⁸. 19K-6H internalization was reduced by 90% and 40% respectively, confirming that the probe is mainly internalized by endocytosis (Fig. 4D). The same experiment performed on pCD8 T cells gave similar results (Figure S7).

Adoptive transfer of 19K-6H labelled pCD8 T cells in a mouse model of immune-mediated hepatitis. In order to demonstrate the interest of 19K-6H labelling for in vivo tracking of primary immune cells following their adoptive transfer, we used a classical mouse model of T cell-induced liver injury, in response to Concanavalin A (ConA) injection³⁹. pCD8 T cells were prepared from donor mice, and incubated overnight with or without the 19K-6H probe (20 μM). 0.5 to 1.5×10^7 pCD8 T cells (control or 19K-6H labelled) were injected intravenously to recipient mice, followed 1 h later by a single injection of ConA, or PBS (Fig. 5A). Mice were sacrificed 3 h later, and liver non-parenchymal cells (NPC) which include infiltrating leukocytes, were prepared and analysed by flow cytometry. Fragments of liver were also frozen and PFA-fixed for further confocal and TPEF-microscopy imaging, respectively. As expected, the ConA injection induced an enhanced recruitment

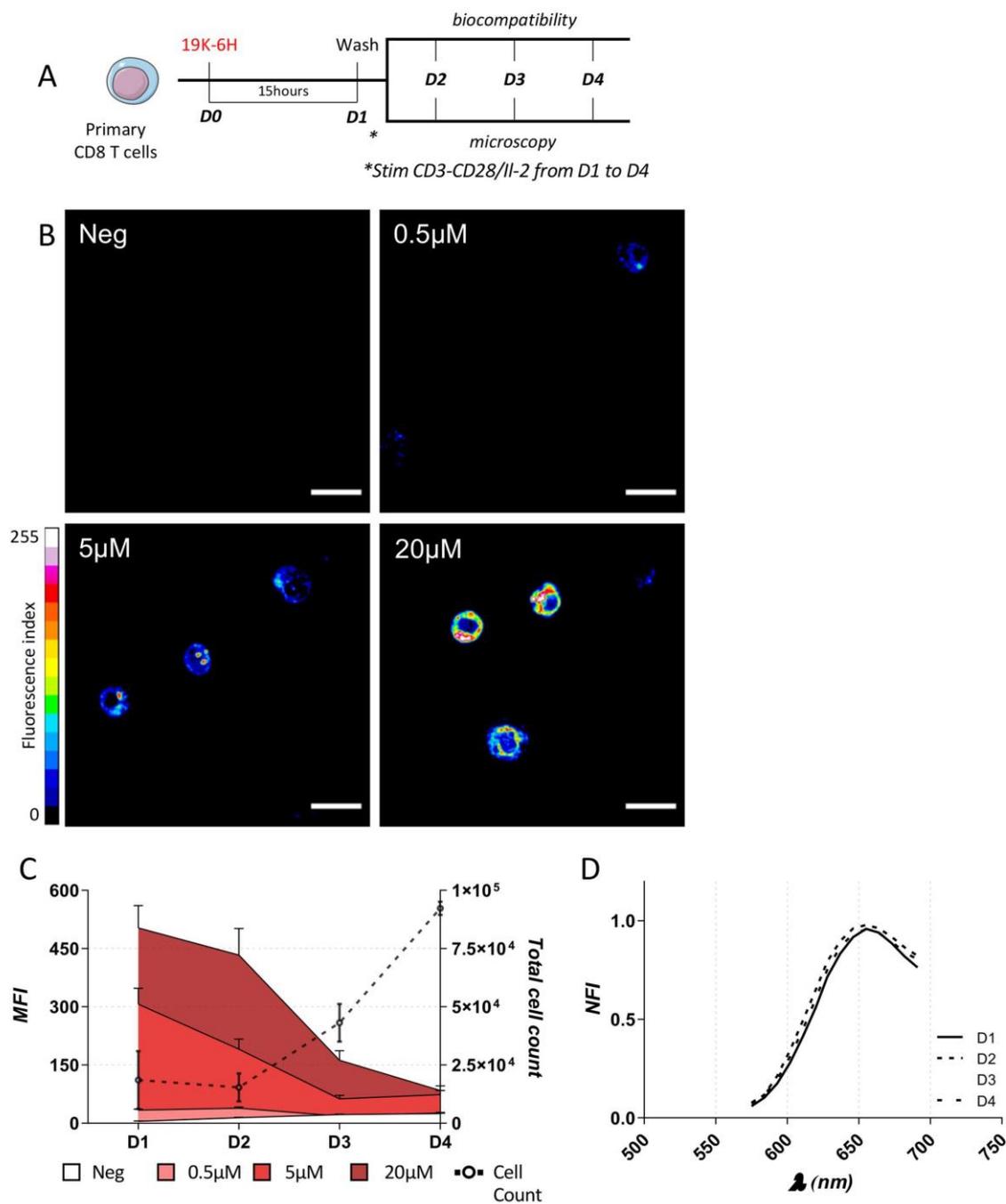


Figure 2. (A) pCD8 T cells are incubated overnight with 19K-6H probe then washed and resuspended in complete medium with stimulating signal. 19K-6H labelling and biocompatibility are analysed by confocal microscopy and flow cytometry respectively, from day 1 (D1) to day 4 (D4) post-incubation. (B) Fluorescence confocal microscopy images (objective $\times 63$) of pCD8 T cells (λ_{ex} 561 nm), after 15 h (D1) incubation with increasing concentrations of 19K-6H probe (0 μ M, 0.5 μ M, 5 μ M, 20 μ M). Grey levels (8bits) were color-coded with the 16 colors look-up-table (LUT) from FIJI. Scale bar: 10 μ m. (C) Evolution of 19K-6H labelling on proliferating pCD8 T cells from day 1 (D1) to day 4 (D4) after 15 h incubation of the 19K-6H probe at different concentrations. Mean Fluorescence intensity was measured on 100 to 1000 cells by condition. (D) Emission spectra of 19K-6H in cellulo on proliferating pCD8 T cells, D1, D2, D3 and D4 after cells labelling. MFI: mean fluorescence intensity; NFI: normalized fluorescence intensity.

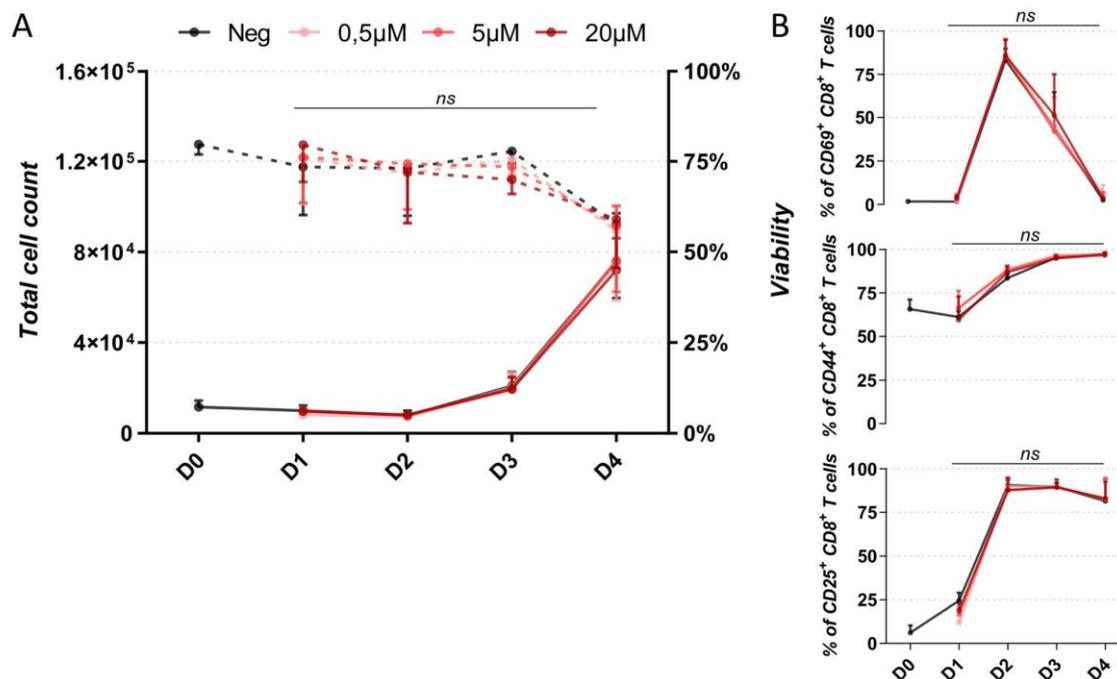


Figure 3. (A) Evolution of proliferation and viability of pCD8 T cells after 15 h incubation with increasing concentrations (0.5, 5, 20 μM) of 19K-6H probe compared to negative control (w/o 19K-6H). Full line: total cell count (left Y axis); dotted line: percentage of living cells (right Y axis). (B) Evolution of the expression of CD69, CD44 and CD25 activation markers. $n = 3$. The error bars indicate the standard deviation calculated for the averages from the three experiments. Significance is calculated by Two-Way Anova test; ns: non-significant.

of CD8 T cells to the liver, which are all in a CD69⁺ activated state, as shown by flow cytometry analysis (Fig. 5B). In mice that received ConA after adoptive transfer of 19K-6H-labelled pCD8 T cells, 18% of total liver CD8 T cells were 19K-6H positive (Fig. 5C). Confocal spectral microscopy analysis was performed on 15 μm frozen liver sections; far-red emitting cells were detected only in the liver of mice that had received 19K-6H labelled pCD8 T cells, however in very limited numbers (Fig. 5D). In order to acquire a higher number of events, and thanks to the high 2P-absorption of the 19K-6H probe, we then performed TPEF-microscopy for deep imaging.

TPEF-microscopy was carried out on 800 μm PFA-fixed liver sections, in order to get a more representative investigation of the pCD8 T cell infiltration within the liver. The sections were first cleared following CUBIC protocol^{35,40} to increase transparency (Fig. 6A), allowing a deeper (up to 4 mm) and less noisy imaging. Since the 19K-6H probe was efficiently excited at 1040 nm and enabled TPEF-imaging of labelled pCD8 T cells in vitro (Fig. 1C), the same wavelength was used to localize 19K-6H-labelled pCD8 T cells in 800 μm cleared liver sections and the 900 nm excitation wavelength was used to image the tissue autofluorescence. The individual images acquired from these 2 independent excitations (900 nm and 1040 nm) and collected in 2 independent channels (green and red channel respectively), and the overlay are presented on Fig. 6B. No liver autofluorescence was detected in red channel at 1040 nm excitation wavelength. For the liver of mice injected with 19K-6H-labelled pCD8 T cells, the reconstructed 3D image displayed a significant number of far-red emitting events (with variable volume and brightness), contrary to what was observed with the liver of mice injected with unlabelled pCD8 T cells (Fig. 6B). Quantification was carried out to confirm these observations and to characterize the detected events in terms of number, volume and distribution over the 900 μm depth of the sections. A total volume of 0.186 mm^3 (500 * 500 * 800 μm) of the cleared liver of mice injected with labelled pCD8 T cells was probed by 8 independent and non-overlapping analyses (each of 0.0232 mm^3 —Fig. 7A), using the 3D measurement module included in NIS software (Fig. 7B).

A minimum event detection threshold of 2 μm^3 was chosen according to the average volume of intracytoplasmic labelling (2 to 50 μm^3 per cell) previously detected by confocal microscopy and to the mean volume of false-positive events detected in the control liver (0.20 $\mu\text{m}^3 \pm 0.29$). As a result, 148 far-red emitting events have been detected in the whole volume analysed of the positive liver, with a mean volume of 49 $\mu\text{m}^3 (\pm 134)$ with some objects reaching up to 1500 μm^3 , suggesting concentration of several labelled cells. Distribution analyses demonstrated a homogenous repartition of the events in the 8 liver volumes independently analysed (mean events per volume = 9 ± 3 , Fig. 7C) and also a homogenous repartition of the events in depth (Q1: 278.9 μm , median: 451.9 μm , Q3: 694.7 μm —Fig. 7D) thus eliminating a potential detection defect correlated to the imaging depth.

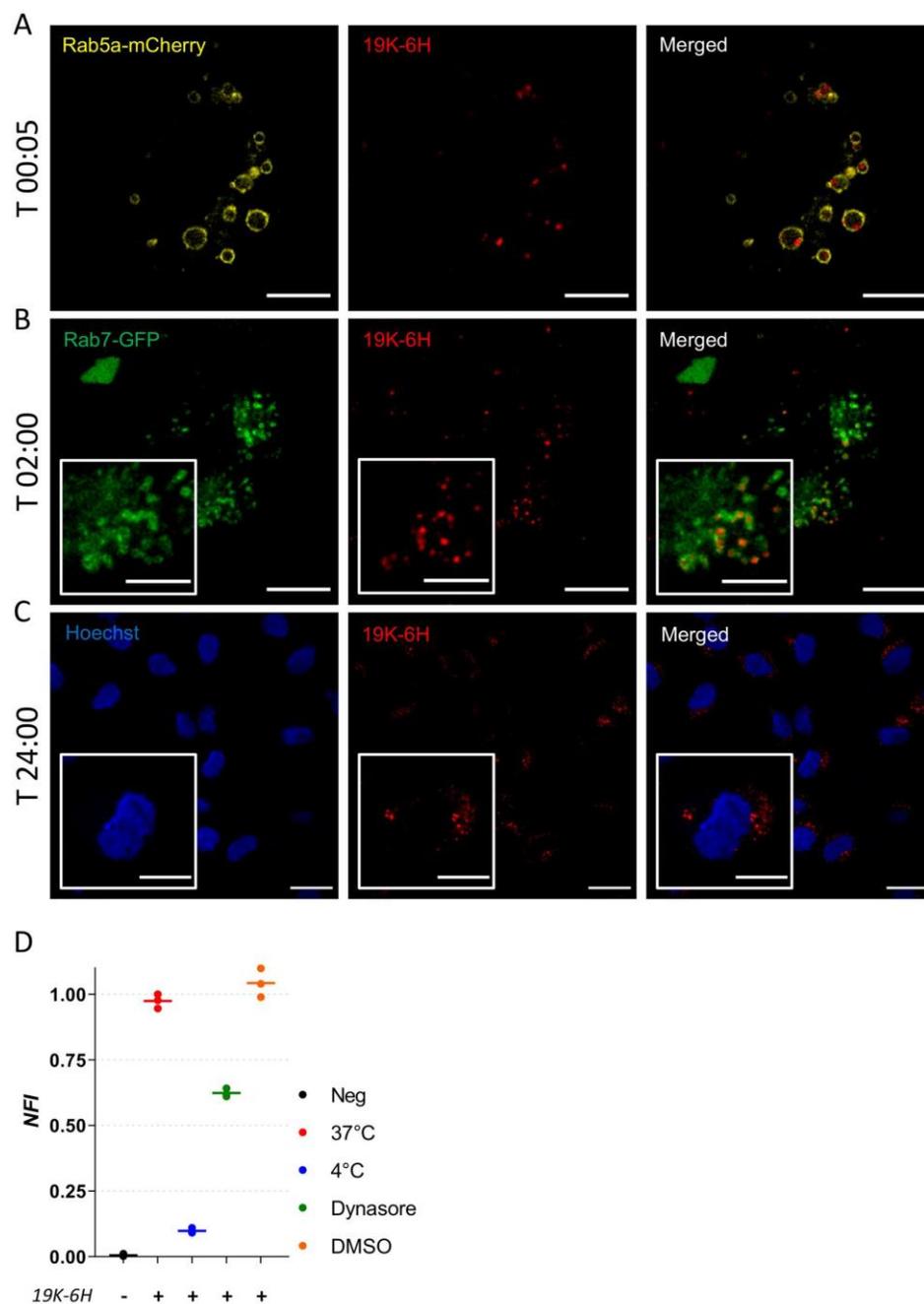


Figure 4. Confocal microscopy of living HeLa cells incubated with 19K-6H probe and transfected with plasmid coding for endosomal markers fused with fluorescent proteins (Rab7-GFP, Rab5a-mCherry) or labelled with nuclear counterstain (Hoechst) (objective $\times 63$). **(A)** HeLa cell transfected with Rab5a-mCherry plasmid, after 5 min incubation of 19K-6H probe (10 μ M). Excitation 561 nm. Representative of 3 experiments. Scale bar: 10 μ m. **(B)** HeLa cell transfected with Rab7-GFP plasmid, after 2 h incubation of 19K-6H probe (10 μ M). Dual sequential excitation 488 nm and 561 nm. Representative of 3 experiments. Scale bar: 10 μ m. ROI close up, scale bar: 5 μ m. **(C)** HeLa cells labelled with Hoechst 33342, after 24 h incubation of 19K-6H probe (10 μ M). Excitation 405 nm and 561 nm. Scale bar: 20 μ m. ROI close-up, scale bar: 10 μ m. Fluorescent images (visualized in blue, red, green and yellow: false colors) are presented separately on left and middle panel and merged on right panel. **(D)** HeLa cells are incubated 8 h with 19K-6H probe (10 μ M) at 37 $^{\circ}$ C or 4 $^{\circ}$ C or in presence of 80 μ M of Dynasore (37 $^{\circ}$ C) or DMSO (Dynasore Solvent—37 $^{\circ}$ C) in the culture medium. 19K-6H labelling is evaluated by FACS. NFI: normalized fluorescence intensity. n = 3. Bar: median values.

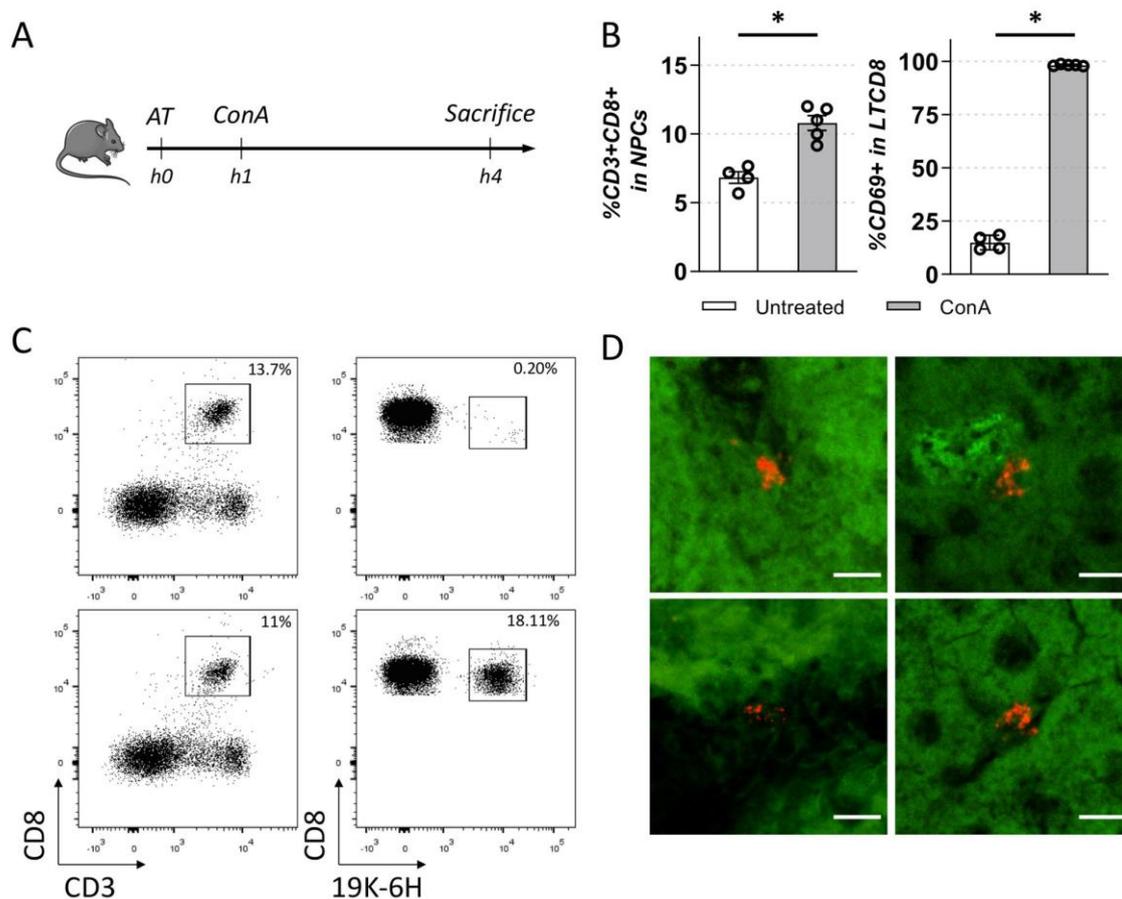


Figure 5. Adoptive transfer of pCD8 T cells (harvested the day before on C57Bl/6 mice, cultured O/N with activation signals) labelled or not with 19K-6H. (A) Mice are injected with 15 mg/kg Concanavalin A (*ConA*) or PBS 1 h after adoptive transfer (*AT*), then sacrificed 3 h later. Liver are collected for (B) FACS analysis (CD3, CD8, CD69) of the recruitment of CD8 T cells (left panel) and their activation state (right panel) after *ConA* injection (significance is calculated by Mann–Whitney test. * $p < 0.05$), (C) FACS analysis (CD3, CD8, 19K-6H) of *ConA* treated mice, top panels: ctrl pCD8 T cells injected, bottom panels: 19K-6H-labelled pCD8 T cells injected and (D) confocal spectral microscopy analysis (objective $\times 20$, scale bar 10 μm) on liver cryosections (thickness 15 μm) of 19K-6H-labeled pCD8 T cells/*ConA* injected mice. Excitation wavelengths were both 488 nm and 561 nm with 500–690 nm emission wavelength range (spectral imaging with 8.9 nm spectral band). Fluorescent images of 4 positives events are presented (false colors, green: liver background, red: 19K-6H positive events).

Discussion

The development and optimization of primary cell tracking in animal models is of major importance in the field of cell therapy in order to better assess the engraftment properties, behaviour and localization of the injected cells. For this purpose, non-invasive strategies consisting in the ex vivo labelling of the cells with fluorescent probes before their injection has been developed in the last decade, as an alternative to genetic modifications, for instance^{5,6}. The most important criteria for those probes are the biocompatibility (to preserve cell integrity and functionality, especially in the case of primary cells that are significantly more fragile than cell lines), the emitted fluorescence (intensity, stability, wavelengths, easy discrimination from tissue autofluorescence^{8–10}) and the versatility for implementing multiscale technical approaches like microscopy and flow cytometry. In this regard, the development of fluorescent probes suitable for both confocal and TPEF-microscopy is of particular interest for deep imaging^{11,12}. One of the challenging issues is to develop far-red emitting probes, highly discriminative from liver autofluorescence, exhibiting a large Stokes shift as well as high 2P-absorption and presenting biocompatibility properties at concentrations enabling a convenient imaging.

Water-soluble polymer probes bearing 2P-absorbing fluorophores emitting in the far-red range are excellent candidates. Previous results showed a low cytotoxicity on various cell lines³⁰, with an efficient labelling of enveloped viruses²⁹, living cells and zebrafish embryos enabling their visualization by TPEF-microscopy³⁰. In

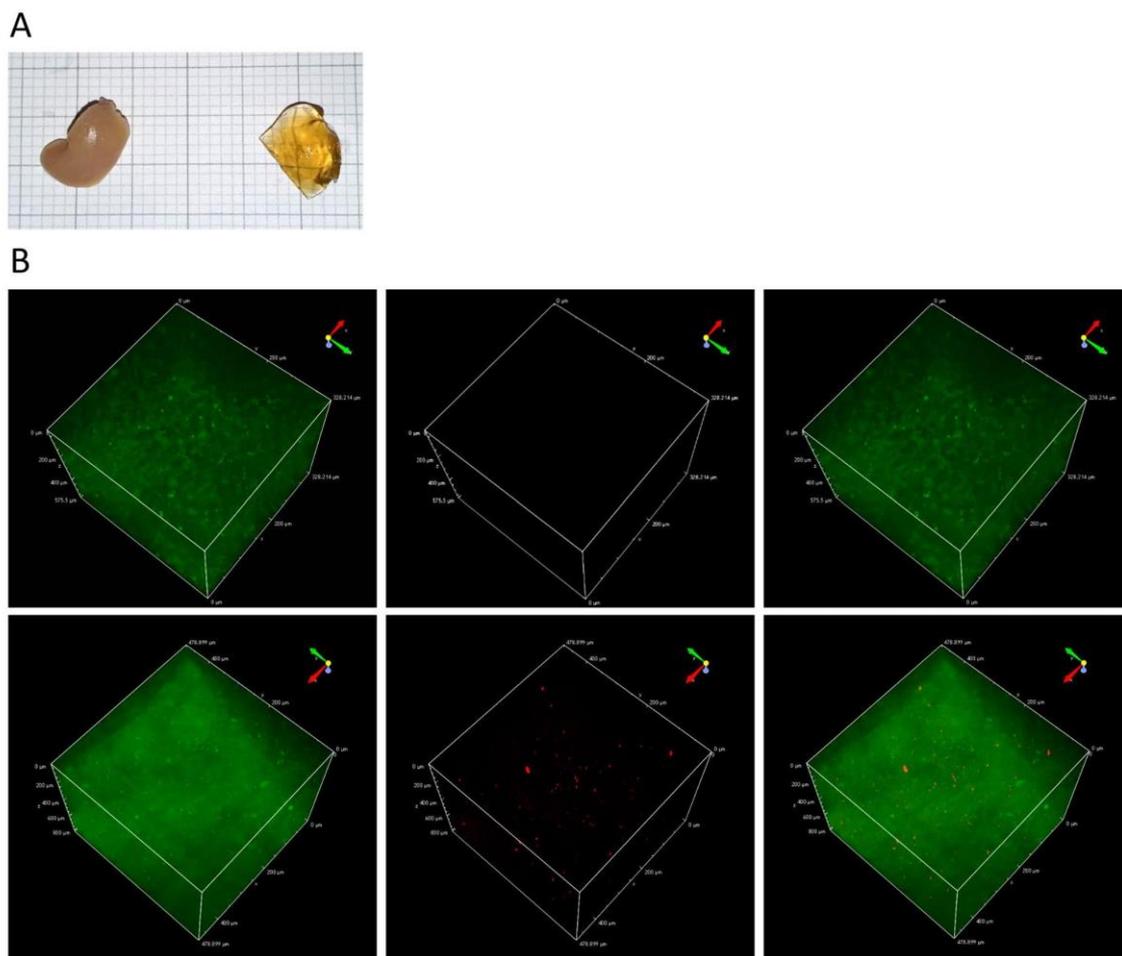


Figure 6. (A) Clearing of liver 800 μm sections thanks to CUBIC protocol. Left: before clearing; right: after clearing. (B) TPEF-microscopy analysis (objective $\times 25$) on cleared liver 800 μm sections of 19K-6H-labelled (bottom panel—x: 478.9 μm , y: 478.9 μm , z: 800 μm) or control (top panel—x: 328.14 μm , y: 328.14 μm , z: 575.5 μm) pCD8 T cells injected mice. Dual wavelength excitation. From λ_{ex} 900 nm, autofluorescence was collected in green channel (500–550 nm). From λ_{ex} 1040 nm, 19K-6H fluorescence was collected in far-red channel (601–657 nm). Fluorescent images (visualized in green and red, false colors) are presented separately on left and middle panel and merged on right panel.

this article, we investigated the benefits of the new 19K-6H far-red emitting polymer probe (Fig. 1A) for the tracking of primary immune CD8 T cells (pCD8 T cells) in a mouse model of liver infiltration through multi-scale approaches including both confocal and TPEF-microscopy as well as flow cytometry for high-throughput cell analysis.

First, we demonstrated that pCD8 T cells were efficiently labelled with 5 to 20 μM of 19K-6H after 15-h incubation, resulting in an intracytoplasmic staining with vesicular spots of high intensity. The labelling was easily detected by confocal microscopy with 488 and 561 nm laser excitation wavelengths, and emission peaks exhibiting a maximum at 650 and 660 nm, respectively, have been determined with the spectral module. This result confirms previous observations and the large Stokes shift associated with the far-red emitting fluorophore covalently bound on the 19K-6H probe²⁷. This large Stokes shift (around 180 nm, see Figure S2) enables minimization of the self-quenching effect and leads to an enhanced signal-to-noise ratio⁴¹. This represents a major advantage compared to most of the commercially available far-red emitting fluorophores; for instance: boron-dipyrromethene (BODIPY)^{42,43}, cyanine or rhodamine dyes^{44,45}, that display Stokes shifts limited to ~ 20 nm.

In addition, 19K-6H labelled-pCD8 T cells were optimally visualized under a 2P-excitation at 1040 nm, which is a very convenient wavelength in the range of standard femto-second pulse laser of common TPEF-microscopes. In a previous article³⁰, after labelling HeLa cell lines with a related polymer probe bearing the same fluorophore, we determined a maximum 2P-excitation wavelength at 920 nm. However, in that experiment, the

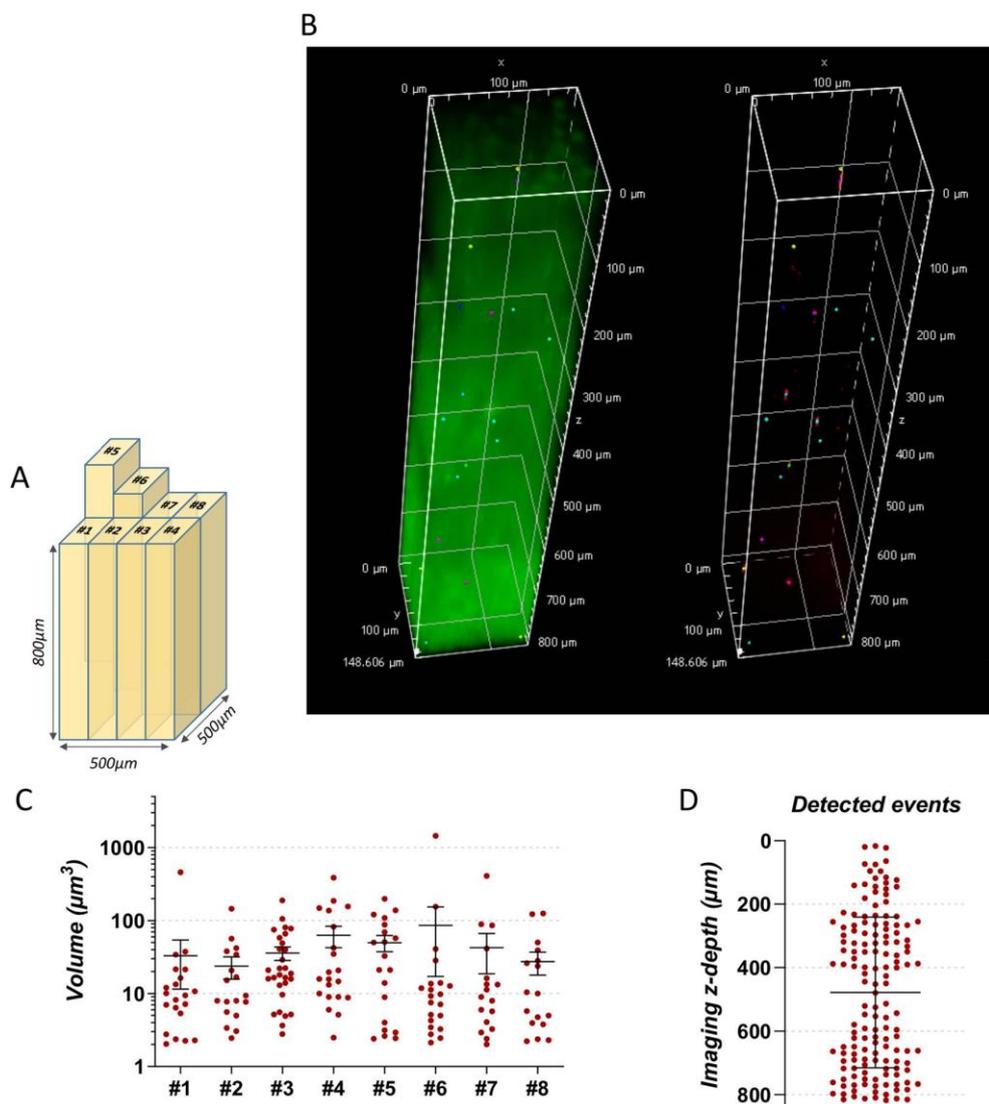


Figure 7. (A) 0.186 mm^3 ($\sim 500 \times 500 \times 800 \text{ }\mu\text{m}$) of the liver of mice injected with labelled pCD8 T cells was investigated through 8 independent and non-overlapping analyses (#1 to #8) of 0.0232 mm^3 with the (B) 3D measurement module included in NIS software. (C) Distribution of the far-red emitting events in the 8 independently analyzed liver volumes. Bars represent the mean and the standard-error calculated for each volume. (D) Distribution of the far-red emitting events in z-depth imaged in liver volume. Bars represent the mean and the standard-deviation.

2P-excitation spectrum could only be reconstructed up to 1000 nm due to the laser range limitation. Therefore, we may deduce that 1040 nm is the main maximum 2P-absorption wavelength of this polymer probe *in cellulose* and that 920 nm is a secondary maximum. It is worth mentioning that a 2P-absorption spectrum *in water* of an oligomer probe based on the same fluorophore indicated a maximum 2P-absorption wavelength around 1050 nm and a secondary maximum around 950–980 nm²⁸.

We then investigated the stability of the 19K-6H labelling, in terms of fluorescence intensity and emission spectra, on murine pCD8 T cells and showed that the labelling was still detectable (by both confocal microscopy and flow cytometry) after 3 days of proliferation for the concentrations $5 \text{ }\mu\text{M}$ and $20 \text{ }\mu\text{M}$. The fluorescence decrease, observed proportionally to the cell proliferation, argues for a fair partitioning of the 19K-6H probe during cell division, which is of importance considering the *in vivo* applications and the potential proliferation of the cells in the host. Furthermore, emission spectra were identical over time (Fig. 2D), indicating that the probes globally remained in the same local environment without degradation.

The working concentrations to obtain an adequate labelling for our application (5 to 20 μM) are higher than those reported for HeLa and Jurkat cells with a previous generation of far-red emitting polymer probes (0.2 to 1 μM)³⁰. This could reflect the difference of brightness of those probes measured in water: 13100 $\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{L}$ for the previous one³⁰ and 2800 $\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{L}$ for the present one. It could also be due to the intrinsically limited internalization process of primary cells compared to metabolically over-active tumoral cell lines. Indeed, when labelled simultaneously in the same conditions (5 μM 19K-6H, 15-h incubation), Jurkat cells showed a 4-time brighter labelling than primary CD8 T cells (*data not shown*). Similar results have been described on HTB-125 (human epithelial non-cancerous cell) and HTB-126 (human epithelial cancerous cell) labelled with a lipid-derived fluorescent probe internalized through endocytosis⁴⁶.

Primary cells present a high biological heterogeneity compared to established cell lines, more representative of their in vivo, physiological origin. It is thus necessary to study the potential cytotoxicity of the probe on the primary cells prior to develop in vivo cell tracking for cell therapy applications. In line with the innocuity of similar far-red emitting polymer probes previously shown on Jurkat cells³⁰, we demonstrated in the present study that the 19K-6H probe did not induce direct cytotoxicity on primary CD8 T cells after a 15-h incubation even at the highest concentration (20 μM) (Fig. 3A). Such biocompatibility was further confirmed by the absence of long-term cytotoxicity, as neither the proliferation nor the activation of pCD8 T cells in response to mitogenic factors were altered (Fig. 3A). Thus, whereas the biocompatibility of many fluorescent nanoparticles remains to be thoroughly investigated⁴⁷, we demonstrated here that the 19K-6H polymer probe labelling did not alter the function of the primary T cells.

Given the observed heterogeneous subcellular distribution of the 19K-6H probe in highly fluorescent spots which suggested a preferential localization in intracellular vesicles, we investigated the endocytosis-mediated internalization pathways with a previously described model of engineered HeLa cells^{36,37}. The 19K-6H was found successively in early endosomes (Rab5A-mCherry, very first minutes after incubation) then in late endosomes (Rab7-GFP, 2 h) in a timely manner. Moreover, internalization was inhibited at 4 °C, a temperature that does not allow for endocytosis⁴⁸. The partial internalization inhibition observed with Dynasore, a dynamin inhibitor³⁸, suggested that the 19K-6H probe could take several endocytic pathways including dynamin-dependent and -independent pathways^{49,50}. Therefore, the distribution of the probe during cell division could be linked to the stochastic endosome inheritance occurring during mitosis in mammalian cell lines^{51,52}. As a perspective, it could be interesting to further investigate the fate of the probe in the cell, along the lysosomal and recycling endosomes pathways⁵³.

Finally, we investigated the potential of the 19K-6H probe for the tracking of primary immune CD8 T cells in a mouse model of liver leukocyte infiltration. The development of a versatile fluorescent probe that can enable the use of several techniques within a single experiment, to bring complementary information is of high interest. In addition, this is also worthy on an ethical point of view, as it limits the number of animals for in vivo studies. Among the most informative techniques, the flow cytometry analysis enables a detailed high-throughput phenotyping of immune cells collected from an organ (such as the liver). Deep imaging with TPEF-microscopy brings the 3D localisation information which is lost in the tissue dissociation step necessary for flow cytometry analysis. We demonstrated here that the 19K-6H probe is very versatile as it can be used in the same experiment for both imaging of extemporaneously-labelled immune cells (from confocal microscopy to TPEF-microscopy for deep imaging) and flow cytometry. We used a well-designed mouse model of T cell-induced liver injury in response to Concanavalin A injection³⁹. In this model, the injected 19K-6H labelled pCD8 T cells were easily detectable within the total NPC by flow cytometry but were seldom imaged by confocal spectral microscopy on 15 μm frozen liver sections. The 19K-6H-labelled pCD8 T cells could be imaged in vivo by TPEF-microscopy under 1040 nm excitation, the optimal 2P-absorption of the 19K-6H probe. With biological samples, TPEF-microscopy enables imaging on a maximal depth of 300 to 500 μm depending on the tissue^{12,54}. To gain insight into the 3D localization of the labelled CD8 T cells within the liver, we associated TPEF-microscopy with a clearing protocol. The clearing protocol, applied as pre-treatment of the thick liver sections, increased imaging depth, and thus the probability of imaging relatively rare events. We used the CUBIC-protocol^{16,35,40} based on successive steps of delipidation, decolorization and refractive index matching, that allows deeper imaging (up to 4 mm) by lowering light scattering by the tissues. Moreover, this aqueous-based clearing protocol is supposed to be less toxic than organic ones and to improve fluorescence preservation¹⁶. TPEF-imaging could then be performed on 800 μm thick liver sections. 19K-6H-labelled pCD8 T cells appeared with a high signal-to-noise ratio in the far-red channel. This strong signal was highly specific, easily discriminated from the hepatic autofluorescence observed in the green channel. Indeed, by using adequate acquisition parameters and a fixed minimum threshold volume of 2 μm^3 , 148 far-red emitting events have been detected in the analysed liver sample (0.186 mm^3) of mice injected with labelled pCD8 T cells whereas none were detected in the control liver (injected with unlabelled pCD8 T cells). Those events displayed a mean volume of 49 μm^3 which is in line with the average size of pCD8 T cells (3–5 μm , Figs. 1B,D, 2B, S3, S4). The density of fluorescent events was quantified to 796 events/ mm^3 , and it can be extrapolated to approximately 1.3×10^6 19K-6H-labelled pCD8 T cells for a whole liver (1650 mm^3). This range is consistent with the number of 19K-6H-labelled cells injected to the mice (1.5×10^7 cells). In addition, the global homogenous distribution of the cells (Fig. 7B,C) with some events reaching up to 1500 μm^3 (considered as cell clusters) match to the mouse model of T cell-mediated acute liver hepatitis induced by the Concanavalin A³⁹.

In conclusion, we demonstrated in the present article that the new 19K-6H polymer probe is a highly-biocompatible and versatile probe with a bright and stable fluorescence adapted for multiscale and complementary approaches such as flow cytometry, for high-throughput cell analysis, and fluorescence microscopy (including TPEF-microscopy) for subcellular information and localization of the cells in the analysed organ. Moreover, we showed that the 19K-6H is a robust tool, resistant to acetone- and PFA-fixation as well as CUBIC-clearing, thus making it even more versatile and multiplying its potential fields of applications. Finally, given the high 2P-absorption of the 19K-6H probe at 1040 nm, another interesting application to investigate will be the

intra-vital in vivo two-photon scanning laser microscopy by using dual wavelength excitation (1040/900 nm) to provide dynamic insights of cell behaviours in a real-time manner^{14,15}.

Received: 6 July 2020; Accepted: 5 October 2020

Published online: 16 October 2020

References

- Gill, S., Maus, M. V. & Porter, D. L. Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25 years in the making. *Blood Rev.* **30**, 157–167 (2016).
- Edozie, F. C. *et al.* Regulatory T-cell therapy in the induction of transplant tolerance: The issue of subpopulations. *Transplantation* **98**, 370–379 (2014).
- Lee, K., Nguyen, V., Lee, K.-M., Kang, S.-M. & Tang, Q. Attenuation of donor-reactive T cells allows effective control of allograft rejection using regulatory T cell therapy: Prerequisite for Treg control of alloimmunity. *Am. J. Transplant.* **14**, 27–38 (2014).
- Seth, A., Park, H. & Hong, K. Current perspective on in vivo molecular imaging of immune cells. *Molecules* **22**, 881 (2017).
- Kiessling, F. Noninvasive cell tracking. In *Molecular Imaging II* Vol. 185/2 (eds Semmler, W. & Schwaiger, M.) 305–321 (Springer, Berlin, 2008).
- Progatzky, F., Dallman, M. J. & Lo Celso, C. From seeing to believing: Labelling strategies for in vivo cell-tracking experiments. *Interface Focus* **3**, 20130001 (2013).
- Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I. & Bootman, M. D. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2014**, pdb.top071795 (2014).
- Swenson, E. S., Price, J. G., Brazelton, T. & Krause, D. S. Limitations of green fluorescent protein as a cell lineage marker. *Stem Cells* **25**, 2593–2600 (2007).
- Monici, M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. In *Biotechnology Annual Review*, Vol. 11, 227–256 (Elsevier, Amsterdam, 2005).
- Jun, Y. W., Kim, H. R., Reo, Y. J., Dai, M. & Ahn, K. H. Addressing the autofluorescence issue in deep tissue imaging by two-photon microscopy: The significance of far-red emitting dyes. *Chem. Sci.* **8**, 7696–7704 (2017).
- Zipfel, W. R., Williams, R. M. & Webb, W. W. Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1369–1377 (2003).
- Helmchen, F. & Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods* **2**, 932–940 (2005).
- Centonze, V. E. & White, J. G. Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophys. J.* **75**, 2015–2024 (1998).
- Pittet, M. J. & Weissleder, R. Intravital imaging. *Cell* **147**, 983–991 (2011).
- Guidotti, L. G. *et al.* Immunosurveillance of the liver by intravascular effector CD8+ T cells. *Cell* **161**, 486–500 (2015).
- Costantini, I., Cicchi, R., Silvestri, L., Vanzi, F. & Pavone, F. S. In-vivo and ex-vivo optical clearing methods for biological tissues: Review. *Biomed. Opt. Express* **10**, 5251 (2019).
- Bhirde, A., Xie, J., Swierczewska, M. & Chen, X. Nanoparticles for cell labeling. *Nanoscale* **3**, 142–153 (2011).
- Noh, Y.-W., Lim, Y. T. & Chung, B. H. Noninvasive imaging of dendritic cell migration into lymph nodes using near-infrared fluorescent semiconductor nanocrystals. *FASEB J.* **22**, 3908–3918 (2008).
- Derfus, A. M., Chan, W. C. W. & Bhatia, S. N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.* **4**, 11–18 (2004).
- Chen, N. *et al.* The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials* **33**, 1238–1244 (2012).
- Lim, M. *et al.* Synthesis of far-red- and near-infrared-emitting Cu-doped InP/ZnS (core/shell) quantum dots with controlled doping steps and their surface functionalization for bioconjugation. *Nanoscale* **11**, 10463–10471 (2019).
- Massey, M., Wu, M., Conroy, E. M. & Algar, W. R. Mind your P's and Q's: The coming of age of semiconducting polymer dots and semiconductor quantum dots in biological applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **34**, 30–40 (2015).
- Wu, C. *et al.* Design of highly emissive polymer dot bioconjugates for in vivo tumor targeting. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 3430–3434 (2011).
- Hassan, A. M. *et al.* Polymer dots enable deep in vivo multiphoton fluorescence imaging of microvasculature. *Biomed. Opt. Express* **10**, 584 (2019).
- Dubreil, L. *et al.* Multi-harmonic imaging in the second near-infrared window of nanoparticle-labeled stem cells as a monitoring tool in tissue depth. *ACS Nano* **11**, 6672–6681 (2017).
- Adjili, S. *et al.* Synthesis of multifunctional lipid-polymer conjugates: Application to the elaboration of bright far-red fluorescent lipid probes. *RSC Adv.* **4**, 15569–15578 (2014).
- Massin, J. *et al.* Near-infrared solid-state emitters based on isophorone: Synthesis, crystal structure and spectroscopic properties. *Chem. Mater.* **23**, 862–873 (2011).
- Massin, J. *et al.* A water soluble probe with near infrared two-photon absorption and polarity-induced fluorescence for cerebral vascular imaging. *Chem. Sci.* **4**, 2833 (2013).
- Lacour, W. *et al.* Far-red fluorescent lipid-polymer probes for an efficient labeling of enveloped viruses. *Adv. Healthc. Mater.* **5**, 2032–2044 (2016).
- Adjili, S. *et al.* Biocompatible photoresistant far-red emitting, fluorescent polymer probes, with near-infrared two-photon absorption, for living cell and zebrafish embryo imaging. *Biomaterials* **46**, 70–81 (2015).
- Chamignon, C., Duret, D., Charreyre, M.-T. & Favier, A. ¹H DOSY NMR determination of the molecular weight and the solution properties of poly(*N*-acryloylmorpholine) in various solvents. *Macromol. Chem. Phys.* **217**, 2286–2293 (2016).
- Favier, A., D'Agosto, F., Charreyre, M.-T. & Pichot, C. Synthesis of *N*-acryloxysuccinimide copolymers by RAFT polymerization, as reactive building blocks with full control of composition and molecular weights. *Polymer* **45**, 7821–7830 (2004).
- Cepraga, C. *et al.* Biocompatible well-defined chromophore-polymer conjugates for photodynamic therapy and two-photon imaging. *Polym. Chem.* **4**, 61–67 (2013).
- Le Guen, V. *et al.* Alloantigen gene transfer to hepatocytes promotes tolerance to pancreatic islet graft by inducing CD8+ regulatory T cells. *J. Hepatol.* **66**, 765–777 (2017).
- Tainaka, K. *et al.* Chemical landscape for tissue clearing based on hydrophilic reagents. *Cell Rep.* **24**, 2196–2210.e9 (2018).
- Bohdanowicz, M., Balkin, D. M., De Camilli, P. & Grinstein, S. Recruitment of OCRL and Inpp5B to phagosomes by Rab5 and APPL1 depletes phosphoinositides and attenuates Akt signaling. *Mol. Biol. Cell* **23**, 176–187 (2012).
- Rojas, R. *et al.* Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J. Cell Biol.* **183**, 513–526 (2008).
- Kirchhausen, T., Macia, E. & Pelish, H. E. Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. In *Methods in Enzymology*, Vol. 438, 77–93 (Elsevier, Amsterdam, 2008).
- Tiegs, G., Hentschel, J. & Wendel, A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J. Clin. Investig.* **90**, 196–203 (1992).
- Susaki, E. A. *et al.* Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat. Protoc.* **10**, 1709–1727 (2015).

41. Albrecht, C. & Joseph, R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd edition. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 1223–1224 (2008).
42. Bardon, K. M. *et al.* Synthesis of water-soluble far-red-emitting amphiphilic BODIPY dyes. *ACS Omega* **3**, 13195–13199 (2018).
43. Loudet, A. & Burgess, K. BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **107**, 4891–4932 (2007).
44. Beija, M., Afonso, C. A. M. & Martinho, J. M. G. Synthesis and applications of rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2410 (2009).
45. Wiederschain, G. Y. The molecular probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies: (I. Johnson and M. Spence (eds.) 11th Edition, Life Technologies, 2010, 1060 p., \$100). *Biochem. Mosc.* **76**, 1276–1276 (2011).
46. Levine, M. N., Hoang, T. T. & Raines, R. T. Fluorogenic probe for constitutive cellular endocytosis. *Chem. Biol.* **20**, 614–618 (2013).
47. Nel, A. & Xia, T. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**, 7 (2006).
48. Tomoda, H. & Kishimoto, Y. Temperature effect on endocytosis and exocytosis by rabbit alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* **264**(26), 15445–15450 (1989).
49. Mayor, S., Parton, R. G. & Donaldson, J. G. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a016758–a016758 (2014).
50. Doherty, G. J. & McMahon, H. T. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 857–902 (2009).
51. Bergeland, T., Widerberg, J., Bakke, O. & Nordeng, T. W. Mitotic partitioning of endosomes and lysosomes. *Curr. Biol.* **11**, 644–651 (2001).
52. Dunster, K. Early endosomes, late endosomes, and lysosomes display distinct partitioning strategies of inheritance with similarities to Golgi-derived membranes. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 117–124 (2002).
53. Goldenring, J. R. Recycling endosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **35**, 117–122 (2015).
54. Rubart, M. Two-photon microscopy of cells and tissue. *Circ. Res.* **95**, 1154–1166 (2004).
55. Hall, C., Luessen, E., Mořat, A. & Linninger, A. A. Interspecies scaling in pharmacokinetics: A novel whole-body physiologically based modeling framework to discover drug biodistribution mechanisms in vivo. *J. Pharm. Sci.* **101**, 1221–1241 (2012).

Acknowledgements

This manuscript is a tribute to the 50 year anniversary of the French Polymer Group (Groupe Français des Polymères–GFP). We wish to thank the UTE IRS–UN animal facility of the SFR Santé F. Bonamy (Université de Nantes, INSERM UMS016, CNRS UMS3556). We acknowledge Dr. Julien Massin, Dr. Yann Bretonnière and Dr. Chantal Andraud (Laboratoire de Chimie, ENS de Lyon) for the isophorone derivative fluorophore and for the use of their spectrophotometer and spectrofluorimeter equipments. We acknowledge Dr. Salim Adjili and Laura Possi-Tchouanlong (Laboratoire IMP) for, respectively, some help to TB for the synthesis/characterization of the polymer probe and the determination of its molar extinction coefficient and fluorescence quantum yield. We acknowledge APEX platform of the INRA/Oniris UMR 703 PAnTher, Center of Excellence Nikon Nantes (Nantes, France).

Author contributions

M.D. performed the experiments, analysed the results and wrote the manuscript. L.D., R.F. performed microscopy studies and analyses. J.-P.J. participated to animal experiments. T.B., A.F. and M.-T.C. produced and provided the 19K-6H probe. S.C., S.B. provided funding. S.C., S.B., M.-T.C., A.F., L.D. participated to the redaction of the manuscript. S.C., M.-T.C. and L.D. supervised this interdisciplinary project in conception and execution.

Funding

This work was supported by institutional grants from INSERM and Université de Nantes to the Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie. The project was funded by grants from AFM Telethon (#20791, #21337). It was carried out in the context of the IHU–Cesti project (ANR-10-IBHU-005) and of the LabEX IGO program (ANR-11-LABX-0016-01). The IHU–Cesti project was also supported by Nantes Métropole and the Région Pays de la Loire.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74621-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Supplementary information

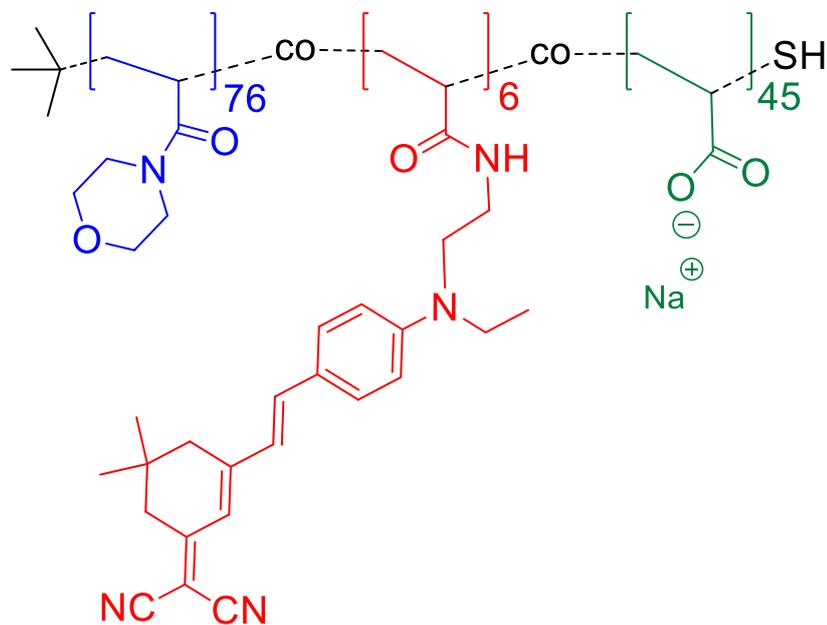


Figure S1. Chemical structure of the 19K-6H polymer probe. Blue : N-acryloylmorpholine (NAM) units; red: far-red emitting fluorescent units; green: negatively-charged sodium acrylate units.

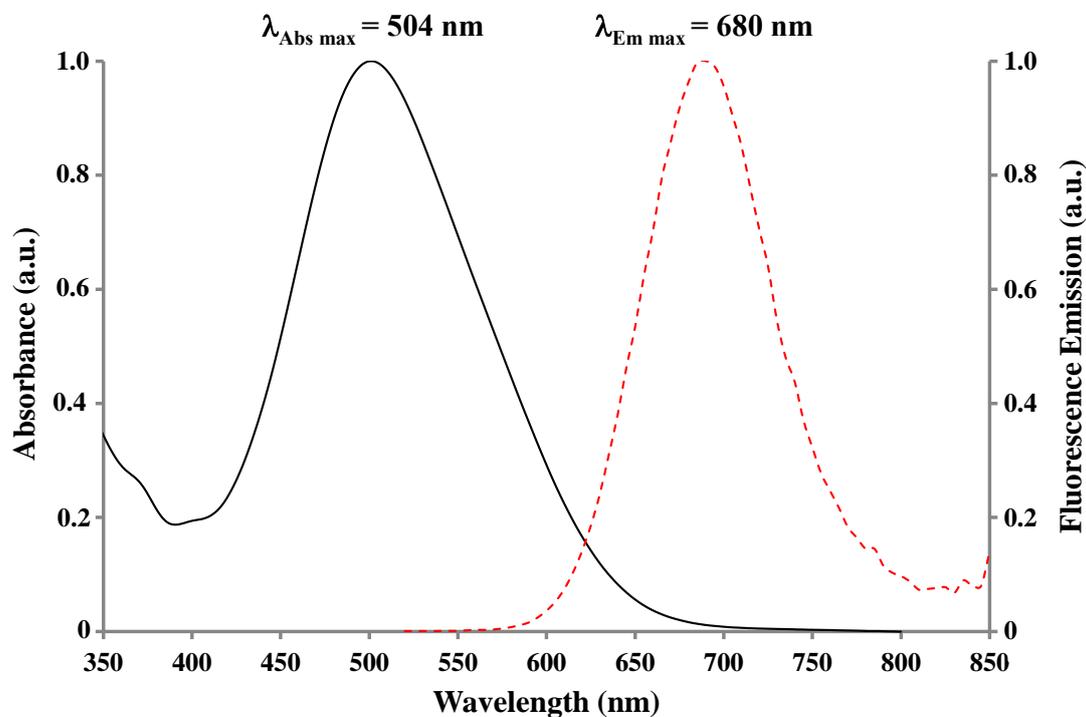


Figure S2. Normalized absorbance (full line) and fluorescence emission (dashed line, $\lambda_{\text{Ex}} = 510\text{nm}$) spectra of the polymer probe in water ($\epsilon = 43400 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ at $\lambda_{\text{Abs max}} = 504 \text{ nm}$, $\phi = 0.064$).

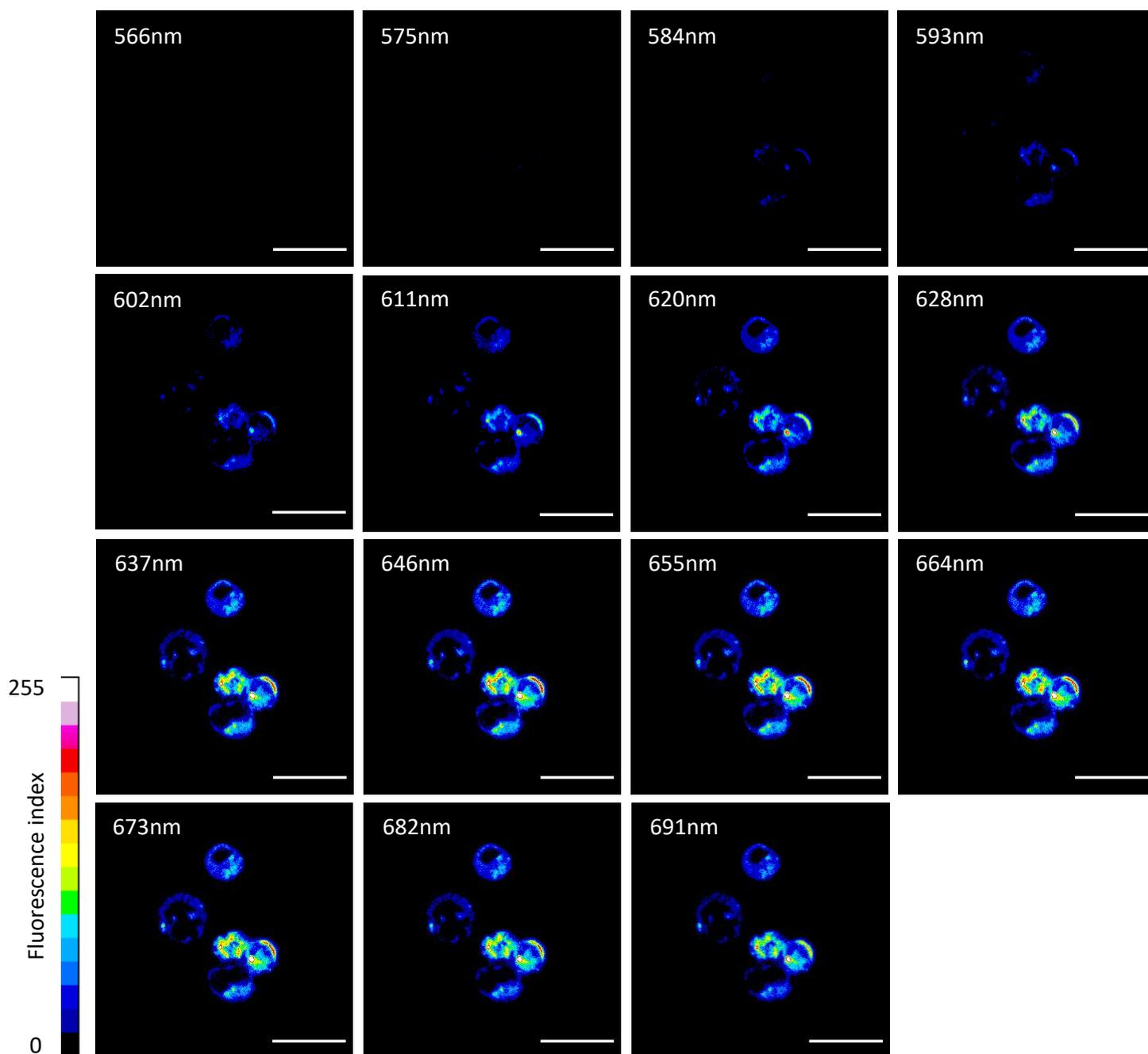


Figure S3. Fluorescence confocal spectral microscopy images (objective 63X - λ_{ex} 561nm) of pCD8 T cells labelled with 19K-6H probe (20 μ m, 15-hour incubation). Grey levels (8bits) were color-coded with the 16 colors look-up-table (LUT) from FIJI software. Collection of fluorescence emissions from 566 to 700nm with 15 steps of 8.9nm. Scale bar : 10 μ m.

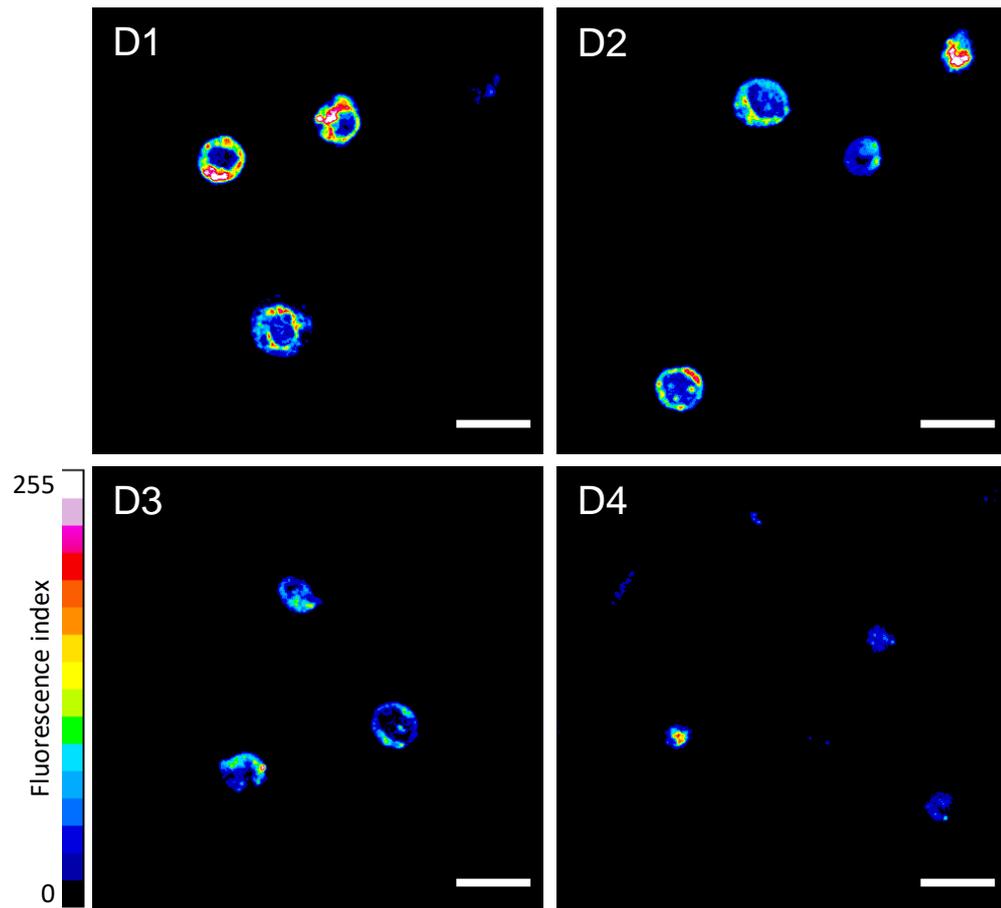


Figure S4. Fluorescence confocal microscopy images (objective 63X) of proliferating pCD8 T cells (λ_{ex} 561nm) from day 1 to day 4 after 15 hours incubation of the 19K-6H probe (20 μm). Grey levels (8bits) were color-coded with the 16 colors look-up-table (LUT) from FIJI software. Scale bar : 10 μm .

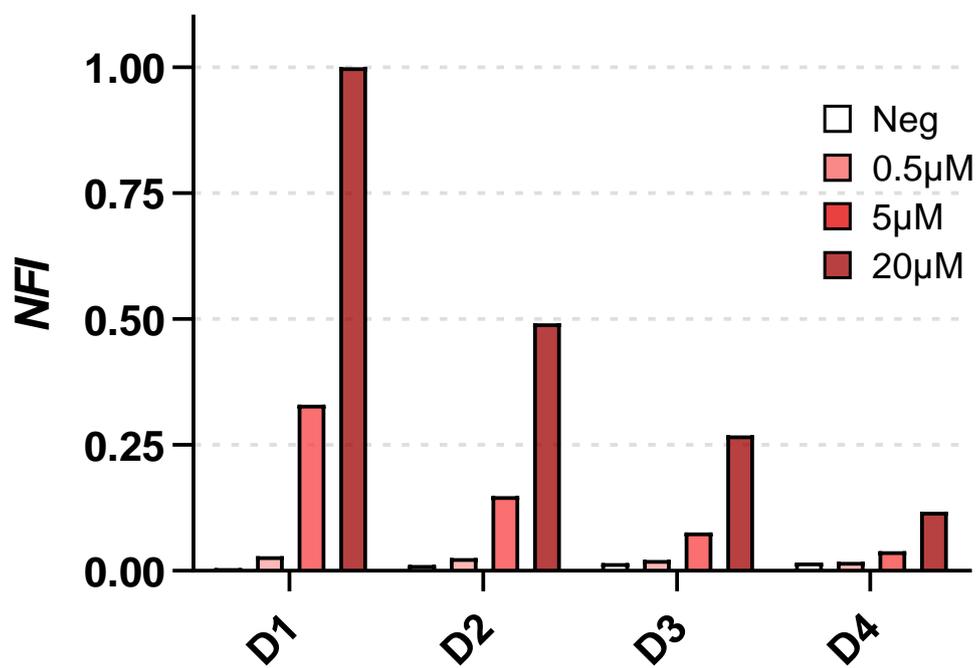


Figure S5. Evolution of 19K-6H labelling on proliferating pCD8 T cells after 15 hours incubation of the 19K-6H probe. The labelling is monitored by flow cytometry (em710/50nm) on living cells, n=2. NFI: normalized fluorescence intensity.

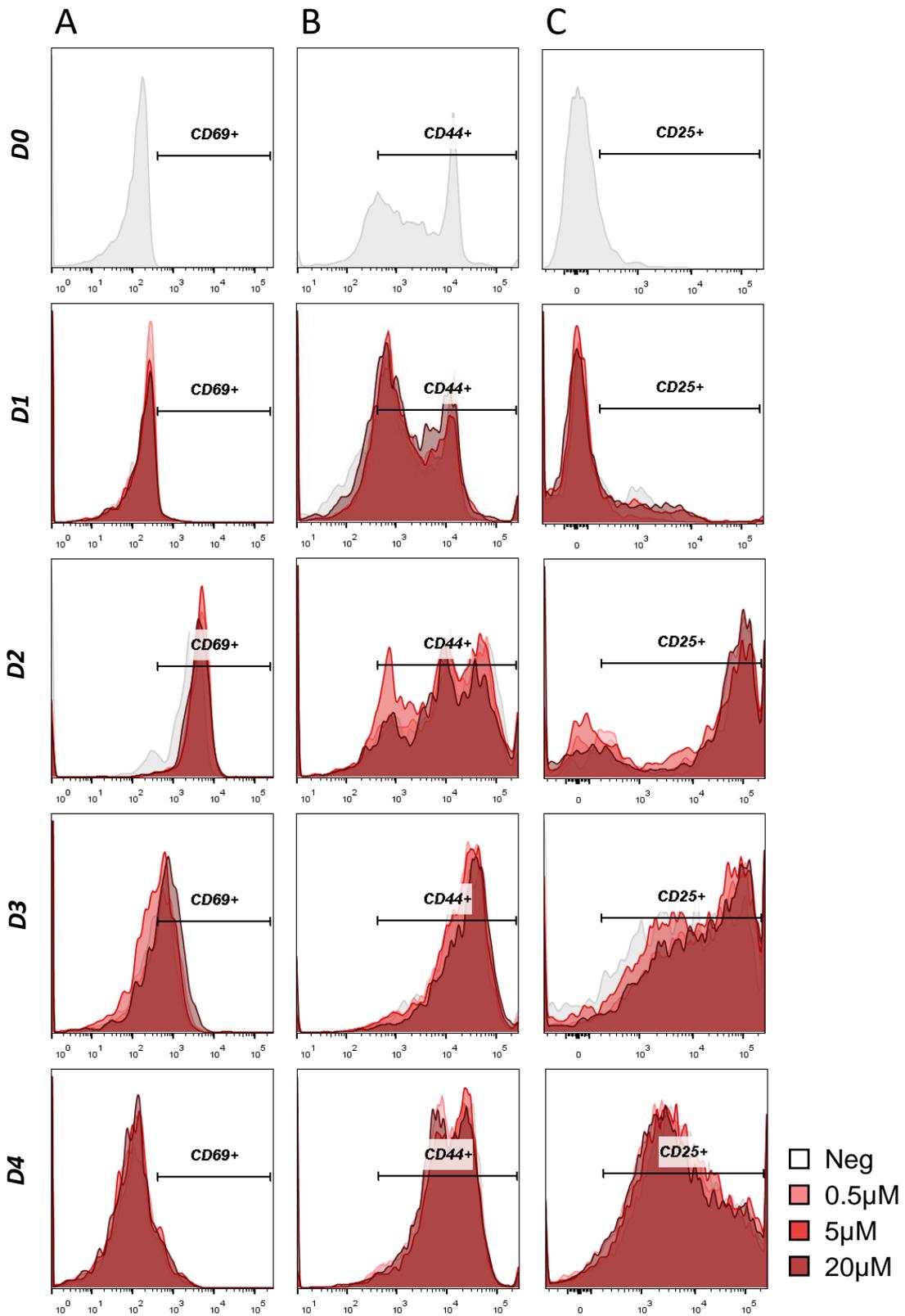


Figure S6. Evolution of pCD8 T cells activation after 15 hours incubation with increasing concentrations (0.5; 5; 20 μ M) of 19K-6H probe compared to negative control (w/o 19K-6H). FACS analysis of 3 activation markers: early marker CD69 (A), late markers CD44 (B) and CD25 (C). The positive gates are determined thanks to negative control. Representative of 3 experiments.

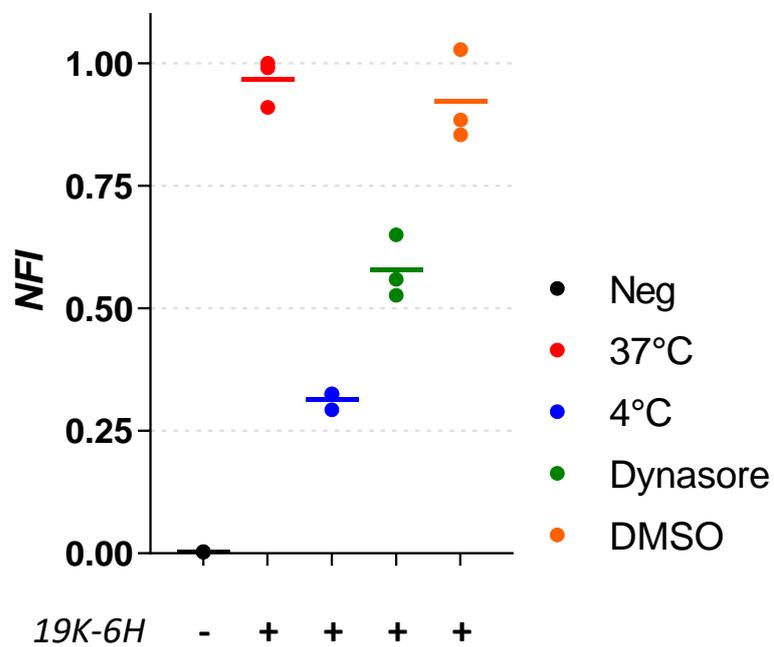


Figure S7. pCD8 T cells are incubated 8 hours with 19K-6H probe (10 μ m) at 37°C or 4°C or in presence of 80 μ m of Dynasore (37°C) or DMSO (Dynasore solvent – 37°C) in the culture medium. 19K-6H labelling is evaluated by FACS. NFI: normalized fluorescence intensity. n=3. Bar : median values.

Discussion

1- Vers la caractérisation in situ des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins par microscopie

Le travail transdisciplinaire présenté ci-dessus nous a permis de mettre en avant l'intérêt de la sonde polymère 19K-6H pour le tracking de cellules primaires dans le foie de souris. Comme mentionné en introduction, si la démonstration est ici effectuée sur des LT CD8⁺ primaires spléniques par soucis de disponibilité, l'objectif final est bien d'appliquer ces avancées technologiques pour la caractérisation des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins. En effet, la biocompatibilité de la sonde ainsi que ses propriétés spectrales remarquables en font un outil multimodal de choix pour l'imagerie, dans le foie, d'évènements rares. Les premiers essais de marquage fluorescent des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins en vue de leur analyse microscopique ont été rapidement menés et confrontés encore une fois à la problématique du nombre de cellules. En effet, les premières expérimentations visant à investiguer le tropisme de LT_{Regs} CD8⁺ marqués *ex vivo* avec la sonde 19K-6H avant injection *i.v.* de $5 \cdot 10^4$ à $1,5 \cdot 10^5$ cellules ont permis, par cytométrie en flux, de confirmer un tropisme hépatique de ces cellules, indépendant de l'expression de la molécule de CMH allogénique H-2K^d (*données non-montrées*). Néanmoins, le trop faible nombre de cellules injectées (de façon systémique) par animal ne nous a pas permis d'en retrouver un nombre interprétable en microscopie biphotonique sur coupe épaisse.

Ainsi, les protocoles d'expansion mentionnés un peu plus haut nous permettrons, après validation des fonctions suppressives des cellules expansées, d'envisager les applications *in vivo* pour l'instant limitées par le nombre de cellules. Le modèle Hepa1.6 allogénique pourra par exemple être enrichi par un marquage fluorescent 19K-6H extemporané des LT_{Regs} CD8⁺ expansées avant leur injection, permettant la quantification et l'analyse de leur distribution dans un foie tumoral ou non par microscopie biphotonique sur coupe épaisse transparaissée. Il serait également pertinent d'approfondir la caractérisation des interactions potentielles entre les LT_{Regs} CD8⁺ et les autres acteurs immunitaires hépatiques (*cf.* introduction, partie 2.2.3.). Pour ce faire, de nombreux modèles murins, génétiquement modifiés pour exprimer des gènes rapporteurs, facilitent l'analyse microscopique de ces populations hépatiques rendues fluorescentes (Sierro et al., 2017). Les souris C57Bl/6 *CD11c-EYFP* (*Enhanced Yellow*

Fluorescent Protein) (Lindquist et al., 2004) et *Cx3cr1-EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)* (Jung et al., 2000) permettent par exemple un suivi des cellules dendritiques hépatiques de par leur fluorescence intrinsèque dans ces modèles. Les souris C57Bl/6 MacGreen (*Csf1r-EGFP*) et MacBlue (*Csf1r-ECFP* pour *Enhanced Cyan Fluorescent Protein*) ainsi que les souris *Lys2-EGFP* permettent quant à elle d'obtenir des souris dont les cellules de Kupffer seront fluorescentes (Faust et al., 2000; Sasmono et al., 2003; Ovchinnikov et al., 2008). En outre, une stratégie élégante décrite récemment par Heymann et collaborateurs permet l'analyse microscopique simultanée des cellules de Kupffer et des cellules dendritiques hépatiques (Heymann et al., 2015). Dans cette étude, les souris *Cx3cr1-EGFP*, mentionnées un peu plus haut, sont injectées *i.v.* avec des billes de latex couplées à un fluorochrome rouge. Ces billes de latex vont être phagocytées, entre autres, par les cellules de Kupffer qui incorpore la fluorescence rouge associée. Ce modèle permet le tracking multivarié en temps réel par microscopie biphotonique sur animal vivant (ou *intravital TPLSM* pour *intravital two-photon laser scanning microscopy*), des cellules dendritiques hépatiques et des cellules de Kupffer. Il serait très intéressant pour nous d'associer ce modèle d'analyse microscopique biphotonique multivarié à nos travaux sur la caractérisation des $LT_{\text{Regs}} CD8^+$, dans le modèle de transplantation d'îlots pancréatiques ou tumoral allogénique Hepa1.6 H-2K^d, afin d'étudier les interactions des $LT_{\text{Regs}} CD8^+$ avec les cellules présentatrices d'antigènes hépatiques que l'on sait impliquées dans la mise en place de la tolérance hépatique.

Néanmoins, ces travaux sont encore une fois limités par le nombre réduit de $LT_{\text{Regs}} CD8^+$ et reposent ainsi sur l'expansion des cellules *ex vivo*. C'est pourquoi nous développons également en parallèle des stratégies de miniaturisation de protocoles d'expérimentation *in vitro* permettant de poursuivre la caractérisation des $LT_{\text{Regs}} CD8^+$ hépatiques murins sur un nombre réduit de cellules.

2- Développement d'un modèle de coculture hépato-lymphocytaire adapté à la microscopie

Bien qu'aujourd'hui non élucidé, il est évident que l'hépatocyte joue un rôle central dans notre modèle murin d'induction de tolérance allogénique par transfert de gènes dans le foie. En effet, l'hépatocyte est la seule cellule qui exprime la molécule de CMH allogénique H-2K^d après

injection du scAAV-H-2K^d dans les souris C57Bl/6. De plus, comme mentionné en introduction, les hépatocytes sont capables de présentation directe envers les lymphocytes circulants, au travers des fenêtrées endothéliales des sinusoides hépatiques. Il reste toutefois à déterminer le rôle de l'hépatocyte dans la génération et le maintien de la population de LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins. Pour ce faire, j'ai pu développer durant ma thèse un modèle de coculture hépato-lymphocytaire permettant d'étudier, par microscopie, les interactions entre les LT_{Regs} CD8⁺ et les hépatocytes exprimant ou non la molécule de CMH allogénique H-2K^d. La principale difficulté associée à ce protocole réside dans la fragilité des hépatocytes primaires, compliquant leur isolation et leur culture. Nous avons profité de l'expertise de l'équipe du Dr Jean-Pierre Couty (Centre de Recherche des Cordeliers – Paris) dans la culture d'hépatocytes primaires. Les hépatocytes primaires sont isolés suivant le protocole décrit par Severgnini et collaborateurs (Severgnini et al., 2012). L'étape limitante de ce protocole est liée à la digestion enzymatique du foie nécessaire à la dissociation efficace des hépatocytes de la matrice hépatique mais aboutissant parfois à mortalité cellulaire importante. Les hépatocytes primaires sont ensuite mis en culture en milieu complet (~7,5 10⁴ cellules/cm²), et vont former en quelques heures un tapis hépatocytaire adhérent sur lequel pourra être ajoutée diverses populations lymphocytaires. Ainsi, afin de m'affranchir du nombre réduit de LT_{Regs} CD8⁺, nous sommes parvenus à adapter ce protocole pour de petits volumes permettant l'ensemencement de 15 000 hépatocytes primaires exprimant ou non H-2K^d dans des plaques Ibidi 18 puits adaptées pour la microscopie (*Figure 22*).

Ce modèle de coculture nous permet ainsi d'analyser directement par microscopie, les interactions potentielles entre les LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins et les hépatocytes exprimant ou non l'alloantigène H-2K^d. Ainsi, nous nous sommes dans un premier temps intéressés à investiguer l'activation cellulaire des LT_{Regs} CD8⁺ vis-à-vis d'hépatocytes naïfs ou H-2K^d par analyse du flux calcique à l'aide de la sonde fluorescente Fura-2. Brièvement, la sonde fluorescente Fura-2 est un outil moléculaire largement démocratisé aujourd'hui qui permet l'analyse ratiométrique de la concentration intracellulaire de calcium, reflétant l'état d'activation de la cellule (Zanin et al., 2019). Cette sonde permet en outre d'analyser la signalisation TCR associé à un relargage de calcium intracellulaire important (Joseph et al., 2014).

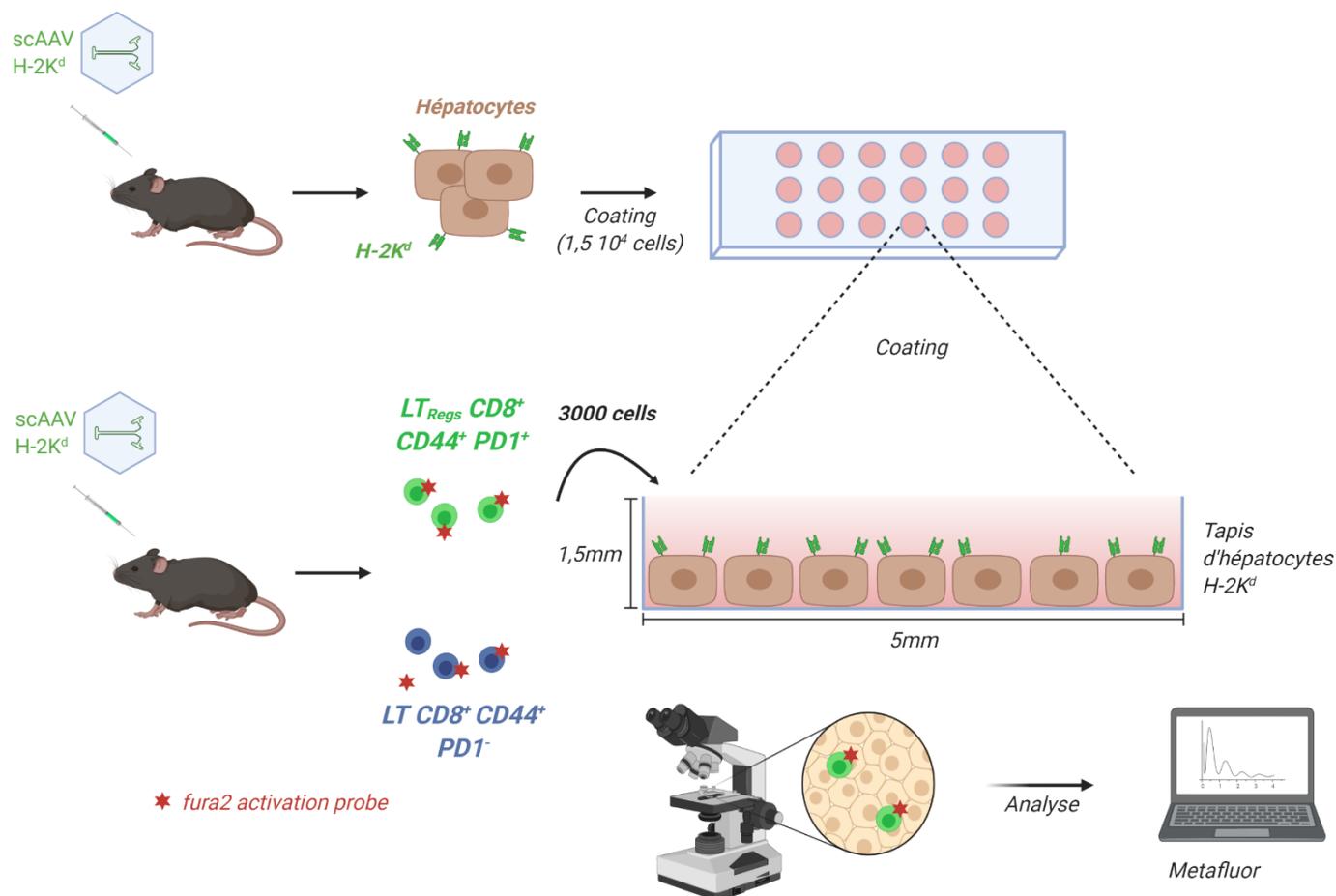


Figure 22 : Modèle de coculture hépato-lymphocytaire en petit volume, adapté à la microscopie. Les hépatocytes sont isolés à partir de souris préalablement injectées en scAAV-H-2K^d, puis ensemencés en Ibidi 18 puits à raison de 15 000 cellules par puits. Les lymphocytes CD8⁺ régulateurs ou contrôles sont marqués à l'aide de la sonde Fura2 permettant l'analyse de l'activation cellulaire, et déposés sur le tapis hépatocytaire H-2K^d. L'étude de l'activation cellulaire est effectuée par microscopie champ large et analysée sur le logiciel Metafluor.

Nous avons donc comparé l'activation cellulaire des LT_{Regs} CD8⁺ et des LT CD8⁺ CD44⁺ PD1⁻ contrôles sur un tapis hépatocytaire exprimant H-2K^d (la condition du tapis hépatocytaire contrôle ayant été sujet à un problème technique lors des acquisitions). Les résultats de cette première expérience sont donnés en *Figure 23* ci-dessous, et suggèrent que les LT_{Regs} CD8⁺ sont moins à même de s'activer sur un tapis hépatocytaire comparé aux lymphocytes CD8⁺ contrôles. Ces résultats nécessitent toutefois d'être confirmés et comparés avec la coculture de lymphocytes CD8 sur un tapis hépatocytaire contrôle afin de pouvoir conclure quant à des différences d'activation spécifiquement lié à l'expression de l'alloantigène H-2K^d à la surface des hépatocytes.

Les techniques d'imagerie en temps réel telles que celle menée ici permettent de plus d'étudier le comportement dynamique des cellules, en analysant par exemple la vitesse

moyenne des cellules ou encore leur taille, rondeur, trajectoire, etc, permettant de mettre en lumière des interactions cellulaires (Flora Ascione et al., 2014; Svensson et al., 2018). Dans la présente analyse, aucune différence associée à ces paramètres n'a été démontré.

Ces premières expérimentations permettent toutefois de valider le modèle de coculture hépato-lymphocytaire en petit volume adapté pour la microscopie. En effet, les hépatocytes primaires n'ont pas présenté de signes de mortalité évidents durant ces expérimentations (e.g. perte d'adhérence, bourgeonnement cellulaire). Il serait toutefois intéressant de confronter ce modèle à des durée de cocultures plus importantes afin d'étudier plus finement la réponse CD8 envers le tapis hépatocytaire, par exemple par l'analyse de facteurs solubles dans le surnageant de culture.

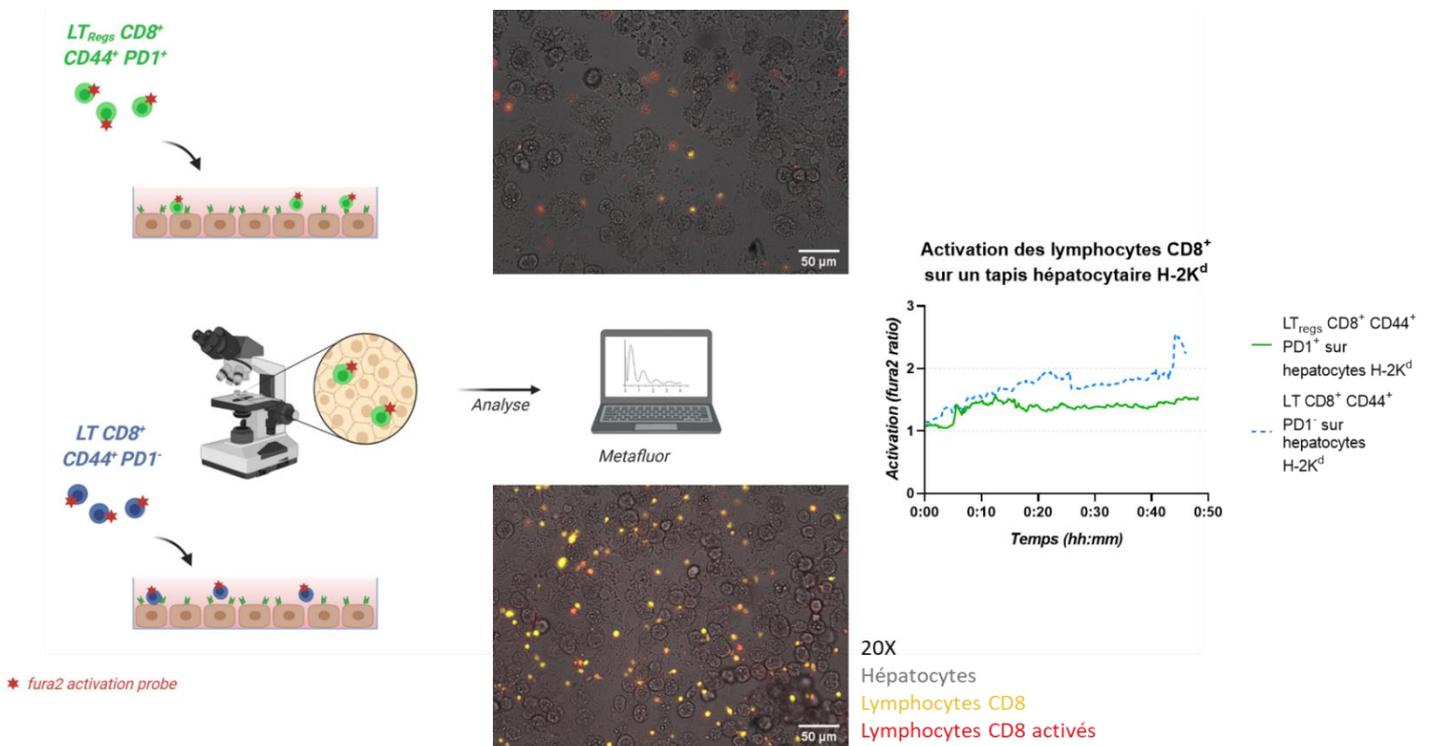


Figure 23 : Analyse de l'activation cellulaire des $LT_{Regs} CD8^+$ et des $LT CD8^+ CD44^+ PD1^-$ contrôles sur un tapis hépatocytaire exprimant l'alloantigène H-2K^d. L'activation cellulaire est imagée grâce à la sonde fluorescente Fura-2. Le signal ratiométrique associée à la sonde Fura-2 est analysé sur 20 cellules par conditions et les résultats sont présentés sur le graphique de droite. Les vidéos seront présentées lors de la soutenance.

Enfin, ce modèle de coculture pourra être incrémenté d'un troisième acteur immunitaire marqué à l'aide de la sonde fluorescente 19K-6H, tel que des $LT CD8^+$ effecteurs spécifiques d'H-2K^d, isolés à partir de souris immunisées avec un adénovirus immunogène pour H-2K^d, afin d'analyser plus finement le caractère régulateur des $LT_{Regs} CD8^+$.

Conclusion

Conclusion

Mon travail de thèse s'est porté sur la caractérisation d'une population cellulaire nouvellement décrite par mon équipe, de lymphocytes CD8⁺ régulateurs induits, chez la souris, dans un foie rendu allogénique par thérapie génique. En effet, dans ce modèle, l'injection d'un scAAV hépatospécifique codant pour la molécule de CMH de classe I H-2K^d conduit à une tolérance opérationnelle envers H-2K^d dans des souris H-2b ; tolérance transmise à un greffon d'îlots pancréatiques (H-2^d) portant cette molécule. Cet état de tolérance est permis par l'induction dans le foie d'une population de lymphocytes CD8⁺ régulateurs CD44⁺ PD1⁺ sécrétant de l'IL-10 (Le Guen et al., 2017). Les objectifs de ma thèse étaient centrés sur l'étude de cette population régulatrice, de sa caractérisation transcriptomique, à la recherche d'une équivalence chez l'homme, en passant par l'analyse microscopique de ses interactions avec son environnement physiologique : le foie.

L'analyse transcriptomique m'a permis de mettre en évidence un profil hautement différentiel des LT_{Regs} CD8⁺ murins hépatiques et d'envisager certains mécanismes potentiellement impliqués dans la génération hépatique de cette population lymphocytaire et de confirmer son profil régulateur. Comme mentionné dans mon introduction, les lymphocytes CD8 régulateurs représentent une population très hétérogène de cellules, dont la caractérisation est souvent restreinte à l'analyse de quelques marqueurs phénotypiques. En ce sens, l'étude transcriptomique permet une analyse beaucoup plus exhaustive, permettant la comparaison de multiples populations cellulaires par le biais de méta-analyse. Basé sur l'analyse du transcriptome et de la littérature, j'ai pu ensuite approfondir le phénotype de ces cellules, en confirmant un peu plus leur profil régulateur, notamment par l'expression de marqueurs tels que CD94 et CD39, ou par la sous-expression de la molécule CD45RC, largement décrit à la surface de nombreuses populations CD8 régulatrices. Afin de confirmer le potentiel régulateur de ces cellules j'ai également commencé le développement d'un test *in vivo*, basé sur la prise tumorale de cellules allogéniques Hepa1.6, permettant d'évaluer le potentiel suppressif des LT_{Regs} CD8⁺. Nous espérons que ce test permettra, dans la lignée du modèle de transplantation d'îlots pancréatiques (bien que plus aisé à mettre en place, et plus éthique par l'utilisation d'un nombre réduit de souris), de confirmer les fonctions suppressives des LT_{Regs} CD8⁺ hépatiques murins.

Enfin, ces études m'ont permis de débiter la recherche d'une population équivalente chez l'homme, dans une cohorte de patients transplantés hépatiques tolérants ou non leur greffon après arrêt des traitements immunosuppresseurs. Si l'analyse de leur PBMC n'a pour l'instant pas permis de mettre en évidence d'enrichissement spécifique d'une population CD8 présentant une signature tolérogène, nous prévoyons toutefois d'optimiser cette étude par l'utilisation de la cytométrie spectrale, permettant l'analyse d'un nombre considérable de marqueurs simultanément.

En parallèle, j'ai mené des travaux de développements microscopiques dont le but final est de caractériser les LT_{Regs} CD8⁺ vis-à-vis de l'environnement hépatique et des différents acteurs immunitaires qui le composent. J'ai dans un premier temps démontré l'intérêt d'une sonde polymère fluorescente de dernière génération pour le tracking multimodal de cellules primaires dans le foie de souris. Cette étude pluridisciplinaire m'a permis de travailler avec des experts de différents domaines, ce qui a été pour moi extrêmement formateur et enrichissant. De plus, les résultats originaux tirés de cette étude ont fait l'objet d'un article, intégré à ce manuscrit. Nous travaillons maintenant à appliquer cette méthodologie et ces avancées technologiques à l'étude des LT_{Regs} CD8⁺ pour l'instant limitée par la disponibilité de ces cellules. Ainsi, comme discuté précédemment, l'étude de l'expansion de ces cellules représente également une priorité afin d'assurer la continuité et la pérennité de ce projet.

Une solution alternative, permettant d'outrepasser la problématique du nombre de cellules disponible, est de recréer l'environnement hépatique par des modèles *in vitro*. Pour ce faire, j'ai également mis en place un modèle de coculture hépato-lymphocytaire en petit volume, adapté à la microscopie permettant d'analyser les interactions entre les LT_{Regs} CD8⁺ et les hépatocytes exprimant ou non l'alloantigène responsable de leur expansion. Ce modèle a pour l'instant permis de démontrer un profil d'activation particulier de ces cellules, et pourra à l'avenir être incrémenté par l'ajout de cellules immunitaires hépatiques afin d'analyser plus finement les interactions potentielles entre LT_{Regs} CD8⁺ et CPA hépatiques.

Ces travaux s'inscrivent dans la caractérisation d'une population CD8 régulatrice, mais permettent plus globalement d'approfondir la compréhension des mécanismes d'induction de tolérance allogénique hépatique et systémique, qui est aujourd'hui un sujet d'importance en transplantation.

Annexe

Table 7 : Liste restreinte des 147 gènes les plus différentiellement exprimés ($\log_2FC > |2|$, adj. p. val $< 10^{-5}$, dans au moins une condition) entre les $LT_{Regs} CD8^+ CD44^+ PD1^+$ (i) et les $LT CD8^+ CD44^+ PD1^-$ provenant de souris injectées en AAV-H-2K^d (ii) ou AAV-ctrl (iii). Sont représentés : le niveau moyen d'expression (Ave. Exp pour average expression) du gène associé à la population de $LT_{Regs} CD8^+ CD44^+ PD1^+$ (i), le \log_2FC (fold-change) reflet de l'expression différentielle entre deux conditions et la p-value associée (adj. P value pour adjusted P value).

	(i)	(i) vs (ii)		(i) vs (iii)	
	Ave. Exp	logFC	adj. P value	logFC	adj. P value
2900026A02Rik	4,91	4,34	1,05E-07	3,86	1,11E-08
A430093F15Rik	3,56	2,37	2,01E-05	2,43	1,61E-06
AB124611	5,05	-3,15	1,37E-06	-2,69	1,08E-05
Acot7	6,60	1,83	2,07E-06	2,23	4,44E-08
Adam8	2,99	5,79	1,47E-05	4,31	9,66E-07
Adgrg5	5,20	-3,11	1,49E-06	-3,52	1,14E-07
Arid5a	7,06	-2,24	4,13E-08	-1,94	1,25E-07
Arl4c	4,99	-2,35	4,13E-08	-2,21	4,04E-08
Ass1	4,55	-2,41	7,80E-07	-2,06	4,98E-06
Bzw2	5,42	-2,66	7,16E-08	-2,48	1,04E-07
C230085N15Rik	4,76	-4,87	4,51E-07	-5,16	1,58E-07
Car2	3,31	5,74	5,72E-05	6,49	3,61E-06
Casp3	4,11	3,24	7,16E-08	3,07	1,49E-09
Ccl3	6,44	2,45	2,90E-06	2,66	2,47E-07
Ccl4	8,41	1,61	9,62E-05	2,11	1,53E-06
Ccr7	8,13	-4,82	2,39E-09	-4,39	1,78E-09
Ccr2	5,08	2,73	2,14E-07	3,33	2,76E-09
Cd163l1	1,54	-8,33	1,36E-06	-8,43	1,22E-06
Cd200r1	4,03	5,24	9,85E-06	4,20	6,01E-08
Cd200r2	3,37	7,70	1,01E-05	6,29	1,57E-08
Cd200r4	4,52	3,83	3,65E-07	3,50	1,15E-08
Cd244	5,74	2,95	2,26E-07	2,82	3,19E-08
Cd38	4,93	2,30	2,51E-06	1,81	1,51E-06
Cdk6	6,17	2,30	7,16E-08	2,05	4,06E-08
Chn2	4,44	4,08	4,45E-05	2,97	5,99E-07
Chst12	4,78	2,28	5,90E-07	2,71	1,11E-08
Cmah	5,17	-3,71	1,43E-05	-4,00	3,96E-06
Ctla4	5,12	1,45	2,22E-03	2,43	4,79E-06
Ctsc	6,57	1,84	1,37E-06	2,02	9,83E-08
Cxcr4	4,10	-3,35	3,01E-07	-2,70	5,58E-06
Dapk2	5,04	2,87	3,66E-07	2,44	7,09E-08
Dnajc15	5,32	-2,30	3,30E-08	-1,70	1,24E-06
Dst	1,09	5,01	2,31E-05	4,45	4,03E-06
Ehd3	5,20	-1,95	6,14E-04	-2,57	9,04E-06
Eif4enif1	3,98	1,60	4,89E-04	2,03	7,95E-06
Emb	6,64	-4,21	7,32E-08	-3,70	3,56E-07

<i>Enpp1</i>	2,90	3,24	6,37E-05	2,82	4,98E-06
<i>Entpd1</i>	4,91	2,49	9,68E-06	2,61	3,65E-07
<i>Epcam</i>	3,37	3,59	5,65E-05	3,20	1,50E-06
<i>Fgl2</i>	6,10	2,59	3,31E-06	1,57	1,04E-04
<i>Frmd4a</i>	3,18	2,81	4,45E-05	3,04	9,41E-06
<i>Gab3</i>	5,24	-2,68	4,13E-08	-2,37	1,13E-07
<i>Gabarapl1</i>	3,79	2,29	1,59E-05	2,42	2,78E-07
<i>Gadd45b</i>	6,21	-2,49	3,01E-07	-1,71	3,90E-05
<i>Glpr2</i>	6,88	-2,25	6,99E-06	-2,27	4,02E-06
<i>Gm26809</i>	5,98	-2,49	5,90E-07	-2,67	1,13E-07
<i>Gm45837</i>	6,51	-1,91	2,61E-06	-2,34	6,01E-08
<i>Gm4956</i>	2,84	3,41	4,39E-06	3,72	4,95E-07
<i>Gm5424</i>	3,72	-2,53	9,00E-06	-2,28	2,20E-05
<i>Gm5864</i>	2,29	-4,46	1,78E-06	-4,03	7,91E-06
<i>Gm9794</i>	8,07	-2,00	2,08E-07	-1,26	7,39E-05
<i>Gpd2</i>	5,38	2,03	1,47E-05	2,56	1,35E-07
<i>Gpr18</i>	6,03	-2,38	4,68E-08	-1,81	1,26E-06
<i>Gpr183</i>	7,00	-2,54	2,96E-08	-2,04	3,26E-07
<i>Gramd3</i>	7,20	-3,69	7,58E-08	-3,62	6,00E-08
<i>Gramd4</i>	4,14	-1,89	4,89E-04	-2,47	6,04E-06
<i>Gxylt1</i>	3,41	2,08	1,51E-04	2,27	6,68E-06
<i>Gzma</i>	7,67	3,64	2,87E-06	3,05	5,89E-06
<i>Gzmm</i>	3,54	-4,90	3,66E-06	-4,80	5,46E-06
<i>Hip1</i>	4,81	2,06	7,88E-06	1,70	4,04E-06
<i>Hist1h1c</i>	5,98	1,81	1,27E-05	2,59	4,44E-08
<i>Hmgn1</i>	5,37	-2,11	1,36E-08	-1,67	1,20E-07
<i>Hs3st3b1</i>	4,13	-2,18	5,90E-07	-2,35	7,34E-08
<i>Ikzf3</i>	7,15	2,20	2,14E-07	1,15	1,38E-04
<i>Il18r1</i>	5,10	-2,30	4,35E-06	-2,52	5,85E-07
<i>Il18rap</i>	5,45	-2,13	8,67E-05	-2,56	4,03E-06
<i>Il4ra</i>	7,44	-1,82	3,31E-07	-2,19	9,43E-09
<i>Il6ra</i>	4,24	-3,96	2,01E-06	-4,16	8,50E-07
<i>Il7r</i>	5,84	-4,13	3,63E-08	-3,94	3,88E-08
<i>Illdr1</i>	4,01	3,31	9,06E-06	2,47	1,53E-06
<i>Irf8</i>	5,77	2,48	5,06E-06	2,03	5,80E-06
<i>Itih5</i>	2,86	7,48	5,64E-07	4,46	4,96E-09
<i>Kbtbd11</i>	4,83	-3,36	1,93E-06	-3,92	1,13E-07
<i>Klf2</i>	4,72	-2,31	1,38E-06	-1,77	4,13E-05
<i>Klf3</i>	5,30	-4,17	9,87E-08	-4,03	1,14E-07
<i>Klrc1</i>	6,38	2,81	3,40E-06	2,27	6,37E-06
<i>Lag3</i>	5,60	5,25	5,68E-08	4,78	1,49E-09
<i>Lat2</i>	4,05	3,76	5,52E-05	3,05	1,26E-06
<i>Ldlrap1</i>	4,59	-2,61	4,39E-06	-2,57	3,93E-06
<i>Lef1</i>	5,40	-4,14	7,16E-08	-3,96	9,68E-08
<i>Litaf</i>	5,81	2,71	5,17E-07	2,79	3,39E-08
<i>Lrmp</i>	6,51	2,27	7,02E-09	2,18	1,49E-09

<i>Ly6c2</i>	7,92	-4,74	7,02E-09	-4,45	8,41E-09
<i>Map3k8</i>	4,57	-2,68	1,67E-07	-2,62	1,13E-07
<i>Mmd</i>	4,40	2,65	7,75E-07	2,66	1,77E-08
<i>Myo1e</i>	3,07	4,31	3,61E-07	3,29	1,77E-08
<i>Ncf1</i>	3,80	2,42	3,57E-04	2,89	7,15E-06
<i>Nfkbia</i>	9,61	-2,43	5,41E-09	-1,66	3,26E-07
<i>Nfkbiz</i>	6,91	-2,10	2,70E-08	-2,03	1,12E-08
<i>Nme2</i>	6,51	-2,08	5,55E-08	-1,56	1,90E-06
<i>Nr4a1</i>	7,84	-2,03	3,13E-06	-1,41	2,53E-04
<i>Nr4a2</i>	7,16	2,74	8,03E-07	3,18	3,39E-08
<i>Nrp1</i>	4,13	4,09	1,65E-05	4,12	1,08E-06
<i>Nsg2</i>	3,53	-5,35	1,07E-06	-5,34	1,20E-06
<i>Osbp13</i>	5,96	2,95	4,57E-07	2,28	4,44E-07
<i>Osgin1</i>	5,61	2,44	9,53E-05	2,84	3,64E-06
<i>Pdcd1</i>	5,32	6,41	1,43E-08	6,38	2,52E-10
<i>Pdlim1</i>	4,84	-4,19	3,26E-08	-3,75	9,67E-08
<i>Pdzd2</i>	2,77	3,99	2,32E-06	3,94	2,78E-07
<i>Pik3ip1</i>	5,52	-2,99	1,07E-06	-2,68	3,97E-06
<i>Pitpnm2</i>	4,64	2,41	4,81E-05	2,10	5,61E-06
<i>Plac8</i>	4,79	-3,74	4,05E-08	-3,40	8,13E-08
<i>Plek</i>	6,11	2,41	5,82E-06	1,57	1,04E-04
<i>Plekhb2</i>	5,75	2,19	4,68E-06	1,17	4,15E-04
<i>Prdm1</i>	4,43	1,45	6,91E-04	2,16	5,23E-06
<i>Prss12</i>	2,30	-7,05	3,13E-06	-6,87	5,49E-06
<i>Ptger2</i>	2,03	4,68	2,77E-05	3,08	5,55E-06
<i>Ptpn11</i>	5,17	2,72	2,96E-08	2,40	2,76E-09
<i>Rabgap1l</i>	6,77	1,95	3,31E-07	2,02	4,80E-08
<i>Rere</i>	3,85	-2,23	6,46E-07	-1,91	4,04E-06
<i>Rgs10</i>	5,10	-4,01	1,77E-08	-3,34	1,13E-07
<i>Rgs16</i>	3,98	4,23	1,41E-04	2,98	3,45E-06
<i>S1pr1</i>	5,22	-3,83	3,31E-07	-3,73	3,26E-07
<i>Samsn1</i>	4,77	2,03	4,77E-05	2,25	1,84E-06
<i>Satb1</i>	6,00	-4,32	5,41E-09	-4,50	1,49E-09
<i>Sdcbp2</i>	4,12	2,60	1,28E-07	3,52	2,57E-09
<i>Sell</i>	7,14	-4,22	7,02E-09	-4,02	5,35E-09
<i>Serpinb6a</i>	5,09	2,49	5,94E-07	2,41	9,07E-08
<i>Setbp1</i>	3,11	3,61	1,79E-05	3,63	5,38E-06
<i>Sh3bp5</i>	3,86	-4,33	2,61E-06	-4,55	1,24E-06
<i>Sidt1</i>	6,36	-2,95	3,89E-07	-3,25	5,03E-08
<i>Spry2</i>	2,53	2,91	2,55E-05	2,70	2,07E-06
<i>Srbd1</i>	4,93	2,96	5,77E-08	2,47	1,74E-08
<i>Srgap3</i>	3,58	4,37	8,14E-06	5,24	9,03E-07
<i>Ssh2</i>	7,08	-2,22	8,15E-07	-2,31	2,67E-07
<i>Swap70</i>	2,95	3,51	9,37E-06	3,67	1,61E-06
<i>Tagln2</i>	7,18	-3,13	5,41E-09	-2,65	1,99E-08
<i>Tanc1</i>	2,49	-3,77	8,44E-06	-4,42	5,18E-07

<i>Tbc1d4</i>	1,77	6,24	4,90E-05	3,97	8,63E-06
<i>Tcf7</i>	6,37	-3,20	4,18E-07	-3,29	1,55E-07
<i>Tcrg-C2</i>	6,03	3,24	5,41E-09	3,25	3,92E-10
<i>Tdrp</i>	3,41	-5,42	1,05E-07	-5,21	1,65E-07
<i>Tgtp1</i>	5,45	-3,23	7,55E-07	-3,31	3,26E-07
<i>Tigit</i>	6,17	2,59	1,42E-07	3,40	1,49E-09
<i>Tmem135</i>	4,17	2,33	9,72E-06	1,92	2,25E-06
<i>Tnfrsf10b</i>	1,07	-5,81	5,38E-06	-5,07	4,24E-05
<i>Tnfrsf1b</i>	6,44	2,10	5,16E-07	1,92	2,78E-07
<i>Tnfrsf26</i>	4,92	-3,19	7,80E-07	-3,22	4,44E-07
<i>Tnfrsf9</i>	4,23	5,02	4,93E-07	4,90	1,12E-08
<i>Tox</i>	6,12	3,95	4,34E-12	3,59	1,76E-13
<i>Trem12</i>	2,96	-6,12	1,57E-06	-5,75	4,61E-06
<i>Trgv2</i>	3,37	3,39	5,83E-08	3,31	1,49E-09
<i>Twsg1</i>	1,44	5,07	1,23E-05	4,92	7,29E-07
<i>Ubash3b</i>	5,51	2,29	4,13E-08	2,42	1,99E-09
<i>Vipr1</i>	1,57	-5,69	1,44E-05	-5,84	8,67E-06
<i>Wls</i>	4,67	2,46	1,53E-06	1,70	3,16E-06
<i>Xdh</i>	5,06	3,41	4,18E-07	2,81	7,34E-08

Bibliographie

- Akane, K., Kojima, S., Mak, T.W., Shiku, H., and Suzuki, H. (2016). CD8⁺ CD122⁺ CD49d^{low} regulatory T cells maintain T-cell homeostasis by killing activated T cells via Fas/FasL-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* *113*, 2460–2465.
- Akbarpour, M., Goudy, K.S., Cantore, A., Russo, F., Sanvito, F., Naldini, L., Annoni, A., and Roncarolo, M.G. (2015). Insulin B chain 9–23 gene transfer to hepatocytes protects from type 1 diabetes by inducing Ag-specific FoxP3⁺ T_{regs}. *Sci. Transl. Med.* *7*, 289ra81-289ra81.
- Alfei, F., Kanev, K., Hofmann, M., Wu, M., Ghoneim, H.E., Roelli, P., Utzschneider, D.T., von Hoesslin, M., Cullen, J.G., Fan, Y., et al. (2019). TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature* *571*, 265–269.
- Aliahmad, P., Seksenyan, A., and Kaye, J. (2012). The many roles of TOX in the immune system. *Current Opinion in Immunology* *24*, 173–177.
- Allison, T.L. (2016). Immunosuppressive Therapy in Transplantation. *Nursing Clinics of North America* *51*, 107–120.
- Ando, K., Guidotti, L.G., Cerny, A., Ishikawa, T., and Chisari, F.V. (1994). CTL access to tissue antigen is restricted in vivo. *J. Immunol.* *153*, 482–488.
- Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.McD. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* *149*, 754–755.
- Atif, M., Conti, F., Gorochoy, G., Oo, Y.H., and Miyara, M. (2020). Regulatory T cells in solid organ transplantation. *Clin Transl Immunol* *9*.
- Bacchetta, R., Barzaghi, F., and Roncarolo, M.-G. (2018). From IPEX syndrome to *FOXP3* mutation: a lesson on immune dysregulation: IPEX syndrome and *FOXP3*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* *1417*, 5–22.
- Bainbridge, M.N., Warren, R.L., Hirst, M., Romanuik, T., Zeng, T., Go, A., Delaney, A., Griffith, M., Hickenbotham, M., Magrini, V., et al. (2006). Analysis of the prostate cancer cell line LNCaP transcriptome using a sequencing-by-synthesis approach. *BMC Genomics* *7*, 246.
- Balam, S., Romero, J.F., Bongfen, S.E., Guillaume, P., and Corradin, G. (2012). CSP—A Model for In Vivo Presentation of Plasmodium berghei Sporozoite Antigens by Hepatocytes. *PLoS ONE* *7*, e51875.
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* *439*, 682–687.
- Barnes, C., Scheideler, O., and Schaffer, D. (2019). Engineering the AAV capsid to evade immune responses. *Current Opinion in Biotechnology* *60*, 99–103.
- Barshes, N.R., Goodpastor, S.E., and Goss, J.A. (2004). Pharmacologic immunosuppression. *Front. Biosci.* *9*, 411–420.
- Benítez, C., Londoño, M.-C., Miquel, R., Manzia, T.-M., Abalde, J.G., Lozano, J.-J., Martínez-Llordella, M., López, M., Angelico, R., Bohne, F., et al. (2013). Prospective multicenter clinical trial of

immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients: *Hepatology*. *Hepatology* 58, 1824–1835.

Berg, R.D. (1999). Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv. Exp. Med. Biol.* 473, 11–30.

Bernuzzi, F., Fenoglio, D., Battaglia, F., Fravega, M., Gershwin, M.E., Indiveri, F., Ansari, A.A., Podda, M., Invernizzi, P., and Filaci, G. (2010). Phenotypical and functional alterations of CD8 regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 35, 176–180.

Bertolino, P., Trescol-Biémont, M.C., and Rabourdin-Combe, C. (1998). Hepatocytes induce functional activation of naive CD8⁺ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur. J. Immunol.* 28, 221–236.

Bertolino, P., Bowen, D.G., McCaughan, G.W., and Fazekas de St. Groth, B. (2001). Antigen-Specific Primary Activation of CD8⁺ T Cells Within the Liver. *J Immunol* 166, 5430–5438.

Bettini, M., and Vignali, D.A. (2009). Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 21, 612–618.

Bézie, S., Picarda, E., Ossart, J., Tesson, L., Usal, C., Renaudin, K., Anegon, I., and Guillonneau, C. (2015). IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *Journal of Clinical Investigation* 125, 3952–3964.

Bézie, S., Anegon, I., and Guillonneau, C. (2018a). Advances on CD8⁺ Treg Cells and Their Potential in Transplantation: *Transplantation* 102, 1467–1478.

Bézie, S., Meistermann, D., Boucault, L., Kilens, S., Zoppi, J., Autrusseau, E., Donnart, A., Nerrière-Daguin, V., Bellier-Waast, F., Charpentier, E., et al. (2018b). Ex Vivo Expanded Human Non-Cytotoxic CD8⁺CD45R^{low}/– Tregs Efficiently Delay Skin Graft Rejection and GVHD in Humanized Mice. *Front. Immunol.* 8, 2014.

Bissell, D.M., Wang, S.S., Jarnagin, W.R., and Roll, F.J. (1995). Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 96, 447–455.

Bohne, F., Londono, M.-C., Benitez, C., Miquel, R., Martinez-Llordella, M., Russo, C., Ortiz, C., Bonaccorsi-Riani, E., Brander, C., Bauer, T., et al. (2014). HCV-Induced Immune Responses Influence the Development of Operational Tolerance After Liver Transplantation in Humans. *Science Translational Medicine* 6, 242ra81-242ra81.

Boor, P.P.C., Metselaar, H.J., Jonge, S. de, Mancham, S., van der Laan, L.J.W., and Kwekkeboom, J. (2011). Human plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺LAG-3⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ regulatory T cells that suppress allo-reactive memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 1663–1674.

Borrego, F., Masilamani, M., Marusina, A.I., Tang, X., and Coligan, J.E. (2006). The CD94/NKG2 Family of Receptors: From Molecules and Cells to Clinical Relevance. *IR* 35, 263–278.

Boudakov, I., Liu, J., Fan, N., Gulay, P., Wong, K., and Gorczynski, R.M. (2007). Mice Lacking CD200R1 Show Absence of Suppression of Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor- α and Mixed Leukocyte Culture Responses by CD200: *Transplantation* 84, 251–257.

- Brändle, D., Bilsborough, J., Rüllicke, T., Uyttenhove, C., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. (1998). The shared tumor-specific antigen encoded by mouse gene P1A is a target not only for cytolytic T lymphocytes but also for tumor rejection. *Eur. J. Immunol.* *28*, 4010–4019.
- Burger, C., Gorbatyuk, O.S., Velardo, M.J., Peden, C.S., Williams, P., Zolotukhin, S., Reier, P.J., Mandel, R.J., and Muzyczka, N. (2004). Recombinant AAV Viral Vectors Pseudotyped with Viral Capsids from Serotypes 1, 2, and 5 Display Differential Efficiency and Cell Tropism after Delivery to Different Regions of the Central Nervous System. *Molecular Therapy* *10*, 302–317.
- Cai, J., and Terasaki, P.I. (2005). Human Leukocyte Antigen Antibodies for Monitoring Transplant Patients. *Surg Today* *35*, 605–612.
- Callery, M.P., Kamei, T., and Flye, M.W. (1989). The effect of portacaval shunt on delayed-hypersensitivity responses following antigen feeding. *Journal of Surgical Research* *46*, 391–394.
- Calne, R.Y., Sells, R.A., Pena, J.R., Davis, D.R., Millard, P.R., Herbertson, B.M., Binns, R.M., and Davies, D.A. (1969). Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* *223*, 472–476.
- Carambia, A., Freund, B., Schwinge, D., Heine, M., Laschtowitz, A., Huber, S., Wraith, D.C., Korn, T., Schramm, C., Lohse, A.W., et al. (2014). TGF- β -dependent induction of CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *Journal of Hepatology* *61*, 594–599.
- Chase, M.W. (1946). Inhibition of Experimental Drug Allergy by Prior Feeding of the Sensitizing Agent. *Experimental Biology and Medicine* *61*, 257–259.
- Chattopadhyay, S., O'Rourke, J., and Cone, R.E. (2008). Implication for the CD94/NKG2A-Qa-1 system in the generation and function of ocular-induced splenic CD8+ regulatory T cells. *International Immunology* *20*, 509–516.
- Chava, S.P., Singh, B., Stangou, A., Battula, N., Bowles, M., O'Grady, J., Rela, M., and Heaton, N.D. (2009). Simultaneous combined liver and kidney transplantation: a single center experience: Combined liver and kidney transplantation. *Clinical Transplantation* *24*, E62–E68.
- Chen, J., Deng, X., Liu, Y., Tan, Q., Huang, G., Che, Q., Guo, J., and Su, Z. (2020). Kupffer Cells in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Friend or Foe? *Int. J. Biol. Sci.* *16*, 2367–2378.
- Chihara, N., Madi, A., Karwacz, K., Awasthi, A., and Kuchroo, V.K. (2016). Differentiation and Characterization of Tr1 Cells. *Current Protocols in Immunology* *113*.
- Choi, S., and Schwartz, R.H. (2007). Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. *Seminars in Immunology* *19*, 140–152.
- Churlaud, G., Pitoiset, F., Jebbawi, F., Lorenzon, R., Bellier, B., Rosenzweig, M., and Klatzmann, D. (2015). Human and Mouse CD8+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Front. Immunol.* *6*.
- Claus, C., Riether, C., Schurch, C., Matter, M.S., Hilmenyuk, T., and Ochsenbein, A.F. (2012). CD27 Signaling Increases the Frequency of Regulatory T Cells and Promotes Tumor Growth. *Cancer Research* *72*, 3664–3676.
- Coutinho, A.E., and Chapman, K.E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology* *335*, 2–13.

- Crispe, I.N. (2009). The Liver as a Lymphoid Organ. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 147–163.
- Cunningham, E.C., Tay, S.S., Wang, C., Rtshiladze, M., Wang, Z.Z., McGuffog, C., Cubitt, J., McCaughan, G.W., Alexander, I.E., Bertolino, P., et al. (2013). Gene Therapy for Tolerance: High-Level Expression of Donor Major Histocompatibility Complex in the Liver Overcomes Naive and Memory Alloresponses to Skin Grafts. *Transplantation Journal* *95*, 70–77.
- Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2009). Natural and Adaptive Foxp3⁺ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity* *30*, 626–635.
- Dai, H., Wan, N., Zhang, S., Moore, Y., Wan, F., and Dai, Z. (2010). Cutting Edge: Programmed Death-1 Defines CD8⁺ CD122⁺ T Cells as Regulatory versus Memory T Cells. *J.I.* *185*, 803–807.
- Dai, X., Xue, J., Hu, J., Yang, S., Chen, G.G., Lai, P.B.S., Yu, C., Zeng, C., Fang, X., Pan, X., et al. (2017). Positive Expression of Programmed Death Ligand 1 in Peritumoral Liver Tissue is Associated with Poor Survival after Curative Resection of Hepatocellular Carcinoma. *Translational Oncology* *10*, 511–517.
- Dai, Z., Zhang, S., Xie, Q., Wu, S., Su, J., Li, S., Xu, Y., and Li, X.C. (2014). Natural CD8⁺CD122⁺ T Cells Are More Potent in Suppression of Allograft Rejection Than CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells: CD8⁺CD122⁺ Cells Are Supreme T Suppressors. *American Journal of Transplantation* *14*, 39–48.
- Davies, J.D., O'Connor, E., Hall, D., Krahl, T., Trotter, J., and Sarvetnick, N. (1999). CD4⁺ CD45RB low-density cells from untreated mice prevent acute allograft rejection. *J. Immunol.* *163*, 5353–5357.
- Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., et al. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* *443*, 350–354.
- Den Uijl, I.E.M., Fischer, K., Van Der Bom, J.G., Grobbee, D.E., Rosendaal, F.R., and Plug, I. (2011). Analysis of low frequency bleeding data: the association of joint bleeds according to baseline FVIII activity levels: ANALYSIS OF BLEEDING DATA IN HAEMOPHILIA. *Haemophilia* *17*, 41–44.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* *2*, 1032–1039.
- Diehl, L., Schurich, A., Grochtmann, R., Hegenbarth, S., Chen, L., and Knolle, P.A. (2007). Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8⁺ T cell tolerance. *Hepatology* *47*, 296–305.
- Do, J., Visperas, A., Sanogo, Y.O., Bechtel, J.J., Dvorina, N., Kim, S., Jang, E., Stohlman, S.A., Shen, B., Fairchild, R.L., et al. (2016). An IL-27/Lag3 axis enhances Foxp3⁺ regulatory T cell-suppressive function and therapeutic efficacy. *Mucosal Immunol* *9*, 137–145.
- Do, J., Kim, D., Kim, S., Valentin-Torres, A., Dvorina, N., Jang, E., Nagarajavel, V., DeSilva, T.M., Li, X., Ting, A.H., et al. (2017). Treg-specific IL-27R α deletion uncovers a key role for IL-27 in Treg function to control autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *114*, 10190–10195.
- Dobrzynski, E., Fitzgerald, J.C., Cao, O., Mingozzi, F., Wang, L., and Herzog, R.W. (2006). Prevention of cytotoxic T lymphocyte responses to factor IX-expressing hepatocytes by gene transfer-induced regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 4592–4597.

- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., Flies, D.B., van Deursen, J.M.A., and Chen, L. (2004). B7-H1 Determines Accumulation and Deletion of Intrahepatic CD8⁺ T Lymphocytes. *Immunity* 20, 327–336.
- Duggleby, R.C., Shaw, T.N.F., Jarvis, L.B., Kaur, G., and Hill Gaston, J.S. (2007). CD27 expression discriminates between regulatory and non-regulatory cells after expansion of human peripheral blood CD4⁺ CD25⁺ cells: CD27 expression by regulatory T cells. *Immunology* 121, 129–139.
- Dunham, R.M., Thapa, M., Velazquez, V.M., Elrod, E.J., Denning, T.L., Pulendran, B., and Grakoui, A. (2013). Hepatic Stellate Cells Preferentially Induce Foxp3⁺ Regulatory T Cells by Production of Retinoic Acid. *J.I.* 190, 2009–2016.
- Ejrnaes, M., Filippi, C.M., Martinic, M.M., Ling, E.M., Togher, L.M., Crotty, S., and von Herrath, M.G. (2006). Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *Journal of Experimental Medicine* 203, 2461–2472.
- Faust, N., Varas, F., Kelly, L.M., Heck, S., and Graf, T. (2000). Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *96*, 8.
- Feng, S., Ekong, U.D., Lobritto, S.J., Demetris, A.J., Roberts, J.P., Rosenthal, P., Alonso, E.M., Philogene, M.C., Ikle, D., Poole, K.M., et al. (2012). Complete Immunosuppression Withdrawal and Subsequent Allograft Function Among Pediatric Recipients of Parental Living Donor Liver Transplants. *JAMA* 307.
- Fishman, J.A. (2017). Infection in Organ Transplantation. *Am J Transplant* 17, 856–879.
- Flippe, L., Bézie, S., Anegon, I., and Guillonneau, C. (2019). Future prospects for CD8⁺ regulatory T cells in immune tolerance. *Immunol Rev* 292, 209–224.
- Flora Ascione, Sergio Caserta, Roberto Perris, and Stefano Guido (2014). Investigation of cell dynamics in vitro by time lapse microscopy and image analysis. *Chemical Engineering Transactions* 38, 517–522.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330–336.
- Franchini, M., and Mannucci, P. (2012). Past, present and future of hemophilia: a narrative review. *Orphanet J Rare Dis* 7, 24.
- Fujita, S., Seino, K., Sato, K., Sato, Y., Eizumi, K., Yamashita, N., Taniguchi, M., and Sato, K. (2006). Regulatory dendritic cells act as regulators of acute lethal systemic inflammatory response. *Blood* 107, 3656–3664.
- Gallimore, A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A.C., Plückthun, A., Elliott, T., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. (1998). Induction and Exhaustion of Lymphocytic Choriomeningitis Virus-specific Cytotoxic T Lymphocytes Visualized Using Soluble Tetrameric Major Histocompatibility Complex Class I–Peptide Complexes. *Journal of Experimental Medicine* 187, 1383–1393.
- Garín, M.I., Chu, C.-C., Golshayan, D., Cernuda-Morollón, E., Wait, R., and Lechler, R.I. (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells. *Blood* 109, 2058–2065.

- de la Garza, R.G., Sarobe, P., Merino, J., Lasarte, J.J., D'Avola, D., Belsue, V., Delgado, J.A., Silva, L., Iñarrairaegui, M., Sangro, B., et al. (2013). Trial of complete weaning from immunosuppression for liver transplant recipients: Factors predictive of tolerance: Tolerance in Lt. *Liver Transpl* *19*, 937–944.
- Gauttier, V., Judor, J.-P., Le Guen, V., Cany, J., Ferry, N., and Conchon, S. (2014). Agonistic anti-CD137 antibody treatment leads to antitumor response in mice with liver cancer: Agonistic anti-CD137 antibody for HCC immunotherapy. *Int. J. Cancer* *135*, 2857–2867.
- Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* *18*, 723–737.
- Godfrey, D.I., Koay, H.-F., McCluskey, J., and Gherardin, N.A. (2019). The biology and functional importance of MAIT cells. *Nat Immunol* *20*, 1110–1128.
- Godkin, A., Jeanguet, N., Thursz, M., Openshaw, P., and Thomas, H. (2001). Characterization of novel HLA-DR11-restricted HCV epitopes reveals both qualitative and quantitative differences in HCV-specific CD4⁺ T cell responses in chronically infected and non-viremic patients. *Eur. J. Immunol.* *31*, 1438–1446.
- Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4⁺ CD25⁺ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *J Immunol* *174*, 1783–1786.
- Graziadei, I.W., Schwaighofer, H., Koch, R., Nachbaur, K., Koenigsrainer, A., Margreiter, R., and Vogel, W. (2006). Long-term outcome of endoscopic treatment of biliary strictures after liver transplantation. *Liver Transpl* *12*, 718–725.
- Gruener, N.H., Lechner, F., Jung, M.-C., Diepolder, H., Gerlach, T., Lauer, G., Walker, B., Sullivan, J., Phillips, R., Pape, G.R., et al. (2001). Sustained Dysfunction of Antiviral CD8 α T Lymphocytes after Infection with Hepatitis C Virus. *J. VIROL.* *75*, 9.
- Guidotti, L.G., Inverso, D., Sironi, L., Di Lucia, P., Fioravanti, J., Ganzer, L., Fiocchi, A., Vacca, M., Aiolfi, R., Sammicheli, S., et al. (2015). Immunosurveillance of the Liver by Intravascular Effector CD8⁺ T Cells. *Cell* *161*, 486–500.
- Guillonnet, C., Hill, M., Hubert, F.-X., Chiffoleau, E., Hervé, C., Li, X.-L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Ménoret, S., et al. (2007). CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8⁺CD45RClow T cells, IFN- γ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* *117*, 1096–1106.
- Harrison, J.H., Merrill, J.P., and Murray, J.E. (1956). Renal homotransplantation in identical twins. *Surg Forum* *6*, 432–436.
- He, H., Stone, J.R., and Perkins, D.L. (2002). Analysis of robust innate immune response after transplantation in the absence of adaptive immunity1: *Transplantation* *73*, 853–861.
- He, H., Stone, J.R., and Perkins, D.L. (2003). Analysis of differential immune responses induced by innate and adaptive immunity following transplantation. *Immunology* *109*, 185–196.
- Heinrichs, J., Li, J., Nguyen, H., Wu, Y., Bastian, D., Daethanasanmak, A., Sofi, M.-H., Schutt, S., Liu, C., Jin, J., et al. (2016). CD8⁺ Tregs promote GVHD prevention and overcome the impaired GVL effect mediated by CD4⁺ Tregs in mice. *OncolImmunology* *5*, e1146842.

- Herzog, R.W., Mount, J.D., Arruda, V.R., High, K.A., and Lothrop, C.D. (2001). Muscle-Directed Gene Transfer and Transient Immune Suppression Result in Sustained Partial Correction of Canine Hemophilia B Caused by a Null Mutation. *Molecular Therapy* 4, 192–200.
- Heymann, F., Peusquens, J., Ludwig-Portugall, I., Kohlhepp, M., Ergen, C., Niemietz, P., Martin, C., van Rooijen, N., Ochando, J.C., Randolph, G.J., et al. (2015). Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells: HEYMANN ET AL. *HEPATOLOGY*, Month 2015. *Hepatology* 62, 279–291.
- Hintzen, R.Q., Lens, S.M., Lammers, K., Kuiper, H., Beckmann, M.P., and van Lier, R.A. (1995). Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation. *J. Immunol.* 154, 2612–2623.
- Hippen, K.L., Merkel, S.C., Schirm, D.K., Sieben, C.M., Sumstad, D., Kadidlo, D.M., McKenna, D.H., Bromberg, J.S., Levine, B.L., Riley, J.L., et al. (2011). Massive ex Vivo Expansion of Human Natural Regulatory T Cells (Tregs) with Minimal Loss of in Vivo Functional Activity. *Science Translational Medicine* 3, 83ra41-83ra41.
- Holz, L.E., Benseler, V., Bowen, D.G., Bouillet, P., Strasser, A., O'Reilly, L., d'Avigdor, W.M.H., Bishop, A.G., McCaughan, G.W., and Bertolino, P. (2008). Intrahepatic Murine CD8 T-Cell Activation Associates With a Distinct Phenotype Leading to Bim-Dependent Death. *Gastroenterology* 135, 989–997.
- Hori, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.
- Hu, D., Ikizawa, K., Lu, L., Sanchirico, M.E., Shinohara, M.L., and Cantor, H. (2004). Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat Immunol* 5, 516–523.
- Iwai, Y., Terawaki, S., Ikegawa, M., Okazaki, T., and Honjo, T. (2003). PD-1 Inhibits Antiviral Immunity at the Effector Phase in the Liver. *Journal of Experimental Medicine* 198, 39–50.
- Jacquet, A., Francois, H., Frangie, C., Ahmad, L., Charpentier, B., and Durrbach, A. (2008). Prevention of calcineurin inhibitor nephrotoxicity in renal transplantation. *Transplant Immunology* 20, 29–31.
- 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.
- Jarvis, L.B., Goodall, J.C., and Gaston, J.S.H. (2008). Human leukocyte antigen class I-restricted immunosuppression by human CD8+ regulatory T cells requires CTLA-4-mediated interaction with dendritic cells. *Human Immunology* 69, 687–695.
- Jenne, C.N., and Kubes, P. (2013). Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 14, 996–1006.
- Jiang, H., and Chess, L. (2000). The Specific Regulation Of Immune Responses By CD8 + T Cells Restricted By The MHC Class Ib Molecule, Qa-1. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 185–216.
- Jiang, G., Yang, H.-R., Wang, L., Wildey, G.M., Fung, J., Qian, S., and Lu, L. (2008). Hepatic Stellate Cells Preferentially Expand Allogeneic CD4+CD25+FoxP3+ Regulatory T Cells in an IL-2-Dependent Manner: *Transplantation* 86, 1492–1502.

- Jiyad, Z., Olsen, C.M., Burke, M.T., Isbel, N.M., and Green, A.C. (2016). Azathioprine and Risk of Skin Cancer in Organ Transplant Recipients: Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Transplant* *16*, 3490–3503.
- 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.
- Joseph, N., Reicher, B., and Barda-Saad, M. (2014). The calcium feedback loop and T cell activation: How cytoskeleton networks control intracellular calcium flux. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* *1838*, 557–568.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *MOL. CELL. BIOL.* *20*, 9.
- Kalekar, L.A., Schmiel, S.E., Nandiwada, S.L., Lam, W.Y., Barsness, L.O., Zhang, N., Stritesky, G.L., Malhotra, D., Pauken, K.E., Linehan, J.L., et al. (2016). CD4+ T cell anergy prevents autoimmunity and generates regulatory T cell precursors. *Nat Immunol* *17*, 304–314.
- Kamada, N. (1985). A description of cuff techniques for renal transplantation in the rat. Use in studies of tolerance induction during combined liver grafting. *Transplantation* *39*, 93–95.
- Kamada, N., and Wight, D.G. (1984). Antigen-specific immunosuppression induced by liver transplantation in the rat. *Transplantation* *38*, 217–221.
- Kamada, N., Brons, G., and Davies, H.S. (1980). Fully allogeneic liver grafting in rats induces a state of systemic nonreactivity to donor transplantation antigens. *Transplantation* *29*, 429–431.
- Khan, O., Giles, J.R., McDonald, S., Manne, S., Ngiow, S.F., Patel, K.P., Werner, M.T., Huang, A.C., Alexander, K.A., Wu, J.E., et al. (2019). TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. *Nature* *571*, 211–218.
- Kim, H.-J., and Cantor, H. (2011). Regulation of self-tolerance by Qa-1-restricted CD8+ regulatory T cells. *Semin Immunol* *23*, 446–452.
- Kloc, M., and Ghobrial, R. (2014). Chronic allograft rejection: A significant hurdle to transplant success. *Burn Trauma* *2*, 3.
- Knolle, P., Schlaak, J., Uhrig, A., Kempf, P., Meyer zum Büschenfelde, K.H., and Gerken, G. (1995). Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J. Hepatol.* *22*, 226–229.
- Kretz-Rommel, A., Qin, F., Dakappagari, N., Cofield, R., Faas, S.J., and Bowdish, K.S. (2008). Blockade of CD200 in the Presence or Absence of Antibody Effector Function: Implications for Anti-CD200 Therapy. *J Immunol* *180*, 699–705.
- Kruse, N., Neumann, K., Schrage, A., Derkow, K., Schott, E., Erben, U., Kühl, A., Loddenkemper, C., Zeitz, M., Hamann, A., et al. (2009). Priming of CD4+ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25^{low} forkhead box protein 3⁻ regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatology* *50*, 1904–1913.
- Kubes, P., and Jenne, C. (2018). Immune Responses in the Liver. *Annu. Rev. Immunol.* *36*, 247–277.

Kuss, R., and Legrain, M. (1961). Homologous transplantations of the human kidney. Experience with four patients. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 7, 116–124.

Le Guen, V., Judor, J.-P., Boeffard, F., Gauttier, V., Ferry, N., Soullou, J.-P., Brouard, S., and Conchon, S. (2017). Alloantigen gene transfer to hepatocytes promotes tolerance to pancreatic islet graft by inducing CD8 + regulatory T cells. *Journal of Hepatology* 66, 765–777.

LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570–1580.

Létourneau, S., Krieg, C., Pantaleo, G., and Boyman, O. (2009). IL-2– and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123, 758–762.

Li, L., Patsoukis, N., Petkova, V., and Boussiotis, V.A. (2012). Runx1 and Runx3 Are Involved in the Generation and Function of Highly Suppressive IL-17-Producing T Regulatory Cells. *PLoS ONE* 7, e45115.

Li, W., Carper, K., Liang, Y., Zheng, X.X., Kuhr, C.S., Reyes, J.D., Perkins, D.L., Thomson, A.W., and Perkins, J.D. (2006). Anti-CD25 mAb Administration Prevents Spontaneous Liver Transplant Tolerance. *Transplantation Proceedings* 38, 3207–3208.

Li, Y., Zhao, X., Cheng, D., Haga, H., Tsuruyama, T., Wood, K., Sakaguchi, S., Tanaka, K., Uemoto, S., and Koshiba, T. (2008). The Presence of Foxp3 Expressing T Cells Within Grafts of Tolerant Human Liver Transplant Recipients: *Transplantation* 86, 1837–1843.

Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., et al. (2008). Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II. *J Immunol* 180, 5916–5926.

Lindquist, R.L., Shakhar, G., Dudziak, D., Wardemann, H., Eisenreich, T., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2004). Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol* 5, 1243–1250.

Liu, Q., Zheng, H., Chen, X., Peng, Y., Huang, W., Li, X., Li, G., Xia, W., Sun, Q., and Xiang, A.P. (2015). Human mesenchymal stromal cells enhance the immunomodulatory function of CD8+CD28– regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 12, 708–718.

Liu, R., Zhou, Q., La Cava, A., Campagnolo, D.I., Van Kaer, L., and Shi, F.-D. (2010). Expansion of regulatory T cells via IL-2/anti-IL-2 mAb complexes suppresses experimental myasthenia. *Eur. J. Immunol.* 40, 1577–1589.

LoDuca, P., Hoffman, B., and Herzog, R. (2009). Hepatic Gene Transfer as a Means of Tolerance Induction to Transgene Products. *CGT* 9, 104–114.

Lu, L., Kim, H.-J., Werneck, M.B.F., and Cantor, H. (2008). Regulation of CD8+ regulatory T cells: Interruption of the NKG2A-Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 19420–19425.

Lundstrom, K. (2018). *Viral Vectors in Gene Therapy. Diseases* 6, 42.

Lüth, S., Huber, S., Schramm, C., Buch, T., Zander, S., Stadelmann, C., Brück, W., Wraith, D.C., Herkel, J., and Lohse, A.W. (2008). Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses

experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. *J. Clin. Invest.* JCI32132.

Ma, C.-C., Wang, Z.-L., Xu, T., He, Z.-Y., and Wei, Y.-Q. (2020). The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019. *Biotechnology Advances* 40, 107502.

MacDonald, K.N., Piret, J.M., and Levings, M.K. (2019). Methods to manufacture regulatory T cells for cell therapy. *Clin Exp Immunol* cei.13297.

Mahr, B., Granofszky, N., Muckenhuber, M., and Wekerle, T. (2017). Transplantation Tolerance through Hematopoietic Chimerism: Progress and Challenges for Clinical Translation. *Front. Immunol.* 8, 1762.

Main, J.M., and Prehn, R.T. (1955). Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow. *J. Natl. Cancer Inst.* 15, 1023–1029.

Mangalam, A.K., Luckey, D., Giri, S., Smart, M., Pease, L.R., Rodriguez, M., and David, C.S. (2012). Two discreet subsets of CD8 T cells modulate PLP91–110 induced experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR3 transgenic mice. *Journal of Autoimmunity* 38, 344–353.

Mannick, J.A., Lochte, H.L., Ashley, C.A., Thomas, E.D., and Ferrebee, J.W. (1959). A functioning kidney homotransplant in the dog. *Surgery* 46, 821–828.

Marcén, R. (2009). Immunosuppressive Drugs in Kidney Transplantation: Impact on Patient Survival, and Incidence of Cardiovascular Disease, Malignancy and Infection. *Drugs* 69, 2227–2243.

Marks, R., and Finke, J. (2006). *Biologics in the prevention and treatment of graft rejection.* Springer Semin Immun 27, 457–476.

Markusic, D.M., Herzog, R.W., Aslanidi, G.V., Hoffman, B.E., Li, B., Li, M., Jayandharan, G.R., Ling, C., Zolotukhin, I., Ma, W., et al. (2010). High-efficiency Transduction and Correction of Murine Hemophilia B Using AAV2 Vectors Devoid of Multiple Surface-exposed Tyrosines. *Molecular Therapy* 18, 2048–2056.

Markusic, D.M., Hoffman, B.E., Perrin, G.Q., Nayak, S., Wang, X., LoDuca, P.A., High, K.A., and Herzog, R.W. (2013). Effective gene therapy for haemophilic mice with pathogenic factor IX antibodies. *EMBO Mol Med* 5, 1698–1709.

Massart, A., Pallier, A., Pascual, J., Viklicky, O., Budde, K., Spasovski, G., Klinger, M., Sever, M.S., Sørensen, S.S., Hadaya, K., et al. (2016). The DESCARTES-Nantes survey of kidney transplant recipients displaying clinical operational tolerance identifies 35 new tolerant patients and 34 almost tolerant patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 31, 1002–1013.

Matas, A.J., Humar, A., Gillingham, K.J., Payne, W.D., Gruessner, R.W., G., Kandaswamy, R., Dunn, D.L., Najarian, J.S., and Sutherland, D.E., R. (2002). Five preventable causes of kidney graft loss in the 1990s: A single-center analysis. *Kidney International* 62, 704–714.

Mennander, A., Paavonen, T., and Häyry, P. (1993). Intimal thickening and medial necrosis in allograft arteriosclerosis (chronic rejection) are independently regulated. *Arterioscler Thromb* 13, 1019–1025.

Mingozzi, F., and Büning, H. (2015). Adeno-Associated Viral Vectors at the Frontier between Tolerance and Immunity. *Front. Immunol.* 6.

- Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D., and Kaveri, S.V. (2004). Cutting Edge: Human CD4⁺ CD25⁺ T Cells Restrain the Maturation and Antigen-Presenting Function of Dendritic Cells. *J Immunol* *172*, 4676–4680.
- Misstear, K., Chanas, S.A., Rezaee, S.A.R., Colman, R., Quinn, L.L., Long, H.M., Goodyear, O., Lord, J.M., Hislop, A.D., and Blackbourn, D.J. (2012). Suppression of Antigen-Specific T Cell Responses by the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral OX2 Protein and Its Cellular Orthologue, CD200. *Journal of Virology* *86*, 6246–6257.
- Mitchison, N.A. (1955). Studies on the immunological response to foreign tumor transplants in the mouse. I. The role of lymph node cells in conferring immunity by adoptive transfer. *J. Exp. Med.* *102*, 157–177.
- Moes, N., Rieux-Laucat, F., Begue, B., Verdier, J., Neven, B., Patey, N., Torgerson, T.T., Picard, C., Stolzenberg, M., Ruemmele, C., et al. (2010). Reduced Expression of FOXP3 and Regulatory T-Cell Function in Severe Forms of Early-onset Autoimmune Enteropathy. *Gastroenterology* *139*, 770–778.
- Moreaux, J., Veyrune, J.L., Reme, T., De Vos, J., and Klein, B. (2008). CD200: A putative therapeutic target in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *366*, 117–122.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* *5*, 621–628.
- Mu, C., Zhang, X., Wang, L., Xu, A., Ahmed, K.A., Pang, X., Chibbar, R., Freywald, A., Huang, J., Zhu, Y., et al. (2017). Enhanced suppression of polyclonal CD8⁺ 25⁺ regulatory T cells via exosomal arming of antigen-specific peptide/MHC complexes. *J Leukoc Biol* *101*, 1221–1231.
- Mühlbauer, M., Fleck, M., Schütz, C., Weiss, T., Froh, M., Blank, C., Schölmerich, J., and Hellerbrand, C. (2006). PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon- α and - γ and mediates T cell apoptosis. *Journal of Hepatology* *45*, 520–528.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., and Snyder, M. (2008). The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing. *Science* *320*, 1344–1349.
- Nathwani, A.C., Rosales, C., McIntosh, J., Rastegarlar, G., Nathwani, D., Raj, D., Nawathe, S., Waddington, S.N., Bronson, R., Jackson, S., et al. (2011). Long-term Safety and Efficacy Following Systemic Administration of a Self-complementary AAV Vector Encoding Human FIX Pseudotyped With Serotype 5 and 8 Capsid Proteins. *Molecular Therapy* *19*, 876–885.
- Nathwani, A.C., Reiss, U.M., Tuddenham, E.G.D., Rosales, C., Chowdary, P., McIntosh, J., Della Peruta, M., Lheriteau, E., Patel, N., Raj, D., et al. (2014). Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *N Engl J Med* *371*, 1994–2004.
- Niemeyer, G.P., Herzog, R.W., Mount, J., Arruda, V.R., Tillson, D.M., Hathcock, J., van Ginkel, F.W., High, K.A., and Lothrop, C.D. (2009). Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* *113*, 797–806.
- Nieves, D.S., Phipps, R.P., Pollock, S.J., Ochs, H.D., Zhu, Q., Scott, G.A., Ryan, C.K., Kobayashi, I., Rossi, T.M., and Goldsmith, L.A. (2004). Dermatologic and Immunologic Findings in the Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrome. *Arch Dermatol* *140*.

- Noble, A., Pestano, G.A., and Cantor, H. (1998). Suppression of immune responses by CD8 cells. I. Superantigen-activated CD8 cells induce unidirectional Fas-mediated apoptosis of antigen-activated CD4 cells. *J. Immunol.* *160*, 559–565.
- Nuti, S., Rosa, D., Valiante, N.M., Saletti, G., Caratozzolo, M., Dellabona, P., Barnaba, V., and Abrignani, S. (1998). Dynamics of intra-hepatic lymphocytes in chronic hepatitis C: enrichment for Valpha24+ T cells and rapid elimination of effector cells by apoptosis. *Eur. J. Immunol.* *28*, 3448–3455.
- O’Connell, P.J., Morelli, A.E., Logar, A.J., and Thomson, A.W. (2000). Phenotypic and Functional Characterization of Mouse Hepatic CD8 α + Lymphoid-Related Dendritic Cells. *J Immunol* *165*, 795–803.
- Onoe, T., Ohdan, H., Tokita, D., Shishida, M., Tanaka, Y., Hara, H., Zhou, W., Ishiyama, K., Mitsuta, H., Ide, K., et al. (2005). Liver Sinusoidal Endothelial Cells Tolerize T Cells across MHC Barriers in Mice. *J Immunol* *175*, 139–146.
- Ordóñez, L., Bernard, I., Chabod, M., Augusto, J.-F., Lauwers-Cances, V., Cristini, C., Cuturi, M.-C., Subra, J.-F., and Saoudi, A. (2013). A Higher Risk of Acute Rejection of Human Kidney Allografts Can Be Predicted from the Level of CD45RC Expressed by the Recipients’ CD8 T Cells. *PLoS ONE* *8*, e69791.
- Ovchinnikov, D.A., van Zuylen, W.J.M., DeBats, C.E.E., Alexander, K.A., Kellie, S., and Hume, D.A. (2008). Expression of Gal4-dependent transgenes in cells of the mononuclear phagocyte system labeled with enhanced cyan fluorescent protein using *Csf1r* -Gal4VP16/UAS-ECFP double-transgenic mice. *Journal of Leukocyte Biology* *83*, 430–433.
- Owen, R.D. (1945). IMMUNOGENETIC CONSEQUENCES OF VASCULAR ANASTOMOSES BETWEEN BOVINE TWINS. *Science* *102*, 400–401.
- Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* *8*, 1353–1362.
- Park, L.M., Lannigan, J., and Jaimes, M.C. (2020). OMIP-069 : Forty-Color Full Spectrum Flow Cytometry Panel for Deep Immunophenotyping of Major Cell Subsets in Human Peripheral Blood. *Cytometry cyto.a.24213*.
- Pascual, M., Theruvath, T., Kawai, T., Tolkoff-Rubin, N., and Cosimi, A.B. (2002). Strategies to Improve Long-Term Outcomes after Renal Transplantation. *N Engl J Med* *346*, 580–590.
- Passos, G.A., Speck-Hernandez, C.A., Assis, A.F., and Mendes-da-Cruz, D.A. (2018). Update on *Aire* and thymic negative selection. *Immunology* *153*, 10–20.
- Paul-Heng, M., Leong, M., Cunningham, E., Bunker, D.L.J., Bremner, K., Wang, Z., Wang, C., Tay, S.S., McGuffog, C., Logan, G.J., et al. (2018). Direct recognition of hepatocyte-expressed MHC class I alloantigens is required for tolerance induction. *JCI Insight* *3*, e97500.
- Paulk, N.K., Pekrun, K., Zhu, E., Nygaard, S., Li, B., Xu, J., Chu, K., Leborgne, C., Dane, A.P., Haft, A., et al. (2018). Bioengineered AAV Capsids with Combined High Human Liver Transduction In Vivo and Unique Humoral Seroreactivity. *Molecular Therapy* *26*, 289–303.
- Picelli, S., Björklund, Å.K., Faridani, O.R., Sagasser, S., Winberg, G., and Sandberg, R. (2013). Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods* *10*, 1096–1098.

- Picelli, S., Faridani, O.R., Björklund, Å.K., Winberg, G., Sagasser, S., and Sandberg, R. (2014). Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc* 9, 171–181.
- Pillarisetty, V.G., Shah, A.B., Miller, G., Bleier, J.I., and DeMatteo, R.P. (2004). Liver Dendritic Cells Are Less Immunogenic Than Spleen Dendritic Cells because of Differences in Subtype Composition. *J Immunol* 172, 1009–1017.
- Pillarisetty, V.G., Katz, S.C., Bleier, J.I., Shah, A.B., and DeMatteo, R.P. (2005). Natural Killer Dendritic Cells Have Both Antigen Presenting and Lytic Function and in Response to CpG Produce IFN- γ via Autocrine IL-12. *J Immunol* 174, 2612–2618.
- Pons, J.A., Revilla-Nuin, B., Baroja-Mazo, A., Ramírez, P., Martínez-Alarcón, L., Sánchez-Bueno, F., Robles, R., Rios, A., Aparicio, P., and Parrilla, P. (2008). FoxP3 in Peripheral Blood Is Associated With Operational Tolerance in Liver Transplant Patients During Immunosuppression Withdrawal: Transplantation 86, 1370–1378.
- Port, F.K., Dykstra, D.M., Merion, R.M., and Wolfe, R.A. (2004). Organ donation and transplantation trends in the USA, 2003: Donation and transplantation trends. *American Journal of Transplantation* 4, 7–12.
- Puche, J.E., Saiman, Y., and Friedman, S.L. (2013). Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis. *Comprehensive Physiology* 3, 20.
- Qian, S., Lu, L., Fu, F., Li, Y., Li, W., Starzl, T.E., Fung, J.J., and Thomson, A.W. (1997). Apoptosis Within Spontaneously Accepted Mouse Liver Allografts. *J Immunol* 158, 4654–4661.
- Racusen, L.C., Colvin, R.B., Solez, K., Mihatsch, M.J., Halloran, P.F., Campbell, P.M., Cecka, M.J., Cosyns, J.-P., Demetris, A.J., Fishbein, M.C., et al. (2003). Antibody-Mediated Rejection Criteria - an Addition to the Banff '97 Classification of Renal Allograft Rejection: Banff Criteria for Antibody-Mediated Rejection. *American Journal of Transplantation* 3, 708–714.
- Radziewicz, H., Ibegbu, C.C., Fernandez, M.L., Workowski, K.A., Obideen, K., Wehbi, M., Hanson, H.L., Steinberg, J.P., Masopust, D., Wherry, E.J., et al. (2007). Liver-Infiltrating Lymphocytes in Chronic Human Hepatitis C Virus Infection Display an Exhausted Phenotype with High Levels of PD-1 and Low Levels of CD127 Expression. *JVI* 81, 2545–2553.
- Ramzy, D., Rao, V., Brahm, J., Miriuka, S., Delgado, D., and Ross, H.J. (2005). Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Can J Surg* 48, 319–327.
- Ronzitti, G., Gross, D.-A., and Mingozzi, F. (2020). Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. *Front. Immunol.* 11, 670.
- Rygaard, J. (1974). Skin grafts in nude mice. 2. Rat skin grafts in nude mice of three genetic backgrounds (BALB-c, C3H, C57-BL). The effects after preparation by thymus grafts. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 82, 93–104.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155, 1151–1164.
- Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., and Yamaguchi, T. (2009). Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International Immunology* 21, 1105–1111.

- Saligrama, N., Zhao, F., Sikora, M.J., Serratelli, W.S., Fernandes, R.A., Louis, D.M., Yao, W., Ji, X., Idoyaga, J., Mahajan, V.B., et al. (2019). Opposing T Cell Responses in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Nature* *572*, 481–487.
- Sarris, M., Andersen, K.G., Randow, F., Mayr, L., and Betz, A.G. (2008). Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition. *Immunity* *28*, 402–413.
- Sasmono, R.T., Oceandy, D., Pollard, J.W., Tong, W., Pavli, P., Wainwright, B.J., Ostrowski, M.C., Himes, S.R., and Hume, D.A. (2003). A macrophage colony-stimulating factor receptor–green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood* *101*, 1155–1163.
- Sato, K., Yamashita, N., Baba, M., and Matsuyama, T. (2003). Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood* *101*, 3581–3589.
- Sawamukai, N., Satake, A., Schmidt, A.M., Lamborn, I.T., Ojha, P., Tanaka, Y., and Kambayashi, T. (2012). Cell-autonomous role of TGF β and IL-2 receptors in CD4⁺ and CD8⁺ inducible regulatory T-cell generation during GVHD. *Blood* *119*, 5575–5583.
- Sawitzki, B., Harden, P.N., Reinke, P., Moreau, A., Hutchinson, J.A., Game, D.S., Tang, Q., Guinan, E.C., Battaglia, M., Burlingham, W.J., et al. (2020). Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *The Lancet* *395*, 1627–1639.
- Schelling, J.R. (2016). Tubular atrophy in the pathogenesis of chronic kidney disease progression. *Pediatr Nephrol* *31*, 693–706.
- Severgnini, M., Sherman, J., Sehgal, A., Jayaprakash, N.K., Aubin, J., Wang, G., Zhang, L., Peng, C.G., Yucius, K., Butler, J., et al. (2012). A rapid two-step method for isolation of functional primary mouse hepatocytes: cell characterization and asialoglycoprotein receptor based assay development. *Cytotechnology* *64*, 187–195.
- Sharma, R., Sung, S., Fu, S.M., and Ju, S.-T. (2009). Regulation of multi-organ inflammation in the regulatory T cell-deficient scurfy mice. *J Biomed Sci* *16*, 20.
- Sheikine, Y., Woda, C.B., Lee, P.Y., Chatila, T.A., Keles, S., Charbonnier, L.-M., Schmidt, B., Rosen, S., and Rodig, N.M. (2015). Renal involvement in the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) disorder. *Pediatr Nephrol* *30*, 1197–1202.
- Shevach, E.M. (2009). Mechanisms of Foxp3⁺ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity* *30*, 636–645.
- Shi, Z., Okuno, Y., Rifa'i, M., Endharti, A.T., Akane, K., Isobe, K., and Suzuki, H. (2009). Human CD8⁺ CXCR3⁺ T cells have the same function as murine CD8⁺ CD122⁺ Treg: HIGHLIGHT. *Eur. J. Immunol.* *39*, 2106–2119.
- Shimokawa, C., Kato, T., Takeuchi, T., Ohshima, N., Furuki, T., Ohtsu, Y., Suzue, K., Imai, T., Obi, S., Ochiai, A., et al. (2020). CD8⁺ regulatory T cells are critical in prevention of autoimmune-mediated diabetes. *Nature Communications* *11*, 1922.
- Shirley, J.L., de Jong, Y.P., Terhorst, C., and Herzog, R.W. (2020). Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors. *Molecular Therapy* *28*, 709–722.

- Shulman, M., and Nahmias, Y. (2012). Long-Term Culture and Coculture of Primary Rat and Human Hepatocytes. In *Epithelial Cell Culture Protocols*, S.H. Randell, and M.L. Fulcher, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 287–302.
- Sierro, F., Evrard, M., Rizzetto, S., Melino, M., Mitchell, A.J., Florido, M., Beattie, L., Walters, S.B., Tay, S.S., Lu, B., et al. (2017). A Liver Capsular Network of Monocyte-Derived Macrophages Restricts Hepatic Dissemination of Intraperitoneal Bacteria by Neutrophil Recruitment. *Immunity* 47, 374–388.e6.
- Silva-Vilches, C., Ring, S., and Mahnke, K. (2018). ATP and Its Metabolite Adenosine as Regulators of Dendritic Cell Activity. *Front. Immunol.* 9, 2581.
- Simpson, N., Cho, Y.W., Cicciarelli, J.C., Selby, R.R., and Fong, T.-L. (2006). Comparison of Renal Allograft Outcomes in Combined Liver-Kidney Transplantation Versus Subsequent Kidney Transplantation in Liver Transplant Recipients: Analysis of UNOS Database: *Transplantation* 82, 1298–1303.
- Siu, J.H.Y., Surendrakumar, V., Richards, J.A., and Pettigrew, G.J. (2018). T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. *Front. Immunol.* 9, 2548.
- Siva, A., Xin, H., Qin, F., Oltean, D., Bowdish, K.S., and Kretz-Rommel, A. (2008). Immune modulation by melanoma and ovarian tumor cells through expression of the immunosuppressive molecule CD200. *Cancer Immunol Immunother* 57, 987–996.
- Śledzińska, A., Menger, L., Bergerhoff, K., Peggs, K.S., and Quezada, S.A. (2015). Negative immune checkpoints on T lymphocytes and their relevance to cancer immunotherapy. *Molecular Oncology* 9, 1936–1965.
- Srivastava, A. (2016). In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Current Opinion in Virology* 21, 75–80.
- Stark, R., Grzelak, M., and Hadfield, J. (2019). RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet* 20, 631–656.
- Starzl, T.E. (2008). THE REVERSAL OF REJECTION IN HUMAN RENAL HOMOGRAFTS WITH SUBSEQUENT DEVELOPMENT OF HOMOGRAFT TOLERANCE. 15.
- Starzl, T.E., Marchioro, T.L., Hutchison, D.E., Porter, K.A., Cerilli, G.J., and Brettschneider, L. (1967). THE CLINICAL USE OF ANTILYMPHOCYTE GLOBULIN IN RENAL HOMOTRANSPLANTATION: *Transplantation* 5, 1100–1105.
- Stuart, P.M. (2015). Major Histocompatibility Complex (MHC): Mouse. In *ELS*, John Wiley & Sons Ltd, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 1–7.
- Suzuki, M., Jagger, A.L., Konya, C., Shimojima, Y., Pryshchep, S., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2012). CD8⁺ CD45RA⁺ CCR7⁺ FOXP3⁺ T Cells with Immunosuppressive Properties: A Novel Subset of Inducible Human Regulatory T Cells. *J.I.* 189, 2118–2130.
- Svensson, C.-M., Medyukhina, A., Belyaev, I., Al-Zaben, N., and Figge, M.T. (2018). Untangling cell tracks: Quantifying cell migration by time lapse image data analysis. *Cytometry Part A* 14.
- Terasaki, P.I. (2003). Humoral Theory of Transplantation: Humoral Theory of Transplantation. *American Journal of Transplantation* 3, 665–673.

- Terasaki, P.I., and Cai, J. (2005). Humoral theory of transplantation: further evidence. *Current Opinion in Immunology* 17, 541–545.
- Thomson, A.W., and Knolle, P.A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol* 10, 753–766.
- Todo, S., Yamashita, K., Goto, R., Zaito, M., Nagatsu, A., Oura, T., Watanabe, M., Aoyagi, T., Suzuki, T., Shimamura, T., et al. (2016). A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. *Hepatology* 64, 632–643.
- Verbsky, J.W., and Chatila, T.A. (2013). Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) and IPEX-related disorders: an evolving web of heritable autoimmune diseases. *Current Opinion in Pediatrics* 25, 708–714.
- Vieyra-Lobato, M.R., Vela-Ojeda, J., Montiel-Cervantes, L., López-Santiago, R., and Moreno-Lafont, M.C. (2018). Description of CD8⁺ Regulatory T Lymphocytes and Their Specific Intervention in Graft-versus-Host and Infectious Diseases, Autoimmunity, and Cancer. *Journal of Immunology Research* 2018, 1–16.
- Vincenti, F., Wekerle, T., Lang, P., Solez, K., and Natarajan, K. (2005). Costimulation Blockade with Belatacept in Renal Transplantation. *The New England Journal of Medicine* 12.
- Vionnet, J., and Sánchez-Fueyo, A. (2018). Biomarkers of immune tolerance in liver transplantation. *Hum. Immunol.* 79, 388–394.
- Warren, A., Le Couteur, D.G., Fraser, R., Bowen, D.G., McCaughan, G.W., and Bertolino, P. (2006). T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 44, 1182–1190.
- Wasowska, B.A., Qian, Z., Cangello, D.L., Behrens, E., Van Tran, K., Layton, J., Sanfilippo, F., and Baldwin, W.M. (2001). PASSIVE TRANSFER OF ALLOANTIBODIES RESTORES ACUTE CARDIAC REJECTION IN IgKO MICE^{1,2}: *Transplantation* 71, 727–736.
- Wedemeyer, H., He, X.-S., Nascimbeni, M., Davis, A.R., Greenberg, H.B., Hoofnagle, J.H., Liang, T.J., Alter, H., and Rehermann, B. (2002). Impaired Effector Function of Hepatitis C Virus-Specific CD8⁺ T Cells in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol* 169, 3447–3458.
- Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 15, 486–499.
- Wiegard, C., Wolint, P., Frenzel, C., Cheruti, U., Schmitt, E., Oxenius, A., Lohse, A.W., and Herkel, J. (2007). Defective T Helper Response of Hepatocyte-Stimulated CD4 T Cells Impairs Antiviral CD8 Response and Viral Clearance. *Gastroenterology* 133, 2010–2018.
- Winau, F., Hegasy, G., Weiskirchen, R., Weber, S., Cassan, C., Sieling, P.A., Modlin, R.L., Liblau, R.S., Gressner, A.M., and Kaufmann, S.H.E. (2007). Ito Cells Are Liver-Resident Antigen-Presenting Cells for Activating T Cell Responses. *Immunity* 26, 117–129.
- Wu, Z., Yang, H., and Colosi, P. (2010). Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. *Molecular Therapy* 18, 80–86.
- Wuensch, S.A., Spahn, J., and Crispe, I.N. (2010). Direct, help-independent priming of CD8⁺ T cells by adeno-associated virus-transduced hepatocytes. *Hepatology* 52, 1068–1077.

- Xystrakis, E., Bernard, I., Dejean, A.S., Alsaati, T., Druet, P., and Saoudi, A. (2004). Alloreactive CD4 T lymphocytes responsible for acute and chronic graft-versus-host disease are contained within the CD45RChigh but not the CD45RClow subset. *Eur. J. Immunol.* *34*, 408–417.
- Yamaguchi, Y., Burrier, C., Roth, C., Tumin, D., Beal, E.W., Washburn, K., Hayes, D., and Tobias, J.D. (2020). Sequential Versus Combined Heart–Liver Transplantation in the USA. *Dig Dis Sci* *65*, 2427–2432.
- Yang, H.-R., Hsieh, C.-C., Wang, L., Fung, J.J., Lu, L., and Qian, S. (2010). A critical role of TRAIL expressed on cotransplanted hepatic stellate cells in prevention of islet allograft rejection. *Microsurgery* *30*, 332–337.
- Yi, J.S., Cox, M.A., and Zajac, A.J. (2010). T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion: T-cell exhaustion. *Immunology* *129*, 474–481.
- You, Q., Cheng, L., Kedl, R.M., and Ju, C. (2008). Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology* *48*, 978–990.
- Yu, M.-C., Chen, C.-H., Liang, X., Wang, L., Gandhi, C.R., Fung, J.J., Lu, L., and Qian, S. (2004). Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7-H1-mediated T-cell apoptosis in mice. *Hepatology* *40*, 1312–1321.
- Yu, Y., Ma, X., Gong, R., Zhu, J., Wei, L., and Yao, J. (2018). Recent advances in CD8+ regulatory T cell research (Review). *Oncol Lett.*
- Zaiss, A.K., and Muruve, D.A. (2008). Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. *Gene Ther* *15*, 808–816.
- Zajac, A.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J.D., Suresh, M., Altman, J.D., and Ahmed, R. (1998). Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. *Journal of Experimental Medicine* *188*, 2205–2213.
- Zanin, S., Lidron, E., Rizzuto, R., and Pallafacchina, G. (2019). Methods to Measure Intracellular Ca²⁺ Concentration Using Ca²⁺-Sensitive Dyes. *Methods Mol. Biol.* *1925*, 43–58.
- Zhang, L., Bertucci, A.M., Ramsey-Goldman, R., Burt, R.K., and Datta, S.K. (2009). Regulatory T cell (Treg) Subsets Return in Patients with Refractory Lupus Following Stem Cell Transplantation and TGF- β producing CD8+ Treg Cells (CD8TGF- β Treg) are Associated with Immunologic Remission of Lupus. *J Immunol* *183*, 6346–6358.
- Zhang, T.-P., Jin, D.-Y., Wardrop, R.M., Gui, T., Maile, R., Frelinger, J.A., Stafford, D.W., and Monahan, P.E. (2007). Transgene expression levels and kinetics determine risk of humoral immune response modeled in factor IX knockout and missense mutant mice. *Gene Ther* *14*, 429–440.
- Zheng, J., Liu, Y., Liu, Y., Liu, M., Xiang, Z., Lam, K.-T., Lewis, D.B., Lau, Y.-L., and Tu, W. (2013). Human CD8+ Regulatory T Cells Inhibit GVHD and Preserve General Immunity in Humanized Mice. *Science Translational Medicine* *5*, 168ra9–168ra9.

Titre : Étude de lymphocytes CD8 régulateurs hépatiques murins par microscopie et analyse du transcriptome.

Mots clés : Tolérance, lymphocytes, transcriptome, microscopie

Résumé : Le développement de nouvelles thérapies d'induction de tolérance allogénique est aujourd'hui un sujet de recherche essentiel en transplantation dont l'objectif final est de découvrir des stratégies permettant de remplacer les traitements immunosuppresseurs néfastes au long terme.

Mon travail de thèse s'est porté sur la caractérisation d'une population lymphocytaire CD8 régulatrice murine, découverte préalablement par mon équipe, induite dans un foie par thérapie génique, et impliquée dans l'induction de tolérance systémique dans un modèle de transplantation allogénique.

L'étude du transcriptome et du phénotype de ces cellules m'ont permis d'approfondir les mécanismes suppressifs et la génération hépatique de ces cellules. J'ai également pu débiter la recherche d'une population équivalente chez des patients transplantés hépatiques tolérants leur greffon.

Dans une deuxième partie de mon projet, axée sur la microscopie, j'ai développé un marquage fluorescent de nouvelle génération pour l'analyse *in situ* des LT_{Reg} CD8⁺, permettant un tracking multimodale efficace de cellules primaires.

Title : Study of murine hepatic CD8 regulatory lymphocytes by microscopy and transcriptome analysis.

Keywords : Tolerance, lymphocytes, transcriptome, microscopy

Abstract : The development of new therapies for the induction of allogeneic tolerance is today an essential subject of research in transplantation, the final objective of which is to discover strategies allowing the replacement of harmful long term immunosuppressive treatments.

My thesis work focused on the characterization of a murine regulatory CD8 lymphocyte population, previously discovered by my team, induced in a liver by gene therapy, and involved in the induction of systemic tolerance toward an allogeneic transplant model.

The study of the transcriptome and the phenotype of these cells allowed me to deepen the suppressive mechanisms and the hepatic generation of these cells. I was also able to start the search for an equivalent population in liver transplant patients tolerant of their graft.

In a second part of my project, focused on microscopy, I developed a new generation fluorescent labeling for the *in situ* analysis of CD8⁺ T_{Reg} , allowing efficient multimodal tracking of primary cells.