

Université de Montréal

**Génération de lymphocytes T CAR T multi-virus spécifiques résistants à l'action
du tacrolimus**

Par

Sabrina Guettouche

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise en immunologie et microbiologie

Mois et année du dépôt initial : Décembre 2022

© Sabrina Guettouche, 2022

Université de Montréal

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Génération de lymphocytes CAR-T multi-virus spécifiques résistants à l'action du tacrolimus

Présenté par

Sabrina Guettouche

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Jean-François Gauchat

Président-rapporteur

Jean-Sébastien Delisle

Directeur de recherche

Jean-François Cailhier

Membre du jury

Résumé

Le transfert adoptif de lymphocytes T virus-spécifiques ou “Chimeric Antigen Receptors” (CAR) s’est avéré efficace pour le traitement de plusieurs types d’infections virales et certains cancers à la suite d’une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Cependant, l’immunosuppression administrée pour la prévention du rejet de greffe et de la maladie du greffon contre l’hôte limite l’efficacité et la persistance à long terme des réponses médiées par ces lymphocytes. L’agent immunosuppresseur Tacrolimus (FK506) est parmi les plus utilisés, et fonctionne en liant la protéine FK506-Binding protein (FKBP12) afin d’exercer ses effets immunosuppresseurs sur les lymphocytes T. Dans le but de fournir une protection anti-virale, mais également anti-lymphoprolifératif des lymphocytes B et permettre la poursuite de cette immunosuppression préventive, nous avons pour objectif de générer des lymphocytes CAR-T et virus-spécifiques résistants à l’action du FK506 par l’invalidation du FKBP12. En utilisant la méthode d’édition génique basée sur les CRISPR ciblés par la nucléase Cas9, nous avons pu invalider le gène du FKBP12 sur des lymphocytes T stimulés par CD3-CD28. L’efficacité du knockout a été validée par Western Blot et TIDE sequencing. Le knock-out du gène du FKBP12 a conféré un maintien de la croissance cellulaire et des fonctions effectrices telles que la synthèse de cytokines IL-2, TNF α et IFN γ en présence de Tacrolimus comparativement aux cellules contrôles. Par la même méthode, nous avons pu invalider le gène du FKBP12 sur des lymphocytes T multivirus-spécifiques dont l’efficacité a été validée par cytométrie en flux. Les fonctions effectrices ont également été maintenues en présence de tacrolimus et ont été évaluées par ELISpot. Enfin, des lignées de lymphocytes T multivirus spécifiques dont le gène du FKBP12 a été invalidé ont été transduites avec un vecteur lentiviral dans le but d’exprimer un CAR CD19 dont l’expression a été validée par cytométrie en flux et la réactivité maintenue en présence de tacrolimus. En conclusion, ces résultats nous ont permis de démontrer la faisabilité de génération de lymphocytes T « triple fonction » anti-tumorales, anti-virales et résistantes au tacrolimus. L’application de cette approche semble prometteuse dans un contexte d’une immunothérapie adoptive anti-virale et anti-tumorale post-transplantation de moelle osseuse. **Mots-clés** : CRISPR-CAS9, lentivirus, tacrolimus, immunosuppresseurs, transplantation de moelle osseuse.

Abstract

Adoptive transfer of virus-specific T lymphocytes or CAR-T cells has been shown to be effective for the treatment of several types of viral infections and certain cancers following hematopoietic cell transplantation. However, immunosuppression administered for the prevention of transplant rejection and graft-versus-host disease limits the efficacy and long-term persistence of responses mediated by these lymphocytes. The widely used immunosuppressive agent Tacrolimus (FK506) requires FK506-Binding protein (FKBP12) to exert its immunosuppressive effects on T cells. We undertook to engineer a multifunctional T-cell therapy to both optimally prevent viral reactivation and relapse of B-cell malignancies post-transplant in the context of immunosuppression. The objective of our work is to generate tacrolimus resistant, multivirus-specific T-cell lines expressing an anti-CD19 CAR. Using the gene editing method based on Clustered Regular interspaced short palindromic repeats (CRISPR) targeted by the CRISPR-associated protein 9 (Cas9) nuclease, we were able to invalidate the FKBP12 gene on activated T cells (confirmed by TIDE sequencing and western blotting). Invalidation of FKBP12 conferred maintenance of cell growth and effector functions such as the synthesis of cytokines IL-2, TNF α and IFN γ in the presence of Tacrolimus. Using the same method, we were able to delete the FKBP12 gene in virus-specific T lymphocytes. Effector functions were also maintained in the presence of tacrolimus. Finally, we integrated an anti-CD19 CAR by lentiviral transduction into FKBP12-edited multi-virus T-cell lines, and the efficiency of transduction was determined by flow cytometry. The cells maintained their viral reactivity in the presence of tacrolimus. In conclusion, we were able to confirm the feasibility of generation of "triple function" T cells (anti-viral, anti-tumoral and tacrolimus resistant). Multifunctional T-cell product manufacturing is a promising approach to optimize post-transplant T-cell immunity against opportunistic pathogens and underlying malignancies.

Keywords : CRISPR-CAS9, lentivirus, tacrolimus, immunosuppressive drugs, hematopoietic stem cell transplantation.

Table des matières

Résumé.....	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des tableaux.....	15
Liste des figures.....	17
Liste des sigles et abréviations.....	19
Remerciements	27
Avant-propos.....	29
Chapitre 1 – Transplantation de cellules souches hématopoïétiques et transfert adoptif de lymphocytes T	31
1.1 Généralités :	31
1.2. Activation et différenciation du lymphocyte T :	32
1.3. Limites de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques.....	35
1.3.1. Maladie de Greffon contre l’hôte :	35
1.3.2. Rejet de greffe :.....	36
Chapitre 2 – Prévention de GVHD et de rejet.....	39
2.1. Drogues immunosuppressives :	39
2.1.1. Tacrolimus :	39
2.1.2. Rapamycine ou sirolimus:	40
2.2. FKBP12 :	41
2.2.1. FKBP12 comme immunophiline :	42
2.2.2.FKBP12 comme régulateur du cycle cellulaire :.....	43

2.2.3. FKBP12 et les canaux calciques :.....	44
2.2.4. FKBP12 comme responsable de nécroptose :.....	45
Chapitre 3 – Émergences et réactivations virales dans un contexte d’immunosuppression.....	47
3.1. Adénovirus :.....	47
3.2. Cytomégalovirus humain (HCMV) :.....	48
3.3. Virus Epstein-Barr :.....	50
3.4. BK virus :.....	52
Chapitre 4 – Thérapie génique dans les immunothérapies adoptives anti-tumorales :	55
4.1. Les CAR-T ou lymphocytes T à récepteurs antigéniques chimériques:	56
4.1.1. Structure du CAR :.....	56
<i>Un domaine de reconnaissance de l’antigène :.....</i>	56
<i>Une ou plusieurs parties intracellulaires :</i>	57
4.1.2. Signalisation des CAR-T cells :.....	59
4.1.3. Production des lymphocytes CAR-T :.....	59
4.1.4. Toxicité des CAR-T cells :.....	60
4.1.4.1. <i>Syndrome de relargage cytokinique :.....</i>	60
4.1.4.2. <i>Syndrome de neuro-toxicité associée aux cellules immunitaires effectrices :</i>	61
4.1.5. Utilisation des CAR-T CD19 en hémato-oncologie :.....	61
4.2. Le système CRISPR-Cas9 :.....	63
4.2.1. Mécanisme de l’édition génique par CRISPR-Cas9 :	64
4.2.2. Méthodes d’introductions connues pour le CRISPR-CAS9 :.....	65
4.2.3. Knock-out de gènes médié par CRISPR-CAS9 dans les lymphocytes T :	65
Chapitre 5 : Hypothèse et objectifs.....	67
5.1. Hypothèse :	67

5.2. Objectifs :	68
Chapitre 6 – Matériels et méthodes	69
6.1. Échantillons de sang et isolation des cellules mononuclées du sang périphérique :	69
6.2. Confection et choix des guides simples ARN (sgRNA) codant pour le gène FKBP12 :	69
6.3. Production de virus CD19-CAR :	70
6.3.1. Bactéries et ADN de plasmides :	70
6.3.2. Production des particules lentivirales :	70
6.3.3. Titration virale :	71
6.4. Culture des lymphocytes T activés ex vivo par CD3-CD28 :	72
6.4.1: Délétion du gène FKBP12KO par CRISPR-CAS9 :	72
6.4.2: Transduction lentivirale du pCCL et pCCL-CD19 CAR :	73
6.4.3: Délétion du gène et transduction lentivirale du pCCL et pCCL-CD19 CAR:	74
6.5. Culture des LTs multivirus spécifiques co-culture :	76
6.5.1: Délétion du gène FKBP12KO sur des LT multivirus spécifiques :	76
6.5.2: Expression du CD19 CAR sur des lymphocytes FKBP12KO et multivirus spécifiques :	77
6.5.2.1. Génération des cellules dendritiques matures :	78
6.5.2.2. Coculture de DCs avec lymphocytes T :	78
6.6. Confirmation de l'efficacité du knock-out du gène codant pour FKBP12 :	80
6.6.1: Western-Blots :	80
6.6.2: Cytométrie en flux :	81
6.7. Tests de fonctionnalité	81
6.7.1. Marquage intracellulaire cytokinique :	81
6.7.2. Test de réactivité IFN γ enzyme-linked immunospot assay (ELISpot):	82
6.8. Tests statistiques :	82

Chapitre 7 – Résultats	83
7.1. Le Knock-out du FKBP12 est réalisable avec la technique CRISPR-CAS9 :	83
7.2. Délétion du gène FKBP1A et transductions lentivirales du pCCL-CD19 CAR dans des lymphocytes activés par CD3-CD28 :	86
7.2.1. Délétion du gène FKBP12 sur lymphocytes T polyclonaux :	86
7.2.1.1 <i>La délétion du gène FKBP12 est réalisable sur des lymphocytes T primaires humains</i> :	86
7.2.1.2 <i>Le knock-out du FKBP12 n'a pas d'effet délétère sur le lymphocyte T</i> :	88
7.2.1.3. <i>Le FKBP12 KO n'induit pas de différences majeures dans la différenciation du lymphocytes T</i> :	89
7.2.1.4. <i>Les cellules FKBP12 KO ont une meilleure croissance en présence de tacrolimus</i> :	90
7.2.1.5. <i>Les cellules FKBP12 KO ne présentent pas de meilleure croissance en présence de rapamycine</i> :	91
7.2.1.6. <i>Le FKBP12 KO produisent des cytokines en présence au tacrolimus</i> :	93
7.2.2. Transductions lentivirales du pCCL et pCCL-CD19 sur des lymphocytes polyclonaux :	95
7.2.2.1. <i>Les vecteurs utilisés sont efficaces</i> :	95
7.2.2.2. <i>La production de virions contenant le transgène pCCL ou pCCL-CAR CD19 est efficace</i> :	96
7.2.2.4. <i>Les lymphocytes T polyclonaux transduits expriment le pCCL-CAR CD19</i> :	98
7.2.3. Transductions lentivirales du pCCL et pCCL-CD19 sur des lymphocytes polyclonaux FKBP12KO :	99
7.2.3.1. <i>Le KO du FKBP12 avant l'activation du lymphocyte T est efficace</i> :	99
7.2.3.2. <i>Le KO du FKBP12 à J0 n'est pas délétère pour la croissance de ces lymphocytes T</i> :	100

7.2.3.3. Les lymphocytes FKBP12KO activées après nucléofection sont fonctionnelles :.....	101
7.2.3.4. Les lymphocytes FKBP12KO transduites expriment le CAR CD19 :	102
7.3. Délétion du gène FKBP1A et transductions lentivirales du pCCL-CD19 CAR dans des lymphocytes multivirus spécifiques:.....	104
7.3.1. Délétion du gène FKBP12 sur lymphocytes T multivirus spécifiques :	104
7.3.1.1. Les cellules FKBP12 KO multivirus spécifiques ont une bonne croissance en présence de tacrolimus:	104
7.3.1.2. La délétion du FKBP12 confère une résistance à l'action du tacrolimus sur le plan fonctionnel :.....	105
7.3.2. Transductions lentivirales du pCCL-CD19 sur des lymphocytes lymphocytes T FKBP12KO multivirus spécifiques :.....	106
7.3.2.1. Le KO du FKBP12 sur des lymphocytes T multivirus spécifiques et transduites est efficace :	106
7.3.2.2. Les lymphocytes T FKBP12KO et multi-virus spécifiques expriment le pCCL-CAR-CD19 :	107
7.3.2.3. Les lymphocytes CD19 CAR-T et non CD19 CAR-T FKBP12KO sont multivirus spécifiques :	109
Chapitre 8 : Discussion	111
Chapitre 9 : CONCLUSION	127
Références bibliographiques.....	129

Liste des tableaux

Tableau 1. – Les guides sgRNA ciblant le gène FKBP1A et utilisés pour nos expériences.83

Liste des figures

Figure 1. – Schéma représentatif du premier signal d'activation du lymphocyte T.	34
Figure 2. – Mécanisme d'action du tacrolimus et de la rapamycine dans l'activation du lymphocyte T.	43
Figure 3. – FKBP12 et les récepteurs calciques.....	45
Figure 4. – Types de CAR-T cells en fonction de leurs modules intracellulaires.	58
Figure 5. – Comparaison entre NHEJ et HDR.	65
Figure 6. – Pertinence du projet dans un contexte clinique	68
Figure 7. – Chronologie représentative de la délétion du gène du FKBP12 par CRISPR-CAS9 sur des lymphocytes T activés par CD3-CD28.....	73
Figure 8. – Chronologie représentative de la délétion du gène du FKBP12 par CRISPR-CAS9 et transduction lentivirale par pCCL-CAR CD19 sur des lymphocytes T activés par CD3-CD28.....	75
Figure 9. – Chronologie représentative de la délétion du gène du FKBP12 par CRISPR-CAS9 sur des lymphocytes T activés par co-culture.....	77
Figure 10. – Chronologie représentative de transduction lentivirale par pCCL CD19 CAR sur des lymphocytes T activés par co-culture et FKBP12 KO.	80
Figure 11. – Efficacité du guide sgrNA-4 au niveau génique par Tracking of indels by Decomposition (TIDE) des cellules électroporées avec Cas9 avec et sans sgrNA-4.....	84
Figure 12. – Séquence ADN cible du sgrNA-4 des cellules électroporées par Cas9 seule ou associée au sgrNA-4.....	85
Figure 13. – Expression du FKBP12 sur le plan protéique	87
Figure 14. – Cinétique de croissance cellulaire des cellules avant ajout du tacrolimus	88
Figure 15. – Phénotype des lymphocytes T CD4+ (A gauche) et CD8+ (A droite).....	90
Figure 16. – Croissance cellulaire des cellules après ajout du tacrolimus.	91
Figure 17. – Effets de la rapamycine sur les lymphocytes T FKBP12 KO.....	92
Figure 18. – Marquage intracellulaire cytokinique des lymphocytes CD8+.....	95
Figure 19. – Efficacité de transfection transitoire du pCCL-CAR CD19et pCCL sur des HEK293	

Figure 20. –	Titration sur HEK293 des lentivirus codants pour le pCCL-CAR CD19	97
Figure 21. –	Expression du pCCL (vecteur vide) sur lymphocytes T primaires activés par CD3-CD28	98
Figure 22. –	Expression du pCCL-CD19 sur lymphocytes T primaires activés par CD3-CD28.	99
Figure 23. –	Efficacité du knock-out du FKBP12 au Western Blot.....	100
Figure 24. –	Cinétique de croissance cellulaire des cellules avant et après ajout du tacrolimus:	101
Figure 25. –	Marquage intracellulaire cytokinique des lymphocytes CD4+ et CD8 :.....	102
Figure 26. –	Expression du pCCL-CD19 CAR sur des lymphocytes T FKBP12 KO activés par CD3-CD28	103
Figure 27. –	Croissance cellulaire des cellules avant et après l'ajout du tacrolimus.....	105
Figure 28. –	Réactivité des lymphocytes T FKBP12 KO en présence de tacrolimus	106
Figure 29. –	Efficacité du knock-out du FKBP12 au Western Blot des cellules multivirus spécifiques et exprimant un pCCL-CAR CD19.	107
Figure 30. –	Expression du pCCL-CAR CD19 sur lymphocytes T nucléofectés et activés par co-culture	109
Figure 31. –	Réactivité des lymphocytes T FKBP12 KO en présence de tacrolimus	110

Liste des sigles et abréviations

4EBP1 : Eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1

AAV6: Adeno-associated virus type 6

Akt : Protéine kinase B

ARNm: acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine 5' triphosphate

B2M : Beta 2 microglobuline

BCMA : Antigène de maturation des lymphocytes B

Ca : Calcium

CAR : Chimeric Antigen Receptors

Cas9 : CRISPR-Associated protein 9

CCL : Leucémies lymphoïdes chroniques

CCR : C-C chemokine receptor

CD : Cluster of differentiation

Cdk : Cyclin-dependant kinase

CDR : Complementary determining regions

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CRISPR : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

CXCR :C-x-C motif chemokine receptors

DAMP : Danger associated molecular pattern

DLI : donor lymphocyte infusion

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DSB : Double strand breaks

DsODN : Double stranded oligodeoxynucleotides

EBNA : Epstein Barr nuclear antigen

EBV : Epstein Barr virus

FBS : foetal bovin serum

FKBP12 : FK506 binding protein

FOXP3: Forkhead box P3

gB : Glycoprotéines B

gH : Glycoprotéines H

GM-CSF : Granulocyte Macrophage colony stimulating factor

Gp : Glycoprotéine

GVHD : Greffon versus host disease

GVL : Greffon contre leucémie

Gy : Grey

HDR : Homology directed repair

HEK : Human embryonic kidney

HLA : Human leucocyte antigen

HSCT : Transplantation de cellules souches hématopoïétiques (Hematopoietic stem cell transplantation)

ICANS : Syndrome de neurotoxicité associée aux cellules immunitaires effectrices

ICE : index of CRISPR Edits

IFN γ : Interferon gamma

IL: Interleukine

IP3 . inositol 1,4,5, triphosphate

ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

JAK : Janus Kinases

KI : Knock-in

KO : Knock-out

LAL : Leucémies aiguës lymphoblastiques

LB : Luria Bertani

LLC : Leucémies lymphoïdes chroniques

LMP : Latent membrane protein 1

LPS : Lipopolysaccharides

LRSC : chambre de leucoréduction

LT : Lymphocyte T

LTA : Large T antigen

miHa : Antigènes mineurs d'histocompatibilité

MLKL : Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase

MOI : Multiplicity of infection

mTOR : Mammalian target of Rapamycin

NFAT : nuclear factor of activated T cells

NF κ B: Nuclear factor Kappa B

NGFR : Nerve Growth Factor Receptor

NHEJ : Non homologous end joining

NHL : lymphomes non hodgkiniens

NHL : Lymphomes non-hodgkiniens (Non Hodgkinian lymphomas)

NK : Natural Killer

NSG : NOD SCID Gamma

PAM : Photospacer adjacent motif

PAMP : Pathogen associated molecular pattern

PBMC : Peripheral blood mononuclear cells

PBS : Phosphate-buffered saline

PDCD1 : Programmed cell death 1

PI3K : phosphatidylinositol 3 Kinase

PTLD : Maladie lymphoproliférative post-transplantation (Post-transplant lymphoproliferative disorder)

RIPK : Receptor interacting protein kinase

RPM : revolutions per minutes

RyR : Recepteur de ryanodine

S6K : ribosomal protein 6 kinase

scFv : single chain variable fragment

sgRNA : Single guide RNA

siRNA : Small interfering RNA

STAT : signal transducer and activator of transcription

TAA : Tumor associated antigen

TALEN : Transcription activator-like effector nucleases

Tcm : T centraux mémoires

TCR : T cell receptor

Teff : T effecteurs

Tem : T effecteurs mémoires

TGF : transforming growth factor

TIDE : Tracking of indels by decomposition

Tm : T mémoires

Tn : T naïfs

TNF : Tumor necrosis factor

TRAC : chaîne α du TCR

TRUCK : T cells redirected universal cytokine product

Tscm : T stem cell-like memory

UI : Unités internationales

UL : Unique long

VH : Chaines Lourdes des immunoglobulines

VIH : Virus d`immunodéficience humaine

VL : Chaines légères d-immunoglobulines

VP1 : Viral capsid protein 1

VSV : Virus de la stomatite vésiculaire

WGS : Whole genome sequencing

ZFN : Zinc finger nucleases

“En vérité, la richesse de l’homme n’est pas ce qu’il possède, mais ce qu’il laisse derrière lui. ”

Yasmina Khadra.

Remerciements

À tout seigneur, tout honneur : Mes plus respectueux remerciements s'adressent au Dr Jean-Sébastien Delisle, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour ses qualités tant humaines que pédagogiques, mais également son don d'écoute. Pour m'avoir encadré, éclairé, conseillé, et guidé dans ce monde vaste qu'est la recherche, tout en me faisant l'honneur de m'accompagner minutieusement dans la réalisation de ce travail. Merci à toi, Jean-Sébastien, pour ton optimisme constant, ta curiosité scientifique encourageante et surtout, ta grandeur d'âme.

Je tiens également à remercier le Dr Jean-François Gauchat et Dr Jean-François Callhier, de me faire l'honneur de réviser ce mémoire, ainsi que la Fondation Edith et Richard Strauss pour le soutien financier menant à la réalisation de ce projet.

À l'ensemble de l'équipe de mon laboratoire, ceux qui ont conduit le navire avec moi en temps de tempête virémique COVID19, et qui n'ont cessé d'amener la joie et la bonne humeur malgré les circonstances ainsi que les nouveaux membres : Ali Smaani, Marie-France Aubin, Amina Dahmani, Valérie Janelle, Caroline Rulleau, Cedric Carli, Shirin Lak, Gabrielle Boudreau, Fateme Sheibeiki, Leila Jafarzadeh : Merci à vous!

Je remercie tout particulièrement mon ami et collègue Lorne Schweitzer pour tous les repas gras et sucrés qu'on a partagé ainsi que tous les rires qu'on a eu pendant cette maîtrise. Ton soutien et tes blagues ont été un réel carburant pour moi!

À mes collègues qui font partie du centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve Rosemont : Christina Sawchyn, Karine Boulay et Laurence Gagné pour leurs précieux conseils techniques, ainsi que Veronica, JFD, Meriem, Zeynab, Rana et Romain pour leur constante bonne humeur lors de nos rencontres dans les couloirs. Mes remerciements vont également aux étudiants de ma cohorte, devenus amis avec le temps, Matheus, Delphine et Kim, et dont le soutien a été constant.

Il est important pour moi de dédier ce travail portant sur les cancers hématologiques à mes anciens collègues médecins avec qui j'ai eu l'honneur de travailler pendant mon internat en

hématologie pédiatrique : Pr Bensenoussi, Dr Boukhil, Dr Ait Idir, Pr Maouche, Dr Rezki et tous les autres. Un merci particulier à Youcef et Aniss, de mon ancienne vie, qui m'ont encouragé à prendre le navire pour me lancer dans cette grande aventure. Le navire étant un avion, ce travail représente quand même le témoignage de ma vive reconnaissance.

À l'ensemble de mes amis : Alexis, Sofiane, Thomas, Mehdi, Kamel, Sabri, Fatah, Anis, Amine-Mehdi, Lotfi, Billel, Anthony, Sarah, Maxime, Cherine, et Miassa, pour votre écoute et grand soutien moral quotidien.

Aux membres de ma famille : ma sœur Amel, mon beau-frère Amine, ainsi que mes petits cousins Yanis et Sarah qui ne cessent de m'envoyer des encouragements au-delà de l'Atlantique, merci pour votre présence.

À ma sœur et meilleure amie Chimène et mon beau-frère (et meilleur ami aussi) Salim, qui de près ou de loin m'ont toujours aidé à sauver mon savoir-être, mon savoir-vivre ainsi que mon savoir-faire dans la vie, me berçant de bons conseils et m'encourageant dans les moments les plus difficiles, en multipliant ma volonté pour parfois réaliser l'impossible. Lisa vous remercie grandement !

À mes neveux, Nil, Sophia et Selena, les trois amours de ma vie, pour la douceur dont ils n'ont cessé de faire preuve et qui m'a tant aidé, même à distance.

À ma mère, cette guerrière qui m'a tant appris sur les batailles de la vie, et dont le courage m'inspire quotidiennement. Merci de m'avoir écoutée et soutenue dans mes choix. Merci d'être toujours là pour moi. Pour cela, tu as mon éternelle gratitude et respect.

À mon père, qui a été le premier à y croire et qui m'a demandé, à un très jeune âge, de toujours choisir la folie des passions à la sagesse de l'indifférence. Puisse ce travail être sa source de fierté.

Enfin, à la mémoire de tous les patients n'ayant malheureusement pas survécu à leur combat contre les cancers hématologiques, ainsi que celle de mon père, ma sœur Lyliya, ainsi que ma tante Mimi, qui nous ont quittés bien trop tôt et qui nous manquent terriblement.

Avant-propos

Le sujet de mon projet de recherche porte sur l'optimisation d'une nouvelle stratégie d'immunothérapie adoptive chez les patients recevant un traitement d'immunosuppresseurs avec tacrolimus dans un contexte de transplantation de moelle osseuse. Le but étant d'élaborer une thérapie cellulaire permettant de conférer aux lymphocytes T injectés aux patients une résistance à l'action du tacrolimus ainsi qu'une action anti-virale et anti-tumorale. Également, et au-delà de la pertinence clinique, l'objectif du travail était d'aborder la complexité de l'ingénierie de lymphocytes T modifiés.

Pour ce faire, notre premier objectif était d'éditer génétiquement des lymphocytes T polyclonaux par délétion ciblée du gène codant pour la protéine FKBP12, protéine que le tacrolimus utilise pour exercer ses effets immunosuppresseurs, et transduction lentivirale pour l'expression d'un CAR CD19, et ce, dans le but de conférer aux lymphocytes T une résistance à l'action du tacrolimus avec une composante anti-tumorale spécialement dirigée contre les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL-B), lymphoïdes chroniques (CLL) et les lymphomes non-hodgkiniens à cellules B (B-NHL). Notre deuxième objectif était d'utiliser ces deux stratégies d'édition génique sur des lymphocytes T ayant été éduqués ex vivo à reconnaître les virus les plus fréquemment réactivés chez les patients immunosupprimés : Le BK virus, l'adénovirus, le cytomégalovirus et le virus Epstein-Barr et les éradiquer. Cette stratégie a donc deux objectifs 1) obtenir un produit cellulaire qui peut reconstituer l'immunité anti-virale après la greffe et 2) obtenir un produit cellulaire qui n'aurait pas le potentiel d'induire de la maladie du greffon contre l'hôte même si résistant au tacrolimus.

Les prochains chapitres contiennent donc une revue de la littérature couvrant les points importants de mon projet de recherche. Tout d'abord, le chapitre 1 qui contiendra des notions sur les immunothérapies adoptives et la transplantation de cellules souches hématopoïétiques ou HSCT (Hematopoietic stem cell transplantation) ainsi que les limites de cette dernière par la survenue de la maladie de greffon contre l'hôte et de rejets de greffe. Le chapitre 2 traitera de l'immunosuppression mise en place afin de prévenir et/ou traiter ces derniers, notamment le

tacrolimus et son mode d'action par l'utilisation de notre protéine d'intérêt FKBP12 afin de médier ses effets immunosuppresseurs. Le chapitre 3 abordera les contraintes et effets de cette immunosuppression administrée dans la survenue de réactivations virales et de rechutes du cancer. Enfin, dans le chapitre 4, nous aborderons toutes les stratégies de thérapies géniques déjà mises en place dans les immunothérapies adoptives actuelles, dont celles qui font l'objet de ce projet, soit l'expression de CAR ainsi que les délétions de gènes d'intérêt par méthode CRISPR-Cas9.

Chapitre 1 – Transplantation de cellules souches hématopoïétiques et transfert adoptif de lymphocytes T

1.1 Généralités :

Depuis plus d'un demi-siècle, l'héματο-oncologie a évolué d'une approche classique à base de chimiothérapies vers une nouvelle ère qui cherche à utiliser le système immunitaire du patient à des fins stratégiques et thérapeutiques. L'avènement des immunothérapies adoptives en est l'exemple et consiste en l'injection, chez les patients atteints de cancer, de lymphocytes T autologues (appartenant au patient lui-même), ou allogéniques (provenant d'un proche ou d'un donneur non apparenté). Elle trouve son origine dans une expérience menée en 1966 qui a démontré qu'une transplantation de tumeurs et de leucocytes dérivés des mêmes patients était corrélée à une régression tumorale chez la moitié des patients. (1) La transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques dans les leucémies a ensuite été la première approche menée en clinique de transfert adoptif, et dont le succès a été attribué à l'initiation d'une réponse anti-tumorale du greffon, maintenant définie comme un effet greffon-contre-leucémie ou GVL, et dont le pivot est le lymphocyte T. (2) La connaissance du potentiel anti-tumoral de ces derniers a ainsi ouvert la voie aux essais de transfert adoptif de lymphocytes T (3) allant jusqu'à leur modification génétique ou leur éducation ex-vivo vis-à-vis de certains antigènes, et ce, dans le but d'augmenter leur efficacité anti-tumorale et même anti-virale. (4) (5)

En 1957, Edward Donnall Thomas effectuait la première transplantation de moelle osseuse chez l'être humain à New-York. (6). À cette époque, la notion d'histocompatibilité n'existait pas. La première réussite de greffe de moelle est attribuée à Georges Mathé qui avait effectué ses essais sur des physiciens yougoslaves ayant accidentellement reçu des irradiations dans un réacteur nucléaire (7), suivie de multiples succès de greffe avec donneur HLA-identique puis avec donneur non apparenté. (8) L'utilisation de cette thérapie est maintenant de pratique courante en clinique et est utilisée pour combattre les cancers hématologiques, les déficiences

immunitaires, les maladies métaboliques et d'autres syndromes d'insuffisance de la moelle osseuse. (9) En effet, d'après le rapport d'étape sur le système canadien du don de greffe d'organes de 2017, le Canada réalise environ 900 greffes de moelle osseuse tous les ans.

Les cellules souches hématopoïétiques utilisées peuvent provenir de moelle osseuse, du sang périphérique ou de sang de cordon ombilical du patient lui-même, ou d'un donneur proche au génotype HLA identique. (10) Le degré d'histocompatibilité entre donneur et receveur est une notion importante dans les greffes allogéniques, car la sévérité des réponses immunitaires qu'elle enclenche en dépend. De ce fait, et malgré toutes les mesures prophylactiques mises en place, deux problèmes peuvent apparaître : La réactivité du greffon vis-à-vis des antigènes majeurs et/ou mineurs d'histocompatibilité (miHa) du receveur, provoquant la maladie du greffon contre l'hôte, et la réactivité du receveur vis-à-vis du greffon, provoquant un rejet de ce dernier. Le *primum movens* des deux processus est l'activation du lymphocyte T du donneur ou du receveur. (9)

1.2. Activation et différenciation du lymphocyte T :

En effet, les lymphocytes T représentent les acteurs majeurs d'une réponse immunitaire anti-virale et anti-tumorale. Ils sont issus de précurseurs ayant subi de multiples sélections dans le thymus afin d'arriver à un certain stade de maturation, dit "naïf", car ils n'ont pas encore rencontré l'antigène. Ces lymphocytes T naïfs expriment un récepteur spécifique de l'antigène appelé "T cell receptor" ou TCR et circulent à travers les organes lymphoïdes secondaires (Rate, ganglions lymphatiques et tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) afin d'interagir avec les cellules présentatrices d'antigène (CPA) dites professionnelles, ces dernières étant représentés principalement par les cellules dendritiques qui sont capables de capturer les antigènes des tissus périphériques de les apprêter afin de présenter les peptides qui en dérivent sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) ou de classe II (CMH-II) aux TCR des lymphocytes T CD8 et CD4 respectivement, afin de les activer. Cette activation, indispensable dans l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative, nécessite donc et en premier lieu la reconnaissance de l'antigène présenté par le TCR du lymphocyte T. (11) Ce récepteur TCR est un

complexe moléculaire composé d'un hétérodimère d'une chaîne alpha et d'une chaîne bêta dans 95% des lymphocytes T ou d'une chaîne gamma et d'une chaîne delta dans 5%. Les deux chaînes du TCR $\alpha\beta$ sont composées d'un domaine extracellulaire, transmembranaire et une chaîne cytoplasmique. Le domaine extracellulaire permet au lymphocyte T de reconnaître un antigène étranger ou "non-soi" présenté par les cellules présentatrices d'antigène, grâce à des régions hypervariables "complementary determining regions (CDRs), dont le domaine le plus important est CDR3, soumis à des recombinaisons génétiques, peut reconnaître une grande variété d'antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigènes. (12) Les chaînes du TCR, du fait qu'elles soient dépourvues de domaine de signalisation, sont associées d'une façon non covalente au complexe CD3, initialement constitué de trois dimères différents ($\epsilon\delta$, $\epsilon\gamma$, et $\zeta\zeta$) et dont le rôle est la transduction de signaux à partir du TCR. (13)

La fonction du lymphocyte T est donc régie par l'activation de ce récepteur TCR et de toute la signalisation en aval suite à la reconnaissance par ce dernier des peptides présentés par les CPA. Cette initiation requiert également des co-récepteurs tels que le CD8 et les CD4 qui agissent en tant que molécules d'adhésion et qui se lient aux molécules CMH-I et II respectivement afin de stabiliser l'interaction entre les cellules présentatrices d'antigène et les lymphocytes T. (14) Cette interaction a pour conséquence un changement de conformation de la chaîne de TCR zeta (ζ) et du complexe de signalisation CD3 (CD3 δ , CD3 ϵ , and CD3 γ) (12), le recrutement de plusieurs tyrosines kinases dans une cascade de phosphorylation (15) et enfin, la génération de l'inositol 1,4,5, triphosphate (IP3) qui se fixe à ses récepteurs RIP3 induisant une augmentation de l'influx du calcium du réticulum endoplasmique au cytoplasme. (16) Cette augmentation de niveaux du calcium entraîne une activation des calmodulines kinases et de la "Calcineurine", une phosphatase dépendante du Ca^{2+} et qui, à son tour, déphosphoryle le facteur nucléaire de transcription du lymphocyte T ou NFAT. Ce dernier migre au noyau et induit, à l'aide d'autres facteurs issus des autres voies activées en aval du TCR, la transcription de gènes spécifiques. (17)

En plus du signal transmis par le TCR suite à son engagement avec le complexe CMH-antigène, l'activation du lymphocyte T requiert un deuxième signal, appelé "signal de co-stimulation", induit par l'interaction de molécules de co-stimulation de la famille B7 : CD28 (B7-1) et CD86 (B7-2) exprimées par les cellules dendritiques activées suite à la détection de signaux de danger

(Danger Associated Molecular Pattern, DAMP ou pathogen associated molecular pattern, PAMP) avec le récepteur CD28 exprimé par les LT, formant ainsi une synapse immunologique. Cette synapse induit, à son tour, la sécrétion de cytokines telles que l'interleukine-2 (IL-2) qui lie à son récepteur de surface, permettant ainsi une expansion clonale et une différenciation des lymphocytes T en fonction du milieu cytokinique. (18)

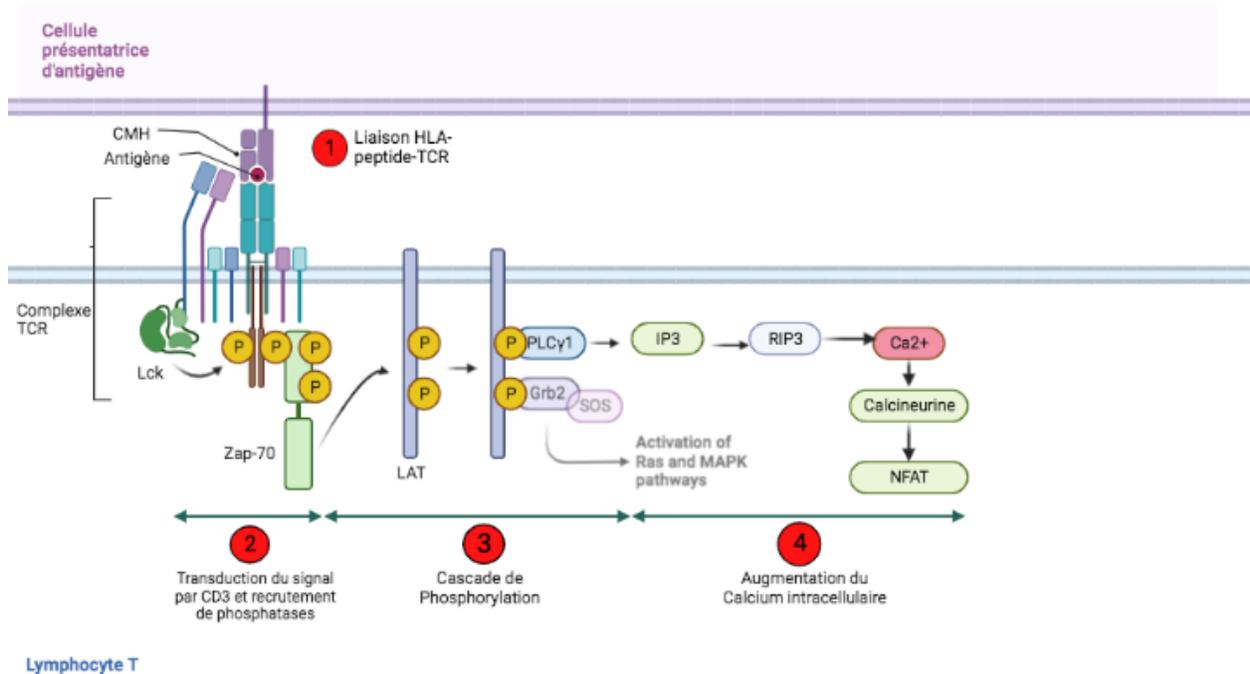


Figure 1. – Schéma représentatif du premier signal d'activation du lymphocyte T.

La signalisation du lymphocyte T est enclenchée après la reconnaissance du peptide présenté sur la molécule d'HLA de la cellule présentatrice d'antigène. Le signal est ensuite transduit par le complexe CD3 qui active une cascade de phosphorylation induisant une augmentation du calcium intracellulaire, qui a pour conséquence la translocation de facteurs de transcription responsables de l'activation du lymphocyte T.

Une autre voie de signalisation a été identifiée comme importante dans l'activation du lymphocyte T, et est représentée par la voie phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K)/Akt et de l'effecteur en aval : la Mammalian Target of Rapamycin (mTOR). Cette voie fait suite aux trois

précédents signaux et joue un rôle dans la survie, prolifération, et métabolisme du lymphocyte T. (19, 20) La mTOR activée phosphoryle les deux protéines S6K (Ribosomal Protein 6 Kinase) et 4EBP1 (Eukaryotic Initiation Factor 4E Binding Protein 1) qui sont responsables d'une augmentation de la synthèse protéique, qui à son tour induit la prolifération et la croissance cellulaire. (21)

En réponse à la reconnaissance du complexe peptide-CMH, les lymphocytes naïfs circulant dans la périphérie et exprimant la molécule d'adhésion CD62L, la phosphatase CD45RA, ainsi que le récepteur de chimiokines CCR7, s'activent, et prolifèrent pour se différencier en lymphocytes effecteurs tout en perdant l'expression des deux molécules CD62L et CCR7. Une proportion des lymphocytes T se différencie en précurseurs mémoires capables de générer des lymphocytes mémoires qui offrent une protection à long terme, et dont la survie et prolifération est plus grande. Il existe plusieurs types de lymphocytes T mémoires : Les LTs mémoires effecteurs ou Tem, qui perdent l'expression des molécules CCR7 et CD62L et qui migrent rapidement au tissu inflammé afin d'exercer leurs effets effecteurs immédiats après une seconde rencontre avec l'antigène. Ces derniers expriment la phosphatase CD45RO. Les LT mémoires centraux ou Tcm, quant à eux, résident dans les ganglions lymphatiques tout en continuant d'exprimer le CD62L et CCR7. Quant au Tscm, qui expriment le CD62L ainsi que le CD45Ra, ils possèdent les mêmes propriétés que les LTs mémoires qui ont un potentiel d'auto-renouvellement et de prolifération similaire à celui des lymphocytes T mémoires. (22)

1.3. Limites de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques

1.3.1. Maladie de Greffon contre l'hôte :

La GVHD aiguë représente 2^e cause de mortalité suite à une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. (23) La fréquence de sa survenue est estimée entre 40 à 60% chez les patients recevant une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Elle touche le foie, la peau, les intestins, les poumons et le système nerveux central et est habituellement diagnostiquée 3 à 12 semaines après la greffe dans sa forme aiguë (touchant surtout la peau, le

foie et l'intestin). (24) Elle est causée par la reconnaissance par les lymphocytes T du greffon de différences dans les antigènes majeurs ou mineurs d'histocompatibilité entre le donneur et le receveur et se déroule en 5 phases : La première résulte de la reconnaissance des signaux de danger tels que l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) et la nicotine adénine dinucléotide, libérés suite aux dommages induits sur les tissus par les radiations et la chimiothérapie administrés lors du régime de conditionnement pré-greffe. Ces signaux de danger induisent l'activation et la maturation de cellules présentatrices d'antigènes. Ces mêmes dommages induisent également la libération de cytokines pro-inflammatoires qui amplifient la cascade d'activation. D'autres signaux de danger peuvent induire le même signal, étant les lipopolysaccharides transloqués à travers l'épithélium gastro-intestinal endommagé, qui activent les récepteurs Toll-Like, favorisant ainsi la production de cytokines. La deuxième étape consiste en une réponse adaptative spécifique qui résulte de la reconnaissance des allo-antigènes présentés par les molécules HLA par les lymphocytes T du donneur en cas d'incompatibilité. Aussi, la reconnaissance des antigènes mineurs d'histocompatibilité (miHA) peut induire le même signal d'activation du lymphocyte T et ce, même en absence de mismatch ou incompatibilité HLA entre donneur et receveur. La 3^e étape fait suite à l'activation du lymphocyte T par sa prolifération et différenciation en populations naïves, effectrices, mémoires, régulateurs, ou même helper et cytotoxiques, dépendamment du milieu cytokinique. Les lymphocytes T activés migrent donc vers les organes lymphoïdes secondaires afin de cibler les différents tissus tels que la peau, le foie et les intestins. Enfin, les lymphocytes induisent des dommages aux tissus par une action cytotoxique directe. Cette activité est principalement médiée par la voie Fas et perforine-granzyme. Il a été rapporté que la voie de la mort par TNF était très peu utilisée dans la GVHD, au contraire de la GVL. (24) Ainsi, l'utilisation des médicaments inhibant l'activation du lymphocyte T tels que les inhibiteurs de la calcineurine, dont le tacrolimus, parfois associés à d'autres médicaments immunosuppresseurs tels que la rapamycine ou le méthotrexate, représente le meilleur moyen de traiter ou prévenir la GVHD.

1.3.2. Rejet de greffe :

Le rejet de greffe est une complication de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques rare, mais qui peut être fatale. Elle est définie par une réactivité des cellules résiduelles du receveur contre celles du donneur et est conditionnée par la compatibilité HLA

entre les deux individus. (25) Plusieurs facteurs peuvent contribuer à la survenue d'un rejet : L'absence de traitement immunosuppresseur ou myéloablatif avant la transplantation, une allo-immunisation liée aux transfusions multiples et aux grossesses, et surtout, la disparité dans la compatibilité HLA entre le donneur et receveur. (26) (27)

En effet, Les rejets de greffe de cellules souches hématopoïétiques sont fréquemment retrouvés dans les greffes de moelle allogénique HLA non identiques ou HLA identiques et non apparentées. A contrario, ils sont rares dans la greffe HLA-identique apparentée du fait d'une administration d'un conditionnement myéloablatif pré-greffe intense. (28) Elle est responsable de perte du greffon et est définie cliniquement par une pancytopénie et une diminution de la cellularité de la moelle osseuse.

Le rejet de greffe est une complication potentiellement mortelle. Les stratégies actuelles reposent donc sur sa prévention par l'administration d'une médication immunosuppressive car il existe peu d'approches thérapeutiques standardisées pour son traitement efficace une fois installé. (25)

Chapitre 2 – Prévention de GVHD et de rejet

2.1. Drogues immunosuppressives :

La maladie du greffon contre l'hôte et, plus rarement le rejet de greffe, contribue significativement à la morbi-mortalité chez les patients recevant une greffe de moelle osseuse. Les deux phénomènes se produisent suite à une activation de lymphocytes T du receveur par alloréactivité de ces derniers contre le greffon ou des lymphocytes T du donneur contre les cellules du receveur. À cet effet, l'utilisation d'immunosuppresseurs ciblant les processus biochimiques et moléculaires de l'activation des lymphocytes T est une stratégie qui a démontré son efficacité à la fois préventive, mais également thérapeutique. (29) En effet, à l'instar de la thérapie d'induction dans les greffes solides, une immunosuppression préalable est nécessaire avant une transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Aussi, l'utilisation des inhibiteurs de la calcineurine est obligatoire jusqu'à la survenue d'une tolérance immunologique. (29)

Du fait que la maladie du greffon contre l'hôte mette en jeu le pronostic vital du patient, la bonne combinaison d'immunosuppresseurs est nécessaire pour le succès d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques. La rapamycine peut être utilisée en association avec un inhibiteur de la calcineurine ou le cyclophosphamide administré post-transplantation. (30) Aussi, la combinaison tacrolimus avec rapamycine ou méthotrexate a également été rapportée comme stratégie efficace et bien tolérée. (31)

2.1.1. Tacrolimus :

En clinique, le tacrolimus ou FK506 est un immunosuppresseur utilisé en première ligne dans la prévention du rejet allogénique et le traitement de certaines maladies auto-immunes. (21) L'utilisation du tacrolimus s'étend à son utilisation pour la prévention de GVHD dans les transplantations haplo-identiques. (32) Il s'agit d'un macrolide très puissant, dont l'activité immunosuppressive in vitro et in vivo est 10 à 100 fois plus efficace que celle de la cyclosporine, un immunosuppresseur fréquemment utilisé. (33, 34)

L'utilisation de cette drogue n'a été introduite dans les études cliniques qu'à la moitié des années 1990 dans la prophylaxie de la GVHD post-HSCT. (35) (36) La cible du tacrolimus étant la calcineurine, elle agit sur cette dernière par la formation d'un complexe avec la protéine FK-Binding-Protein 12 ou FKBP12, qui est la protéine d'intérêt dans notre projet. L'immunosuppression induite par le tacrolimus est exclusivement dépendante de cette dernière (37) et le mécanisme d'action exact sera détaillé plus tard (Chapitre 2.2.1).

Le tacrolimus est métabolisé par le cytochrome P450 (CYP) 3A, et est transporté hors des cellules par la pompe d'efflux à glycoprotéines P (P-gp).(31) Les polymorphismes génétiques liés à ces deux derniers peuvent donc influencer l'absorption et la distribution tissulaire du tacrolimus. Ceux-ci sont à l'origine des différences pharmacocinétiques entre les individus et nécessitent un monitoring des concentrations plasmatiques afin de minimiser les effets indésirables. (38, 39) Aussi, les interactions médicamenteuses entre les modulateurs du CYP3A et le tacrolimus peuvent être une cause de variabilité de la concentration du tacrolimus dans le sang des patients. (31) De plus, des concentrations cibles du tacrolimus réduisent le risque d'une GVHD. En effet, une concentration entre 10 et 15 ng/ml serait optimale pour la prévenir (40)

Bien que ses bénéfices aient été démontrés, l'administration du tacrolimus n'est pas dénuée d'effets indésirables chez les patients recevant une greffe de cellules souches hématopoïétiques : La néphrotoxicité étant la plus commune, ainsi qu'une neurotoxicité réversible, dont les mécanismes physiopathologiques sont peu connus. (41) (42)

2.1.2. Rapamycine ou sirolimus:

La rapamycine est une lactone macrocyclique obtenue par fermentation de certaines souches de *Streptomyces Hygroscopius*, qui est utilisée comme immunosuppresseur seul ou en combinaison avec les inhibiteurs de la calcineurine dans la prise en charge de la GVHD (43) à une dose recommandée entre 5 à 10 ng/ml. (43) Bien qu'elle soit structurellement similaire au Tacrolimus, la rapamycine a un mécanisme d'action différent : Elle forme un complexe avec la famille de protéines intracellulaires FK-506 binding proteins (FKBP) qui inhibe la protéine mTOR, une protéine kinase qui régule la translation de l'ARNm et la synthèse protéine dans l'étape de division et la prolifération cellulaire. (21) La rapamycine permet également d'inhiber l'entrée des

lymphocytes en division cellulaire en réponse à l'interleukine-2, menant à leur apoptose. (44) Du fait de l'absence d'action sur la calcineurine, elle peut être utilisée comme une alternative au tacrolimus en immunothérapie. (45) (43)

De plus, la rapamycine et le tacrolimus se lient aux protéines FKBP à différents sites, et utilisent des mécanismes d'action différents. Elles agissent donc en synergie et l'efficacité de leur combinaison a déjà été démontrée par une meilleure efficacité d'immunosuppression et une moindre toxicité comparativement aux autres combinaisons. (43) Le sirolimus a plusieurs actions, dont l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD8+, de la présentation d'antigènes ainsi que la maturation des cellules dendritiques. (43) (46) Aussi, il favorise la génération des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+FoxP3+ tout en inhibant les LT conventionnels, diminuant ainsi le risque de survenue de la GVHD tout en préservant l'effet antitumoral. (43)

Contrairement au tacrolimus dont l'application clinique n'est limitée qu'à l'immunosuppression, la rapamycine peut être utilisée dans le traitement de cancers du fait de son effet inhibiteur de la prolifération cellulaire par son action inhibitrice sur la mTOR. En effet, elle a montré son activité antinéoplasique dans les leucémies aiguës lymphoblastiques, myéloïdes aiguës et chroniques. (43) Elle a également une activité antivirale anti-CMV et anti-EBV et inhibe la croissance tumorale dans les lymphomes de Burkitt liés à EBV. Elle est également utilisée dans le traitement de PTLN. Cependant, ses effets toxiques sont cependant nombreux : Cytopénie, pneumonies interstitielles, ulcères et néphrotoxicité. (43) (47)

2.2. FKBP12 :

La protéine FKBP12 est une protéine hautement conservée au cours de l'évolution chez les eucaryotes. (48) Sa présence est essentielle à la vie, puisqu'il a été démontré que des souris dont le gène FKBP12 est invalidé meurent au stade embryonnaire et manifestent plusieurs malformations cardiaques.(49) Bien qu'identifiée initialement dans les cellules immunitaires pour son rôle inhibiteur des phosphatases activées par le calcium ou calcineurine (50), la protéine FKBP12 est ubiquitaire et a plusieurs fonctions : Elle représente la sous-unité de deux canaux calciques intracellulaires: inositol 1,4,5-triphosphate et les récepteurs à la ryanodine et de la sous

unité du récepteur de type I du TGFβ dont elle inhibe l'activité basale. (51) La protéine FKBP12 a également une activité peptidyl-prolyl cis-trans isomérase (rotamase) (52)

2.2.1. FKBP12 comme immunophiline :

Initialement, le FKBP12 a été décrit comme la cible du FK506 ou tacrolimus et de la rapamycine (52). Ces dernières se lient d'une manière non covalente et inhibent son activité rotamase. (53) L'action immunosuppressive des drogues n'est pas directement liée à l'inhibition du FKBP12 per se, mais aux cibles d'action des deux immunosuppresseurs qui se trouvent être liées à la FKBP12. (21) En effet, le complexe FK506-FKBP12 se lie à la calcineurine (54) et bloque l'accès du NFAT à son site catalytique, prévenant ainsi sa déphosphorylation et par conséquent, l'activation du lymphocyte T. (17) Tandis que le complexe Rapamycine-FKBP12 inhibe la prolifération des lymphocytes T stimulés par les cytokines en se liant à la protéine mTOR et en inhibant la fonction kinase du p70^{s6k}, induisant une up-régulation du cdk inhibiteur p27^{Kip1}, bloquant ainsi la progression de la phase G1 à S, ainsi la synthèse protéique stimulée par les cytokines. (21) (37, 45)

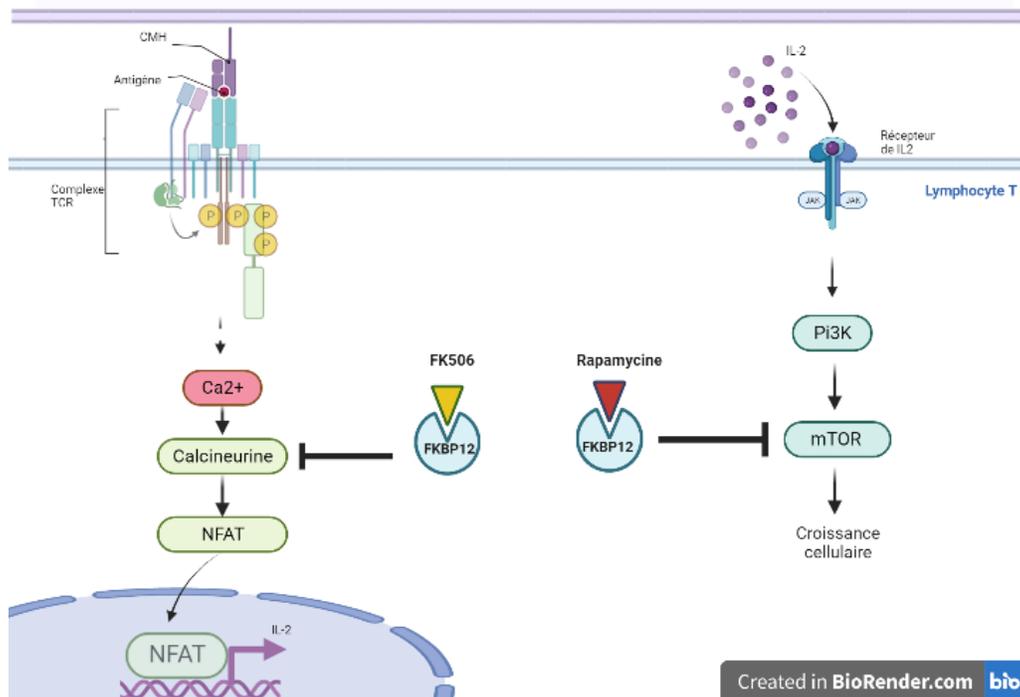


Figure 2. – Mécanisme d'action du tacrolimus et de la rapamycine dans l'activation du lymphocyte T.

Le complexe FKBP12-FK506 inhibe la calcineurine, et par conséquent le signal 1 d'activation du lymphocyte T. Le complexe FKBP-rapamycine agit sur la mTOR en inhibant le signal 3 et la prolifération cellulaire. Figure adaptée de Tong M *et al*, 2015 et réalisée sur le site Biorender.com. (21)

2.2.2.FKBP12 comme régulateur du cycle cellulaire :

En 1994, l'interaction cytoplasmique entre l'immunophiline FKBP12 et les récepteurs de type I du TGF β a initialement été décrite : La FKBP12 serait un inhibiteur naturel du récepteur TGF β RI et se lierait à son motif riche en glycine et sérine. Cette liaison n'inhibe pas directement le récepteur, mais bloque sa phosphorylation par le TGF β RII, le rendant ainsi inactif. (55) Ainsi, par un mécanisme de compétition inhibitrice, la liaison du tacrolimus ou de la rapamycine au site actif du FKBP12 empêche ce dernier d'exercer son action inhibitrice sur le récepteur TGF β RI. Plus précisément, il a été démontré que l'ajout de la rapamycine inversait l'effet inhibiteur du FKBP12 sur le récepteur TGF β RI. (56)

Plus tard, en 2001, le rôle physiologique du FKBP12 dans l'arrêt du cycle cellulaire a été mis en évidence. En effet, les cellules fibroblastiques FKBP12 KO manifestaient un arrêt du cycle cellulaire en G1, qui était réversible suite à l'adjonction du FKBP12. Cet arrêt résultait d'une hyperactivation du récepteur du TGF β , même en absence de son ligand, résultant en une hyper-régulation du p21 qui, à son tour, agit sur la croissance cellulaire. La voie de signalisation responsable est la voie SMAD. De plus, les taux de phosphorylation de SMAD2/3 ainsi que la translocation du SMAD4 dans le noyau étaient diminués dans les cellules FKBP12KO, et ceci était dû à l'hyper-régulation du SMAD7 qui sort du noyau en présence du TGF β . Aussi, la quantité de p38 phosphorylée et activée était largement augmentée dans ces cellules et ce, d'une manière indépendante de la présence du TGF β (51) Il a été également démontré que le FKBP12 serait un régulateur négatif de l'endocytose du TGF β R. En somme, bien que l'interaction du FKBP12 avec

les récepteurs du TGF β R ait été décrite, le rôle global de la perte de la protéine FKBP12 sur l'action du récepteur reste encore incertain. (57)

2.2.3. FKBP12 et les canaux calciques :

Au-delà de son rôle en tant qu'immunophiline, la protéine FKBP12 s'associe à d'autres récepteurs membranaires dans la cellule. En effet, dans le muscle, la FKBP12 interagit avec les récepteurs de ryanodine (RyRs) (58-60) qui représentent une classe de canaux calciques qui médient la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique au cytoplasme au cours de la contraction musculaire. (21) Cependant, le FKBP12 n'agit pas comme une protéine chaperone car, en son absence, les récepteurs à la Ryanodine demeurent correctement assemblés et présentés sur le réticulum endoplasmique. (59) La liaison de FKBP12 avec ces récepteurs peut également inclure la calcineurine et les trois forment alors un complexe. (61)

Aussi, du fait que la liaison FKBP12-RyR puisse être modulée par le FK506 et la rapamycine par un phénomène de compétition, induisant ainsi une réduction de la contractilité musculaire (21), il a été suggéré que le FKBP12 aurait un rôle de stabilisation de la conformation de ces canaux calciques par l'augmentation du seuil d'ouverture du canal. (62) Le mécanisme exact de ce phénomène reste cependant inconnu.

Le FKBP12 se lie également à un autre canal calcique nommé Inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃R) qui est structurellement et fonctionnellement apparentée aux récepteurs à la ryanodine (61) dont le rôle est la libération du calcium du réticulum endoplasmique au cytosol et mitochondries en réponse à l'inositol triphosphate (IP₃) (21) A noter que la calcineurine est également liée au complexe FKBP12- IP₃R. (61) Aussi, la liaison du tacrolimus et de la rapamycine au site actif du FKBP12 empêche cette dernière d'exercer son rôle modulateur sur la conformation de ces canaux calciques, pouvant expliquer l'influx de calcium spontané survenant lors de l'ajout de ces deux drogues. (61)

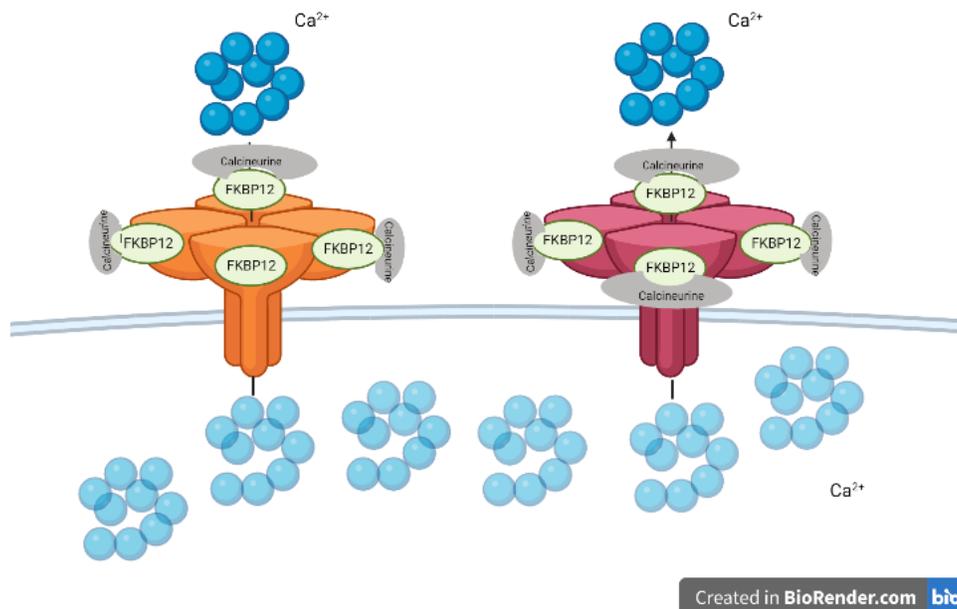


Figure 3. – FKBP12 et les récepteurs calciques.

Les récepteurs de ryanodine RYR ainsi que IP3R portent 4 sites de liaison au FKBP12. L'attachement de ce dernier joue un rôle dans les influx calciques du réticulum sarcoplasmique au cytoplasme. La calcineurine, par son attachement à la FKBP12, peut également former un complexe avec les récepteurs IP3R. Figure adaptée de Tong M *et al*, 2015 et réalisée sur le site Biorender.com. (21)

2.2.4. FKBP12 comme responsable de nécroptose :

La FKBP12 joue un rôle dans la nécroptose médiée par le récepteur du facteur de nécrose tumorale "TNFR1". Cette forme de mort cellulaire programmée est impliquée dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques, tels que les maladies auto-inflammatoires. La protéine FKBP12 induit une expression des RIPK1 et RIPK3 qui, lorsque phosphorylés, induisent la formation du nécrosome et par conséquent une nécroptose suite à une activation de la voie RIPK1-RIPK3-MLKL. Dans un modèle de syndrome de réponse inflammatoire systémique induit par le TNF, un knock-out du FKBP12 protège les cellules de la mort. (63)

Chapitre 3 – Émergences et réactivations virales dans un contexte d'immunosuppression

Les infections et réactivations virales représentent une cause importante de morbidité dans les suites d'une transplantation de cellules souches allogéniques, particulièrement chez les patients recevant de fortes doses d'immunosuppression pour la prévention de la maladie de greffon contre hôte (GVHD). Parmi les infections et réactivations les plus fréquentes, et en lien avec les travaux présentés dans ce mémoire, nous discuterons des atteintes liées aux virus cytomégalovirus humain, Epstein-Barr virus, BK virus et l'adénovirus.

3.1. Adénovirus :

Les adénovirus ou AdV sont des virus non enveloppés, à ADN double brin, qui ont été isolés pour la première fois en 1953. (64) Il existe 86 types, qui sont classés en 6 sous-groupes (A-G) en fonction des hémagglutinines de surface, de l'homologie de l'ADN, et de la symptomatologie clinique (65). L'ADN est enveloppé d'une pseudo-capside de conformation icosaédrique dont les facettes sont recouvertes de protéines de surface appelées Hexons. Quant aux capsomères aux sommets, ils sont constitués par des pentons prolongés par une fibre terminée par l'antigène Y, responsable de la propriété d'hémagglutination. Ces deux protéines jouent un rôle important dans les stades initiaux de l'infection, car elles représentent les cibles majeures de la réponse immune vis-à-vis du virus. (66) Son cycle de vie débute par son attachement à la cellule cible à travers les fibres des pentons qui se fixent principalement sur le récepteur "coxsackievirus B et adénovirus", présent à la surface de plusieurs tissus chez l'humain. Cette étape est suivie d'une internalisation, décapsidation de la pseudo-capside, translocation, assemblage et libération des nouveaux virions. (67)

L'infection virale à adénovirus est une cause de morbi-mortalité importante chez les patients recevant une transplantation de cellules souches. Sa fréquence est de 2 à 9% chez les receveurs adultes et 15-23% chez les enfants (68) avec une incidence globale entre 3 et 47% des patients transplantés avec cellules souches hématopoïétiques. (69) La fréquence de survenue est

plus importante chez les patients ayant reçus des transplantations allogéniques, des greffons déplétés de lymphocytes T, ou présentant une maladie de greffon contre l'hôte. (69) Chez les patients transplantés de cellules souches hématopoïétiques, l'infection est souvent asymptomatique, mais peut se présenter sous forme d'infections respiratoires, de colites hémorragiques, de pneumonies, hépatites, néphrites nécrosantes tubulo-interstitielles, cystites hémorragiques, conjonctivites, et d'encéphalites. La transmission se fait par inhalation de gouttelettes, par contact direct, indirect ou par voie oro-fécale. (69) L'infection peut être de novo, en particulier chez les enfants, ou la conséquence d'une réactivation d'une infection latente. (69) En effet, les adénovirus peuvent être latents et asymptomatiques et les tissus lymphoépithéliaux en sont le réservoir. (70) Ils peuvent être détectés dans les amygdales, l'appendice, les nodules lymphoïdes, ainsi que les fibroblastes et les lymphocytes B. (71) Les adénovirus peuvent également être associés à une perte du greffon ou une prise du greffon retardée. (69)

Plusieurs agents pharmacologiques antiviraux tels que le cidofovir, ribavirin et ganciclovir sont utilisés pour le traitement des infections à adénovirus chez les patients transplantés, mais ont une efficacité limitée. La réduction des immunosuppresseurs pourrait être une option thérapeutique, mais le risque de survenue de GVHD rend cela hasardeux. (69) Les premières stratégies d'immunothérapies consistaient à l'infusion de lymphocytes T du donneur (DLI), mais étaient limitées par l'aggravation de GVHD. De plus, le faible taux de lymphocytes T spécifiques à l'adénovirus dans cette approche limitait son efficacité. (69) Ceci a conduit à la génération ex vivo de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques à adénovirus, dont l'efficacité a été prouvée. (72) Cette stratégie trouve maintenant son utilité en clinique. (73, 74)

3.2. Cytomégalovirus humain (HCMV) :

Le virus CMV humain est un virus à ADN qui appartient à la famille des herpèsvirus. Sa structure comporte un ADN linéaire à double brin, emballé dans une capsidie ayant une conformation icosaédrique qui est entourée d'une matrice de phosphoprotéines appelée tégment, et une enveloppe lipidique recouverte de glycoprotéines. (75) Le tégment contient la majorité des protéines de virions, et la plus abondante de ces dernières est la phosphoprotéine 65 (pp65),

aussi nommée unique long 83 (UL83). (76) Le cycle de vie du HCMV dans une cellule humaine débute par l'interaction des glycoprotéines du virus (Exemple : les glycoprotéines h ou gH, glycoprotéines B ou gB) avec leurs récepteurs à la surface des cellules cibles (Exemple : Facteur de croissance des dérivés des plaquettes α ou Platelet-derived growth factor α) suivie par la fusion de l'enveloppe du HCMV avec la membrane cellulaire, une décapsidation et une libération de l'ADN viral dans le noyau, et enfin une biosynthèse de nouveaux virions. (77)

L'infection au virus HCMV est la complication virale la plus fréquemment retrouvée chez les patients recevant une transplantation de cellules souches hématopoïétiques, mais également la plus redoutée, car elle est associée à une morbi-mortalité non liée aux rechutes qui est importante (78), avec un impact plus important si la sérologie est positive chez le receveur. (79) Le degré de morbidité résulte de l'effet direct du HCMV sur les organes tels que le poumon, la rétine et le tractus gastro-intestinal, qui est aggravé par la toxicité des médicaments antiviraux et les effets immunomodulateurs du HCMV. (80) L'infection au CMV est également considérée comme un facteur de risque de survenue d'infections bactériennes et fongiques ainsi que de la maladie du greffon-contre-hôte. (54) La majorité des infections ont lieu durant la petite enfance ou à l'adolescence. Après une infection primaire, le virus demeure latent dans les monocytes, lymphocytes, les cellules dendritiques immatures ainsi que les cellules de moelle osseuse CD34+. (75) Lors de la reconstitution immunitaire en post-HSCT, la présence de lymphocytes T CD4+ et CD8+ spécifiques du CMV a un rôle primordial dans le contrôle de la réactivation et leur absence a été associée à une mortalité importante. (78)

La première ligne de prévention et de traitement de l'infection à CMV après HSCT repose sur les antiviraux tels que le ganciclovir, le cidofovir et plus récemment le letermovir et maribavir, administrés dès lors que le statut sérologique est positif. Cependant les effets indésirables de ces agents pharmacologiques sont divers. (78) Le transfert adoptif de lymphocytes T anti-CMV est une stratégie qui a également démontré son efficacité dans le traitement et la prévention de réactivations virales dans de nombreux essais cliniques. (81-88) Il existe différentes approches expérimentales pour la génération de ces dernières, telles que la stimulation ex-vivo de lymphocytes T par des protéines virales, ou l'isolation de LTs obtenus d'un donneur HLA-compatible CMV séropositif par capture d'IFN γ , un procédé de séparation se basant sur la

capacité des lymphocytes T spécifiques à sécréter la cytokine en présence des peptides virales, ou par isolation avec des multimères HLA qui permettent de sélectionner des répertoires de lymphocytes T spécifiques de CMV par liaison des TCR aux monomères HLA chargés du peptide viral CMV. (78, 89) Également, l'utilisation de donneurs de 3^e partie (Third party donors, c'est-à-dire des donneurs tiers n'étant ni le receveur, ni le donneur original de greffe de cellules souches) pour la création d'une "banque" de lymphocytes T "off the shelf" est avantageuse, mais comporte le risque de survenue de la GVHD chez les receveurs. (78) Aussi, l'incompatibilité d'un ou plusieurs allèles HLA peuvent induire un rejet des cellules injectées par l'hôte. (89) Enfin, la génération de lymphocytes T CMV-spécifiques à partir de sang de cordon ombilical a démontré une plus grande efficacité envers les épitopes atypiques du virus. (90)

3.3. Virus Epstein-Barr :

Le virus Epstein-Barr, découvert en 1964 suite à sa détection par microscopie sur des cultures de tissus de lymphome de Burkitt, fait partie de la famille des herpes virus et est ubiquitaire. Il infecte 50-89% des enfants et plus de 90% de la population adulte. (91) Il cause la complication la plus redoutée post-HSCT par la survenue de la maladie lymphoproliférative post-transplantation (PTLD), dont la mortalité est significative. (92)

Le génome viral est enveloppé d'une nucléocapside qui, à son tour, est enveloppée d'une enveloppe virale. Ce génome code pour une centaine de protéines virales qui ont un rôle dans la régulation de l'expression des gènes viraux, la réplication de l'ADN viral ainsi que la modulation de la réponse immune. (91)

L'infection est contractée par sécrétions orales. Le virus se multiplie ensuite dans les cellules épithéliales de l'oropharynx. L'infection des cellules épithéliales a pour conséquence une réplication active avec production des virus et lyse de la cellule infectée. Le virus peut également se lier à son récepteur CD21 sur les lymphocytes B par la glycoprotéine de son enveloppe gp350. L'infection des lymphocytes B par le virus induit une circularisation de l'ADN linéaire, qui demeure ensuite latent et persistant dans le corps. Au cours de cette latence, le virus réduit le nombre de

gènes codant pour les protéines virales qui permettent la reconnaissance des cellules infectées par les cellules cytotoxiques. (91)

Les deux protéines virales les plus importantes sont EBNA et LMP-1. L'antigène EBV nuclear antigen 1 (EBNA) se lie à l'ADN viral et permet au génome de garder sa conformation circulaire dans le lymphocyte B. Les antigènes EBNA-2 et 3, quant à eux, augmentent l'expression de la protéine LMP1 et 2. Le LMP-1 est un oncogène qui induit un signal similaire à celui du CD40 sur le lymphocyte B. Son expression induit une activation du facteur nucléaire NFκB, une activation de la signalisation et une augmentation d'expression des molécules d'adhésion, conduisant à une prolifération des lymphocytes B. Le LMP-2 prévient la réactivation de EBV, et confère également aux lymphocytes B une résistance à l'apoptose. (91) Le virus EBV contient également des ARN viraux non traduits, appelés "non translated types of EBV-encoded RNA" ou EBER, qui ne codent pour aucune protéine, mais qui ont un grand rôle dans l'oncogénèse et la résistance à la mort programmée. (91) Ces protéines sont associées à plusieurs types de latences du virus EBV, qui, à leur tour, sont également associés à plusieurs cancers. (93)

La maladie lymphoproliférative associée à EBV est retrouvée chez des patients atteints de déficiences immunitaires primaires ou acquises. Elle représente ainsi une limite pour l'utilisation des immunosuppresseurs suite à une transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Elle se développe à partir d'un répertoire naïf, mémoires ou de centres germinaux atypiques de lymphocytes B, et l'oncogène LMP-1 est le plus impliqué dans la transformation de ces lymphocytes en cellules cancéreuses. De plus, le déséquilibre entre les cellules B infectées par EBV et les cellules T spécifiques à EBV favorise le développement d'une maladie lymphoproliférative. (93)

Au cours de la dernière décennie, les traitements de la maladie lymphoproliférative liée à EBV reposaient sur la restauration de la balance entre lymphocytes T virus spécifiques et lymphocytes B infectés par EBV. L'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant les lymphocytes B tels que l'anti-CD20 représente la stratégie la plus utilisée. L'utilisation de lignée de lymphocytes T cytotoxiques anti-EBV dérivés du donneur a également prouvé son efficacité. L'utilisation de ces lymphocytes T a prouvé son efficacité à court terme, dans la diminution de la charge virale d'EBV,

mais également à long terme dans la prévention de la progression vers la maladie lymphoproliférative. (94-96)

3.4. BK virus :

Le BK polyomavirus est un virus à ADN non enveloppé, dont la séroprévalence est très élevée chez la population générale. Il est la cause prédominante de cystites hémorragiques et de néphropathies chez les patients receveurs de cellules souches hématopoïétiques, mais peut se manifester sous forme de dysfonction rénale sans cystite hémorragique. (97) L'incidence de cystites hémorragiques chez ces receveurs est de 7-54% et 8-25% pour les adultes et enfants respectivement et est plus fréquemment observée lors de la greffe allogénique, comparativement à celle autologue. Il a été suggéré que la cause de la pathogenèse était dû à l'allo-immunité de la greffe plus qu'à la virémie du virus BK à proprement dit. (98)

Le BK polyomavirus possède 3 protéines de structure : VP1, VP2 et VP3, dont le VP1 qui représente la protéine de capsid majeure. Cette capsid a une conformation icosaédrale qui comprend plus de 360 molécules VP1 organisés en pentamères ou les protéines VP1 se lient avec une protéine mineure interne (VP2 ou VP3) liant le génome circulaire. (99)

Chez les receveurs de HSCT, les réactivations virales du BK virus sont fréquentes et sont associées à la survenue de cystites hémorragiques. (98) La primo-infection au BK virus survient généralement au cours de l'enfance, et peut être soit asymptomatique ou peut se présenter sous forme de symptômes indiscernables des autres infections virales. (100) Le BK virus reste ensuite sous forme latente dans les cellules urothéliales. Le développement de la cystite hémorragique liée au BK virus se déroule en 3 phases : Une atteinte mucoale de la vessie causée par le conditionnement pré-transplantation, puis une réactivation du BKV latent dans les cellules urothéliales favorisée par l'immunosuppression, et enfin, la reconstitution immunitaire initie une blessure urothéliale médiée par les cellules immunitaires ou *immune-mediated urothelial injury* qui aboutit à une cystite hémorragique. (101)

Bien qu'aucune drogue pour BKV n'ait été approuvée ou testée en essais cliniques randomisés, le cidofovir est administré chez les patients atteints de cystite hémorragique associée au BK virus.

Cependant, les effets indésirables restent nombreux et incluent la myélotoxicité et la néphrotoxicité. (102) Actuellement, l'utilisation des lymphocytes T spécifiques de virus est une stratégie qui a également démontré son efficacité pour le BK virus. (103)

Chapitre 4 – Thérapie génique dans les immunothérapies adoptives anti-tumorales :

Le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde après les maladies cardiovasculaires. Il existe plusieurs stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses utilisées en clinique qui permettent d'induire un taux de rémission important. L'avènement des immunothérapies et leur utilisation adjointe ont démontré leur efficacité dans le traitement certains cancers. En effet, l'efficacité de cette approche est maintenant prouvée dans le traitement de plusieurs cancers du sang (104)

Sa première application clinique en hémato-oncologie date des années 1990, par l'infusion de lymphocytes allogéniques du donneur à des patients ayant des récives de leucémies après une greffe de cellules hématopoïétiques allogéniques. (3, 105) Plus tard, l'avènement des techniques de thérapie génique ont permis la redirection de la spécificité des lymphocytes et plusieurs approches ont été mises en place tels que les TCR transgéniques, basés sur la modification du TCR pour l'obtention d'une plus grande affinité pour les antigènes tumoraux ou TAA, ainsi que l'utilisation de lymphocytes à récepteurs antigéniques chimériques, qui consiste à faire exprimer un récepteur artificiel, spécifique à l'antigène tumoral, dont la principale particularité revient à son activité anti-tumorale sans restriction au CMH. (106) (107)

La thérapie génique dans les immunothérapies adoptives est également utilisée dans le but d'améliorer l'efficacité et la persistance des lymphocytes. (108) Ainsi, l'utilisation de nucléases pour la délétion ou l'insertion de gènes d'intérêt dans les lymphocytes T a révolutionné le monde de l'immunothérapie et les progrès scientifiques permettent maintenant d'utiliser les deux techniques en même temps. (109) Du fait de leur utilisation conjointe dans nos lymphocytes T, nous détaillerons donc, dans ce chapitre, ces deux approches.

4.1. Les CAR-T ou lymphocytes T à récepteurs antigéniques chimériques:

Ayant été décrits pour la première fois en 1989 (110) , les lymphocytes CAR-T sont des lymphocytes ayant été génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur artificiel spécifique à certaines protéines (antigènes) ou des cellules cancéreuses. (104) La principale particularité de cette thérapie revient à son activité anti-tumorale sans restriction au CMH. (107) Aussi, les CAR-T sont dotés d'une grande capacité de prolifération après leur injection chez les patients, de persistance, d'extension par leur circulation dans le sang, et de recrutement des cellules immunitaires non-CAR par le relargage des antigènes des cellules cancéreuses mortes, et ainsi, la présentation de ces derniers aux cellules présentatrices d'antigènes qui activent les lymphocytes T endogènes par un processus appelé Cross-Priming. (108)

4.1.1. Structure du CAR :

Le CAR est un récepteur synthétique composé de 4 domaines :

Un domaine de reconnaissance de l'antigène :

Ce domaine, appelé ectodomaine, est présent sur la membrane et est exposé à la matrice extracellulaire afin d'interagir avec la cible antigénique (111), cette dernière pouvant être exprimée à la surface de cellules ou être soluble. (112) L'affinité de ce domaine à l'antigène d'une manière HLA-indépendante est un paramètre clé dans l'efficacité du lymphocyte CAR-T. (107) (113) Les CAR peuvent ainsi se lier à des protéines, glycolipides et carbohydrates de surface. (114) Elle est constituée d'un fragment simple dérivé de la région variable des chaînes d'anticorps monoclonaux (scFv), constituée de chaînes lourdes (VH) ou légères (VL) d'immunoglobulines liées, le plus souvent, par des liaisons sérine-Glycine. (115) Comme pour les TCR, les CAR contiennent des boucles CD3 longues et variables. (114) Outre les anticorps monoclonaux, d'autres sources sont également utilisées dans les CAR en tant que domaine de reconnaissance, tels que les récepteurs de l'immunité innée, les récepteurs du TNF, les cytokines, ou des facteurs de croissance. (112)

Une région charnière ou Hinge region :

La région charnière est un domaine qui permet de lier le domaine de reconnaissance de l'antigène et le domaine transmembranaire. Il est aussi appelé "spacer", et les modules les plus utilisés sont le CD28 et le CD8a. Ce domaine permet aussi d'apporter une flexibilité au fragment ScFv du domaine de reconnaissance de l'antigène. (116)

Un domaine d'ancrage transmembranaire :

Ce domaine se situe entre la région charnière et le domaine de signalisation intracellulaire. Il est dérivé des molécules CD3- ζ , CD4, CD8 et parfois du CD28. Auparavant, les domaines transmembranaires étaient considérés comme non réactifs. Il a été ensuite prouvé qu'il jouait un rôle critique dans la fonction effectrice du CAR en le stabilisant grâce à sa structure hydrophobique en hélice alpha. Le domaine transmembranaire CD28 est le plus connu pour sa haute efficacité et sa stabilité. (111) Seuls les CARs avec un module transmembranaire CD3- ζ peuvent permettre au CAR de s'associer au complexe CD3 endogène. Ainsi, la présence d'un seul module CD3- ζ fait recruter 3 ITAMs seulement, comparativement au complexe TCR/CD3 qui en recrute de 10. La présence d'un module CD3- ζ dans ce domaine transmembranaire induit ainsi une persistance du lymphocyte T avec une signalisation tonique pouvant potentiellement induire un épuisement du lymphocyte T. (114)

Une ou plusieurs parties intracellulaires :

Ce domaine a pour rôle l'activation du lymphocyte et peut être composé d'un ou plusieurs domaines. En effet, les CARs de première génération contiennent un seul domaine d'activation, qui est le plus souvent la chaîne CD3- ζ ou, dans de rares cas, la chaîne γ des récepteurs Fc. (113) L'absence de co-stimulation et ainsi la faible capacité de signalisation de ces CAR-T a conduit à la génération de CAR-T contenant à la fois un domaine d'activation (CD3- ζ ou la chaîne γ des récepteur Fc), mais aussi un domaine de co-stimulation tels que le CD28, le CD137 ou 4-1BB ou le CD134 (OX40). (108, 117, 118).

Ces CAR-T induisent une meilleure sécrétion d'IL-2, prolifération et persistance avec une activité anti-tumorale plus efficace. (119) Le choix d'utilisation du CD28 ou du 4-1BB revient à la particularité du 4-1BB d'apporter une activité cytotoxique moindre, mais une persistance meilleure. Le CD28 est en effet responsable d'un épuisement des CAR-T plus important. (120) Bien que la majorité des études publiées utilisent des CAR de 2^e génération, il existe également des CAR de 3^e génération, qui sont composés d'un domaine de co-stimulation supplémentaire par rapport à ceux de la 2^e génération, mais n'ont pas démontré de meilleure efficacité. Tandis que ceux de 4^e génération, appelés : TRUCKs (T cells Redirected Universal Cytokine Product) sont équipés, en plus, d'un facteur appelé "nuclear factor of activated T cell-responsive expression", qui induit l'expression d'un transgène codant pour une cytokine tel que l'IL12 ou d'autres ligands de co-stimulation ou encore des domaines activateurs de la voie JAK-STAT3/5. (114) (118) Le choix de l'IL-2 revient à sa capacité à favoriser la différenciation des lymphocytes Th1 anti-tumoraux, et le recrutement de cellules immunitaires tels que les macrophages et les cellules NK. (121)

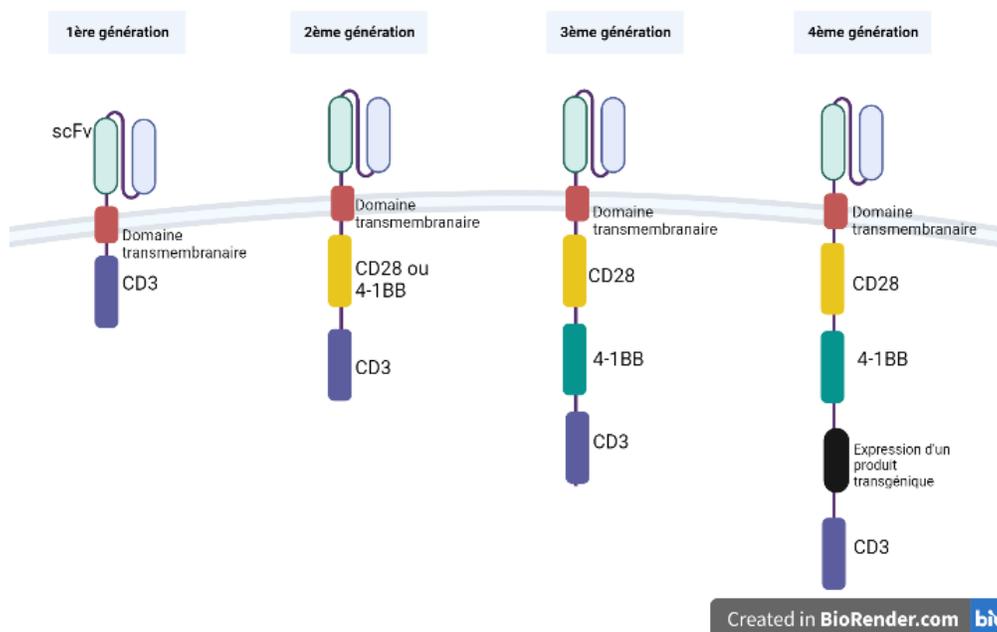


Figure 4. – Types de CAR-T cells en fonction de leurs modules intracellulaires.

Les CAR-T sont classés par génération de famille, en fonction des modules intracellulaires qu'elles contiennent : La première génération ne contient qu'un seul module CD3, tandis que ceux de 2^e

génération ont un module supplémentaire CD28 ou 4-1BB. L'ajout d'un deuxième module de costimulation a permis la génération de CAR de 3^e génération. Enfin, les CAR de 4^e génération, en plus des 3 modules intracellulaires CD3, CD28 et 4-1-BB, contiennent un facteur qui induit l'expression de transgènes codants pour des cytokines. Figure adaptée de Zhao Z *et al*, 2018 et réalisée sur le site Biorender.com. (118)

4.1.2. Signalisation des CAR-T cells :

En effet, après reconnaissance et liaison de l'antigène au domaine extracellulaire du CAR, ces derniers se regroupent et forment un cluster qui résulte en la transmission d'un signal d'activation pour le domaine intracellulaire. Le CD3- ζ constitue le principal domaine intracellulaire d'activation et d'induction de la production de cytokines visant à détruire la cellule tumorale ainsi que l'expression de récepteurs de cytokines permettant la prolifération des CAR-T. Elle recrute, à elle seule, sans intervention du CD3 endogène, 3 molécules d'ITAMs. La signalisation qu'elle induit est similaire à celle du TCR, mais quelques différences ont été rapportées : Un recrutement moins massif des phosphatases dû au nombre réduit d'ITAMs, un moins bon recrutement des co-récepteurs CD4-CD8, notion qui a été poussé quelques équipes à générer des chimeric-TAC ou Chimeric-T cell antigen coupler contenant, en plus du domaine de reconnaissance et un domaine CD3, un co-récepteur CD4. (122) Aussi, la réponse tonique de certains types de CAR-T induit une hyperactivation de la libération du calcium, menant ce dernier vers un profil d'épuisement et de différenciation terminale. Une autre différence réside dans une augmentation de la signalisation PI3K/Akt dans les CAR de 2^e génération contenant un module CD28, comparativement au CAR-41BB. (114)

4.1.3. Production des lymphocytes CAR-T :

La production des CAR-T se déroule en plusieurs phases, et nécessite d'abord l'isolation et sélection des lymphocytes T par aphérèse. Il est important que cette étape se fasse sans addition de facteur de stimulation des colonies granulocytaires ou GM-CSF afin d'exclure tout effet pouvant interférer dans la prolifération ou la réponse du lymphocyte T. (118)

Les cellules sont ensuite transduites à l'aide de vecteurs viraux ou non viraux, codants pour la molécule du CAR. Le choix du vecteur dépend de son efficacité, de la stabilité de

l'expression du transgène, et de son innocuité. En effet, les vecteurs viraux utilisés dont l'efficacité de transduction a été démontrée pour la production des CARs sont les lentivirus et rétrovirus. Cette méthode permet de livrer des transgènes larges avec une intégration aléatoire. Cette technique permet également une expression du gène stable et efficace. (123)

Pour les vecteurs non-viraux, il s'agit principalement des transposons (sleeping beauty transposons ou piggyBac), livrés par électroporation, capables de livrer de larges transgènes d'une façon moins couteuse. Cependant, l'insertion aléatoire de ces vecteurs représente un risque de survenue de mutations et de transformations malignes. (124) Enfin, l'insertion knock-in par CRISPR-CAS9, étant donné son risque réduit de mutagénèse insertionnelle par une intégration du transgène qui est spécifiques aux sites, est également utilisée. (123) (125)

Enfin, l'expansion des CAR-T, qui s'étend à 1 ou 2 semaines et qui repose sur l'utilisation de bioréacteurs pour un contrôle minutieux des conditions de culture et une croissance en grand nombre des cellules, ainsi que le contrôle de qualité du produit sont les étapes finales. (126)

4.1.4. Toxicité des CAR-T cells :

Malgré les grands bénéfices de l'utilisation des CAR-T cells en clinique (voir ci-après), ces derniers ne sont pas dénués de toxicité. En effet, deux types d'effets indésirables peuvent survenir et impliquent une surveillance attentive.

4.1.4.1. Syndrome de relargage cytokinique :

En effet, l'activation des lymphocytes T peut induire un syndrome de relargage cytokinique, considéré comme une complication importante pouvant mettre en jeu le pronostic vital du patient. Il résulte d'une réponse inflammatoire aiguë induite par la sécrétion accrue de cytokines telles que IL6 et IFN γ dans le sang, qui à leur tour sont à l'origine du recrutement en cascade et amplifié des cellules immunitaires innées ou adaptatives. Un syndrome d'activation des macrophages a également été rapporté. (127) Cliniquement, le syndrome de relargage cytokinique se présente sous forme de fièvre intense, myalgies, arthralgies, nausées, fatigue extrême, hypotension artérielle, d'insuffisance respiratoire et des convulsions. Le traitement

actuel du syndrome de relargage cytokinique est le siltuximab (Anti-IL6), le tocilizumab et le sarilumab (Anti-Récepteurs de IL6). Les corticostéroïdes ont aussi prouvé leur efficacité.(119)

4.1.4.2. Syndrome de neuro-toxicité associée aux cellules immunitaires effectrices :

La grande spécificité des lymphocytes CAR-T peut induire un effet non spécifique off-tumor, résultant en une sévère neurotoxicité appelée : Syndrome de neurotoxicité associée aux cellules immunitaires effectrices ou ICANS. (113) Ce syndrome, apparaissant une à trois semaines après infusion des lymphocytes CAR-T, se manifeste sous forme de dysgraphie, léthargie, aphasie et tremblements. Une prise en charge précoce est très importante, car la progression vers une aphasie globale, convulsions, et, dans les cas les plus graves, un œdème cérébral malin, une hémorragie cérébrale et un coma peut être fatale. Les patients atteints de leucémies et de lymphomes ont plus de chances de développer ce syndrome, et il existerait une corrélation entre le syndrome de relargage cytokinique et ce syndrome. La prise en charge se base sur les soins de support et l'administration de corticostéroïdes. (104)

4.1.5. Utilisation des CAR-T CD19 en hémato-oncologie :

Utilisés comme nouvelle approche révolutionnaire en immunothérapie, les lymphocytes CAR-T sont actuellement utilisés en clinique pour le traitement des cancers hématologiques et ont prouvé leur efficacité. La fréquente et large expression du CD19 sur les cellules de leucémies de lignée B et de lymphomes, comparativement au CD20 ou CD22, a été la première cible des CAR-T générés dans un contexte de cancers hématologiques. (128) Le choix du CD19 revient également à son expression exclusive sur les lymphocytes B. L'effet on-target off-tumor serait donc responsable d'une aplasie de la lignée B, pouvant être simplement traitée par l'administration d'immunoglobulines. (108) (119) En effet, les CAR-T CD19 sont la première thérapie génique approuvée pour le traitement de leucémies lymphoblastiques aiguës B et des formes agressives de lymphomes non hodgkiniens réfractaires ou en rechute et un taux de rémission de 90% a été rapporté pour les leucémies. (129) Les deux premiers CAR-T ayant reçu une approbation par la FDA étaient le Kymriah™ (Tisagenlecleucel) et le Yescarta™ (Axicabtagene ciloleucel), destinés aux patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique et lymphomes non hodgkiniens. (130) Les CAR CD19 ont également prouvé leur efficacité dans les leucémies

lymphoïdes chroniques et ce, à long terme, ce qui a été décrit par l'équipe Melenhorst *et al* en 2022 qui ont rapporté une rémission de 10 ans chez deux patients ayant reçus des CAR CD19. (131)

La découverte du phénomène d'évasion antigénique dans certains types de leucémies lymphoblastiques aiguës CD19 négatives ouvre la voie à la génération et l'utilisation de CAR-T ciblant d'autres antigènes tel que le CD28. (119) (132) Des stratégies ont également été mises en place pour une utilisation plus sécuritaire des CAR-T tel que l'utilisation d'un récepteur tronqué de facteur de croissance épidermique pouvant être ciblé par un anticorps monoclonal ou l'adjonction d'une caspase 9 inductible (133, 134)

4.2. Le système CRISPR-Cas9 :

Les progrès récents dans le développement de technologies d'édition du génome ont considérablement amélioré notre capacité à générer et/ou modifier des gènes d'intérêt avec une grande efficacité et spécificité. En particulier, l'édition génique ciblant les lymphocytes T qui a ouvert la voie à de nouvelles stratégies d'immunothérapies adoptives visant à augmenter l'efficacité de ces derniers et recèle un énorme potentiel pour l'amélioration des approches thérapeutiques anti-cancéreuses.

Le principe de base de ces technologies étant l'utilisation de nucléases spécifiques aux sites génomiques d'intérêt et programmées pour introduire des cassures de l'ADN double brin ou DSB (DNA double-strand breaks), plusieurs outils ont été mis en place : Les nucléases à doigts de zinc (Zinc Finger Nucleases ou ZFN) (135), les nucléases Transcription activator-like effector (TALENs) (136) puis le système Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9 (CRISPR/CAS9). Les deux premiers outils se basent sur l'utilisation de nucléases chimériques composées d'un domaine modulaire qui se lie à l'ADN et un domaine nucléase Fok I indépendant de la séquence, ce qui représente un défi technique (125) Tandis que le système CRISPR/CAS9 se base sur la nucléase Cas9, guidée par une molécule ARN courte, appelée simple-guide ARN ou sgARN qui est complémentaire avec les paires de bases de la séquence d'ADN ciblée. Un autre avantage attribué au système CRISPR-CAS9 étant la possibilité d'introduction de plusieurs cassures de l'ADN double brin ou DSB dans une seule même cellule par l'utilisation de multiples sgARNs. (125) De plus, et en raison de sa facilité d'assemblage à haut débit, le système CRISPR-CAS9 est également utilisé pour le criblage du génome dans le but de découvrir de nouveaux gènes fonctionnels dans les lymphocytes T.

Le système CRISPR-CAS9, initialement découvert comme un mécanisme de défense des bactéries contre les phages et les plasmides invasifs, représente donc une véritable révolution dans le domaine de l'ingénierie génétique et plus récemment, pour des applications thérapeutiques, car elle permet d'éliminer, d'introduire, ou modifier de façon spécifique un ou plusieurs milliers de séquences de nucléotides d'un gène ou d'éléments non codants tels que les microARN. Il existe plusieurs types de systèmes CRISPR qui ciblent l'ARN ou l'ADN, nous

n'aborderons ici que le système de type II, utilisé pour l'édition de gènes à des fins thérapeutiques. (137)

4.2.1. Mécanisme de l'édition génique par CRISPR-Cas9 :

Le CRISPR-CAS9 est un système qui repose sur deux éléments : La nucléase Cas9 (CRISPR-associated 9) et un ARN guide appelé sgRNA (single guide RNA) complémentaire à une séquence de 17 à 20 nucléotides du gène ciblé. La Cas9 se lie en premier à une séquence spécifique du sgRNA appelée "Protospacer adjacent motif" (PAM), composée de 3 à 5 paires de base, le plus souvent NGG et fait une coupure double brin dans l'ADN ou DSB (Double-strand breaks) au niveau du gène cible. En conséquence de la coupure, deux mécanismes de réparation de l'ADN se mettent en place, le premier : "Non Homologous End Joining" ou (NHEJ) et le : "Homology directed repair". Le NHEJ consiste à rattacher les deux extrémités de la coupure, qui peut mener à des insertions ou délétions de nucléotides (Indels), induisant un changement du cadre de lecture et ainsi, la formation aléatoire d'un codon STOP dans 95% des cas, provoquant ainsi un knock-out (KO) du gène. L'autre mécanisme, ou HDR, utilise un brin d'ADN modèle, appelé ADN template. Le brin d'ADN est alors synthétisé par complémentarité à cet ADN template. Ce type de réparation a en effet été mis à profit dans le but d'introduire dans un site précis, une séquence d'intérêt dans le génome, permettant des knock-in de certains gènes. (138)

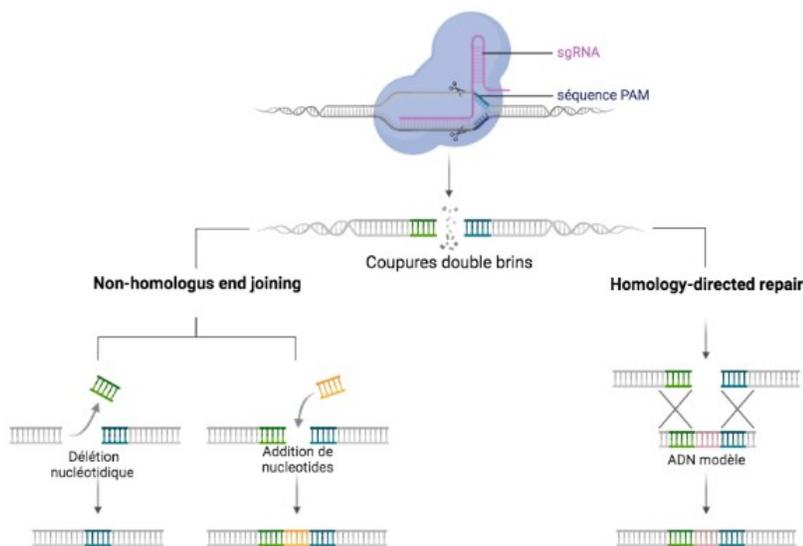


Figure 5. – Comparaison entre NHEJ et HDR.

Les coupures double-brin ou DSB induites par les nucléases sont rattachées par le mécanisme NHEJ ou HDR. La réparation par NHEJ peut induire un KO du gène ciblé. Tandis que la réparation par HDR peut être utilisée, en présence d'un ADN donneur, pour la substitution de nucléotides induisant une correction d'un gène. Figure réalisée à l'aide du site Biorender.com.

4.2.2. Méthodes d'introductions connues pour le CRISPR-CAS9 :

Le succès d'une édition génique avec le CRISPR-CAS9 dépend de plusieurs éléments critiques, notamment le mode de livraison utilisé. En effet, les différentes méthodes de délivrance du système CRISPR-CAS9 ont souvent suscité des interrogations : L'utilisation de vecteurs viraux (139, 140) ou de plasmides (141, 142) a démontré une efficacité réduite et une grande toxicité, tandis que l'utilisation de la ribonucleoprotéine-RNP par nucléofection a prouvé une plus grande efficacité sur de nombreuses cibles. (143, 144)

4.2.3. Knock-out de gènes médié par CRISPR-CAS9 dans les lymphocytes T :

La première application d'édition génique sur des lymphocytes T primaires humains remonte à l'année 2008, par la délétion du gène codant pour le récepteur de chimiokines CCR5, conférant une résistance au virus VIH-1 par la méthode ZFN (145). Cette première expérience a été suivie de multiples succès, notamment avec l'avènement de la technologie TALENs.(125)

Cependant, bien que la technologie ZFN et TALEN ait montré une efficacité de knock-out génique prometteuse sur les lymphocytes T, leur utilisation coûteuse et complexe ont limité leur application à grande échelle. L'avènement de la technologie CRISPR/Cas9 représente un véritable tournant dans le monde de l'édition génique sur lymphocytes T.(125) En effet, plusieurs équipes ont appliqué cette technologie afin d'éditer des gènes dans les lymphocytes T humains, dont les premiers en 2015 qui ont inhibé les gènes codant pour CXCR4, un co-récepteur du VIH, et PD1. (144) En 2017, le premier essai d'édition génique sur multiples gènes a été fait et les cibles étaient les gènes codants pour la chaîne α du TCR (TRAC), la β -2 microglobuline et le PDCD1. Cette

stratégie avait pour but de générer des lymphocytes T universels résistants à l'inhibition du PD1 (146) et le premier essai ayant été conduit sur humain impliquait l'infusion de lymphocytes T dont les deux chaînes du TCR ainsi que le gène codant pour PD1 ont été éliminés. (147)

Chapitre 5 : Hypothèse et objectifs

5.1. Hypothèse :

La maladie du greffon contre l'hôte et le rejet de greffe, dont le mécanisme principal réside dans l'activation du lymphocyte T par des allo-antigènes, sont les complications les plus redoutées après transplantation de cellules souches hématopoïétiques (Voir chapitre 1) et l'utilisation d'immunosuppresseurs telles que le tacrolimus représente la meilleure stratégie de traitement et de prévention. Cette molécule médie ses actions immunosuppressives en se liant à la protéine FK506-Binding protein (FKBP12) afin d'exercer ses effets immunosuppresseurs sur les LTs. (Voir Chapitre 2). Cependant, cette immunosuppression limite l'efficacité et la persistance des lymphocytes T infusés au patient dans le cadre de transfert adoptif de lymphocytes T virus-spécifiques (Chapitre 3) ou "Chimeric Antigen Receptors" CARs (Chapitre 4), administrés pour le traitement de plusieurs types d'infections virales et certains cancers à la suite d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Afin de contrer tous ces problèmes, et dans le but de fournir une protection antivirale mais également anti-tumorale et permettre la poursuite de cette immunosuppression préventive de la GVHD et du rejet de greffe, nous avons pour objectif de générer des lymphocytes CAR-T et virus-spécifiques résistants à l'action du FK506 par l'invalidation du gène codant pour FKBP12. En parallèle de la restitution d'une immunité anti-virale, l'éducation du TCR vis-à-vis des virus permettront d'atténuer l'allo-réactivité du lymphocyte T et ainsi, diminuer de la GVHD.

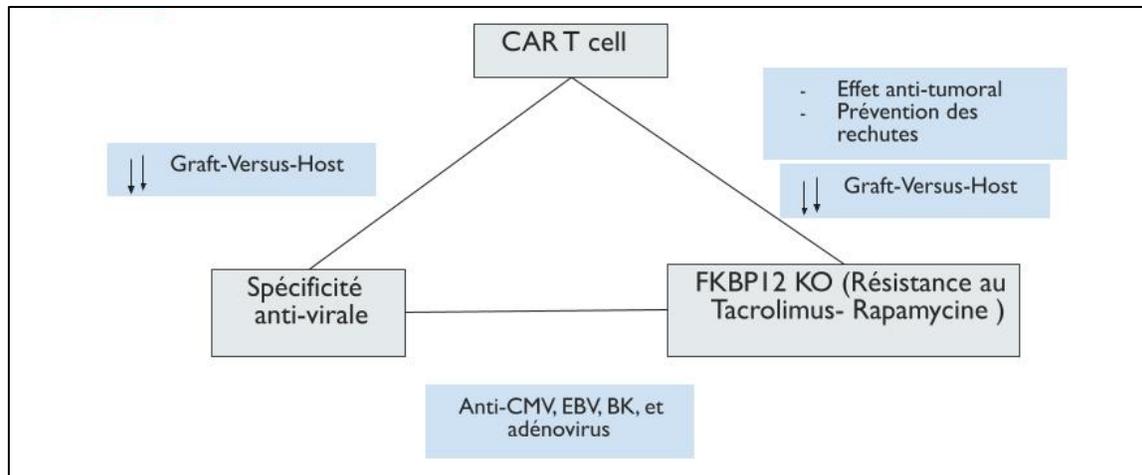


Figure 6. – Pertinence du projet dans un contexte clinique

5.2. Objectifs :

1. Délétion du gène FKBP1A et transductions lentivirales du CAR CD19 dans des lymphocytes activés par CD3-CD28.
2. Délétion du gène FKBP1A et transductions lentivirales du CAR CD19 dans des lymphocytes multi-virus spécifiques.

Chapitre 6 – Matériels et méthodes

6.1. Échantillons de sang et isolation des cellules mononuclées du sang périphérique :

Les échantillons proviennent de donateurs volontaires sains et ont été obtenus à partir de dons de sang collectés par ponction veineuse ou de chambres de leucoréduction (LRSC) suite à des dons de plaquettes par aphérèse à Héma-Québec (148). Tous les donateurs étaient informés et consentants. Les cellules mononuclées du sang périphérique ont été récupérées dans une solution tampon "Hank's Balanced Salt Solution" (HBSS, Gibco) contenant 10% d'anticoagulant Citrate-Dextrose (TerumoDECT), puis isolés par gradient de densité (Lymphoprep, STEMCELL technologies). Les PBMC ont ensuite été cryopréservés à -80 C° puis transférés dans un réservoir d'azote liquide pour une utilisation ultérieure dans un milieu contenant 90% de sérum fœtal bovin (FBS, Gibco) et 10% de dimethyl sulfoxide (DMSO, Fischer chemical). Toutes les expériences étaient approuvées par Héma-Québec et le comité d'éthique de l'Hôpital Maisonneuve Rosemont.

6.2. Confection et choix des guides simples ARN (sgRNA) codant pour le gène FKBP12 :

Des guides simples ARN (sgRNA) ciblant le gène FKBP1A ont été générés par outil informatique en employant : Integrated DNA Technology, <https://www.idtdna.com>, CRISPOR <http://crispor.tefor.net>, CHOPCHOP <https://chopchop.cbu.uib.no> , E-CRISP <http://www.e-crisp.org/E-CRISP> , et the Genetic Perturbation Platform du Massachusetts Institute of Technology <https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>. Quatre guides simples ARN (sgRNA, IDT) ont été confectionnés pour le gène FKBP1A et le guide 4 avait été initialement sélectionné par les anciens membres du laboratoire suite à une évaluation de l'efficacité d'édition sur des cellules Jurkats. Notre guide 1, ayant déjà été rapporté dans la littérature en 2021 (149), a également été utilisé pour toutes nos expériences.

6.3. Production de virus CD19-CAR :

6.3.1. Bactéries et ADN de plasmides :

Les plasmides utilisés proviennent du laboratoire du Dr Johathan Bramson de l'Université de McMaster à Hamilton. Les vecteurs de packaging psPAX2 et VSV-G ont été introduits par transformation dans les bactéries compétentes E.coli DH5 alpha (Max efficiency DH5a, Invitrogen), tandis que les vecteurs d'intérêt pCCL (Vecteur vide) et CAR de 2^e génération pCCL-CAR CD19 avec un domaine CD28 (contenant le transgène et la séquence tronquée du NGFR ou tNGFR) ont été introduits par transformation dans les bactéries compétentes Stbl3 (One Shot Stbl3, Invitrogen), suivant les protocoles de la compagnie. Tous les plasmides ont été sélectionnés par l'antibiotique ampicilline (Sigma-Aldrich).

Une colonie de chaque pétri a été piquée en utilisant un embout de 200 µl qui a été introduit dans 7ml du milieu Luria-Bertani ou LB Broth Media (Teknova, USA) contenant 50 µg/ml d'ampicilline et laissé sous agitation à 125 RPM pendant 10h à 37°C. Pour une expansion de la culture initiale et à des fins de faisabilité du Maxiprep, le milieu a ensuite été ré-inoculé dans un volume plus grand de milieu LB et ampicilline, et ce, à une dilution à 1/100 pour une incubation de 10h à 37°C sous agitation à 125 RPM. Les plasmides ont ensuite été purifiés avec des kits Maxiprep "Wizard plus maxiprep DNA purification system" (Invitrogen) suivant le protocole des compagnies.

6.3.2. Production des particules lentivirales :

La lignée de cellules HEK293T utilisée pour la transfection était mise en culture dans des pétris 150mm contenant du milieu pour cellules HEKs (constitué de milieu minimum essentiel de Eagle de Dulbecco (DMEM, Gibco) supplémenté avec 10% de sérum bovin foetal (Gibco), 5% de L-glutamine 1X (Gibco) et 1% de pénicilline-streptomycine (Gibco)) à 37°C et 5% de CO₂. À J0, 13.10² de cellules HEK293 à court passage ont été mises en culture dans des pétris de 150cm² et transfectées 24h après en combinant 20 µg du plasmide contenant le vecteur de packaging (psPAX2), 10 µg du plasmide contenant le vecteur de l'enveloppe de virus de stomatite vésiculaire ou VSV-G (pMD2.G), et 33 µg de plasmide contenant le gène d'intérêt (pCCL ou pCCL-CAR CD19)

dans du milieu contenant 5ml de milieu à faible teneur en sérum (Opti-MEM, Gibco) et 128 μ l d'agent de transfection (TransIT-LT1, Mirus). Après une incubation de 30 minutes à température pièce, le mélange a été distribué goutte à goutte sur les pétris contenant les HEK293T. Un changement de milieu a été fait 12 à 16 heures après. Le milieu des pétris contenant des virus a été récolté 48h et 72h après transfection et centrifugé à 3000 RPM pendant 10 minutes. Le surnageant a ensuite été récupéré et filtré en utilisant un filtre pore-polyvinylidene fluoride de 0.45 μ m (Millex-HP filter Unit, Millipore Express PES Membrane (Merck Millipore) puis concentré à l'aide de tubes filtrés Amicon Ultra-15 (Ultracel, Merck Millipore), ayant été préalablement humidifiés avec du PBS 1X par une centrifugation de 30 minutes à 4°C à 1450 RCF. Les virus filtrés ont ensuite été aliquotés puis conservés à -80°C pour utilisation ultérieure. Les normes canadiennes de biosécurité au niveau de confinement 2 ont été respectées.

6.3.3. Titration virale :

Pour obtenir une efficacité d'infection optimale sur nos lymphocytes T humains, une titration a été effectuée pour déterminer la concentration optimale de virus à utiliser. Pour cela, les cellules HEK 293 T ont été comptées au bleu de trypan avec un compteur de cellules automatiques (Countness, Invitrogen) et mis en culture pendant 24h dans une plaque de culture cellulaire de 24 puits à raison de 30,000 cellules dans 200 μ l de milieu pour cellules HEKs par puits. Le milieu a été changé le lendemain et remplacé par un milieu d'infection, dans lequel les virus concentrés ont été dilués en série dans un milieu pour cellules HEK supplémenté de 8 μ g/ml d'hexadiméthrine bromide (Polybrène, Sigma Aldrich). Dans le but de déterminer le taux de transduction, les cellules ont été récupérées 3 jours plus tard, lavés avec une solution de cytométrie en flux (PBS 1X (Biobasic) et 2% de sérum bovin fœtal (Gibco)), et marquées avec les anticorps monoclonaux fluorescents anti-CD171 ou anti-NGFR (Biolegend). L'acquisition a été faite à l'aide du cytomètre LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences) et du logiciel Diva. L'analyse des données a ensuite été effectuée à l'aide du logiciel FlowJo™ 10 (BD Biosciences).

6.4. Culture des lymphocytes T activés ex vivo par CD3-CD28 :

6.4.1: Délétion du gène FKBP12KO par CRISPR-CAS9 :

Dans le but d'obtenir des lymphocytes T résistants à l'action du tacrolimus, un knockout du gène codant pour FKBP12 a été réalisé. Après décongélation des aliquots de PBMC issus de 5 donneurs, les cellules CD3⁺ ont été isolées par enrichissement (EasySep™ Human T cell enrichment kit, StemCell Technologies) chez 3 patients, suivant les instructions de la compagnie. Les cellules ont ensuite été stimulées dans une plaque de 24 puits avec 5 µg/ml d'anticorps monoclonal de souris anti-CD3 anti-humain purifié (NA/LE No Azide/Low endotoxin, clone 145-2C11, BD pharmingen) recouvrant la plaque et 1µg/ml de CD28 antihumain (Clone CD28.2, invitrogen). Les cellules étaient cultivées à raison de 1.10^6 de cellules par puits en présence du milieu CTL 10% (RPMI 1640 (Gibco), 10% de sérum humain décomplémenté (Sigma-Aldrich) et 1% de L-Glutamine (Gibco)). Le lendemain, 1ml de milieu CTL10% a été ajouté. Au 3^e jour, et pour chaque condition, 4.10^6 cellules sont électroporées avec un complexe de ribonucléoprotéine à l'aide de l'électroporateur 2B (Lonza) en suivant les recommandations du constructeur. Ce complexe résulte d'une adjonction de 100 pmol protéine Cas-9 (S.p. Cas9 Nuclease V3, IDT) à 250 pmol de sgRNA (IDT) incubés à 37°C pendant 15 minutes au préalable et les contrôles consistaient en une condition électroporée dans les mêmes conditions, mais avec l'adjonction de 100pmol de la protéine Cas9 seulement, sans ajout de sgRNA. Le programme sélectionné est le T-020. Les cellules ont ensuite été récupérées dans du milieu CTL10% et remises en culture dans une plaque 24 puits. Au 7^e et 9^e jour, les cellules ont été récupérées, comptées au bleu de trypan avec le compteur de cellules automatiques (Countness, Invitrogen) puis restimulées de la même façon qu'au premier jour de la culture. Une partie des cellules a été récoltée à des fins de réalisation d'un Western Blot pour la confirmation du knock-out ainsi qu'une analyse phénotypique par cytométrie en flux. Le restant a été remis en culture avec 5 ng/ml de tacrolimus ou rapamycine à 10ng/ml. À des fins d'utilisation de contrôle sans tacrolimus ou rapamycine, l'ajout des deux drogues n'a pas été effectué. Les cellules ont été évaluées 6 jours plus tard.

Les lymphocytes T ont été marqués avec des anticorps fluorescents spécifiques pour les marqueurs suivants : CD3, CD4, CD45Ra, CD45Ro, CCR7 (BD Biosciences), CD8 (Invitrogen), et

CD62L (Biolegend). L'acquisition a été faite sur le logiciel DIVA au cytomètre en flux Fortessa X-20 (BD biosciences).

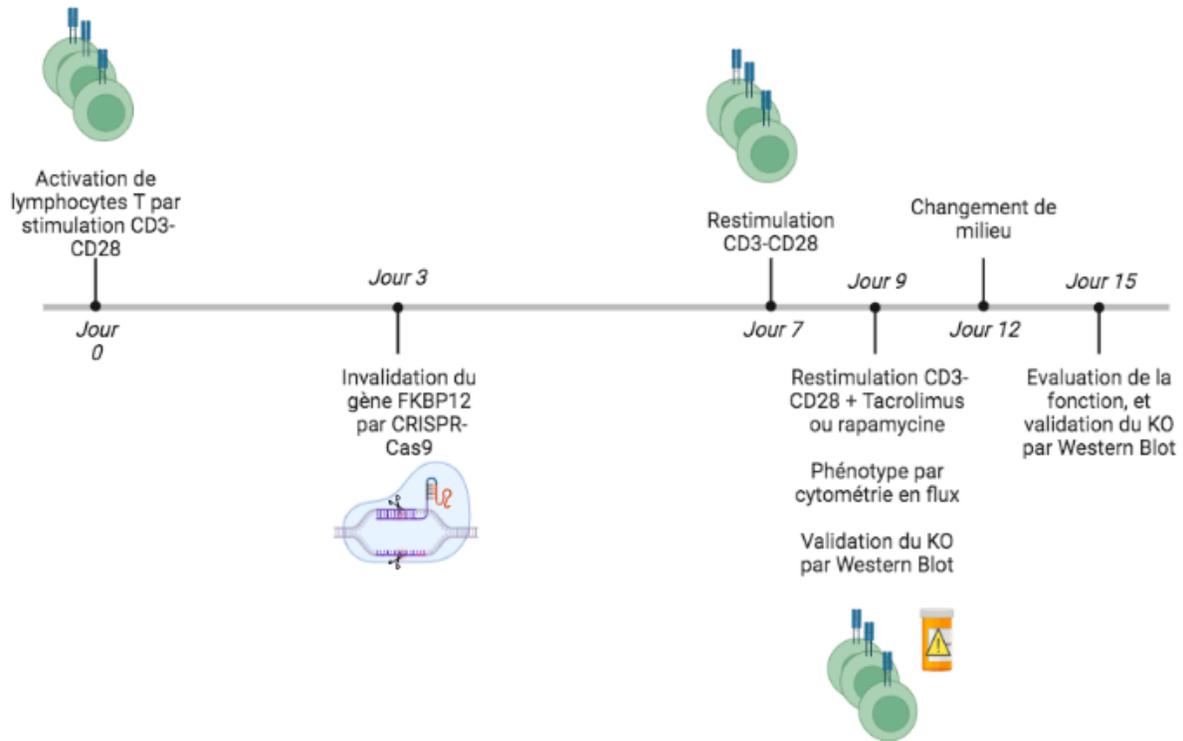


Figure 7. – Chronologie représentative de la délétion du gène du FKBP12 par CRISPR-CAS9 sur des lymphocytes T activés par CD3-CD28.

Les lymphocytes ont été activés, puis nucléofectés par CRISPR-CAS9 au 3^e jour. Les cellules ont été restimulées au 7^e et 9^e jour de culture. Le tacrolimus et rapamycine ont été ajoutés au 9^e jour. L'évaluation de l'efficacité du KO a été faite au 9^e et 15^e jour. L'évaluation de la fonction a été faite au 15^e jour.

6.4.2: Transduction lentivirale du pCCL et pCCL-CD19 CAR :

Afin d'obtenir des lymphocytes T exprimant des CAR CD19, une transduction lentivirale a été réalisée sur des lymphocytes T préalablement sélectionnés et activés. En effet, les PBMC ont été décongelés et un enrichissement T a été fait (EasySep™ Human T cell enrichment kit, StemCell

Technologies). Les cellules (10^4) ont été mises en culture avec 5 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps de souris anti-CD3 humain purifié (NA/LE, clone 145-2C11, BD pharmingen) et 1 $\mu\text{g/ml}$ d'anti-CD28 (CD28.2, invitrogen) dans une plaque de 96 puits dans du milieu CTL 10%. Au 2^e jour, les cellules T ont été transduites par des lentivirus contenant des vecteurs pCCL vides ou pCCL-CD19CAR et 8 $\mu\text{g/ml}$ de d'hexadimethrine bromide (Polybrène, Sigma Aldrich) ont été ajoutés à chaque puits. La MOI utilisée était comprise entre 1 et 5. Au 7^e jour, les cellules ont été récupérées, lavées avec la solution de cytométrie en flux et marquées avec des anticorps spécifiques pour les marqueurs suivants : CD3, CD4 (BD Biosciences), CD8 (Invitrogen), et CD171 ou NGFR (Biolegend). L'acquisition a été faite à l'aide du cytomètre LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences) et du logiciel Diva et l'analyse été faite sur le logiciel FlowJo™ 10 (BD Biosciences).

6.4.3: Délétion du gène et transduction lentivirale du pCCL et pCCL-CD19 CAR:

Le deuxième objectif du projet étant de fournir une protection anti-tumorale et permettre la poursuite de l'immuno-suppression préventive de la maladie du greffon contre l'hôte, une transduction du pCCL-CAR19 a été réalisée sur des lymphocytes FKBP12 KO. Pour des raisons de faisabilité technique, la nucléofection a été réalisée à J0 de la culture sur des lymphocytes T ayant seulement été enrichis à partir de PBMC (EasySep™ Human T cell enrichment kit, StemCell Technologies). 4 millions de lymphocytes T ont donc été électroporés avec le complexe de ribonucléoprotéine. La méthodologie employée pour la nucléofection du gène FKBP12 sur des lymphocytes T est similaire à celle utilisée dans cette partie (Voir section 6.4.1). Les cellules ont ensuite été récupérées dans du milieu CTL10% supplémenté avec 10 ng/ml d'IL-7 (Miltenyi). Au 2^e jour de culture, les cellules ont été récupérées dans du milieu CTL10% et activés avec 5 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps de souris anti-CD3 humain purifié (NA/LE, clone 145-2C11, BD pharmingen) et 1 $\mu\text{g/ml}$ de CD28 anti-humain (CD28.2, invitrogen) dans une plaque de 96 puits à raison de 10^4 cellules par puits. Une partie des conditions (10^4 cellules) a ensuite été transduite le lendemain de l'activation par des lentivirus contenant le pCCL-CD19CAR dans un milieu CTL10% supplémenté de 8 $\mu\text{g/ml}$ d'hexadimethrine bromide (Polybrène, Sigma Aldrich). La MOI utilisée était 3.

Au 7^e jour, les cellules ont été récupérées, comptées au bleu de trypan avec le compteur de cellules automatiques (Countness, Invitrogen) et remises en culture dans du milieu CTL10% contenant 10 ng/ml d'IL-7 et 5 ng/ml de tacrolimus dans une plaque de 96 et 24 puits pour les cellules transduites et non transduites respectivement, pendant 7 jours. Le demi-changement de milieu a été fait au 12^e jour. Au 15^e jour les cellules ont été récupérées pour l'évaluation finale : la réalisation d'un western blot pour la confirmation du knock-out, les tests de marquage intracellulaire des cytokines intracellulaires (Voir section 6.7.1.) et un marquage avec les anticorps suivants : anti-CD3, CD4 (BD Biosciences), CD8 (Invitrogen), et CD171 ou NGFR (Biolegend) pour les cellules transduites. L'acquisition a été faite à l'aide du cytomètre LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences) et du logiciel Diva et l'analyse été faite sur le logiciel FlowJo™ 10 (BD Biosciences).

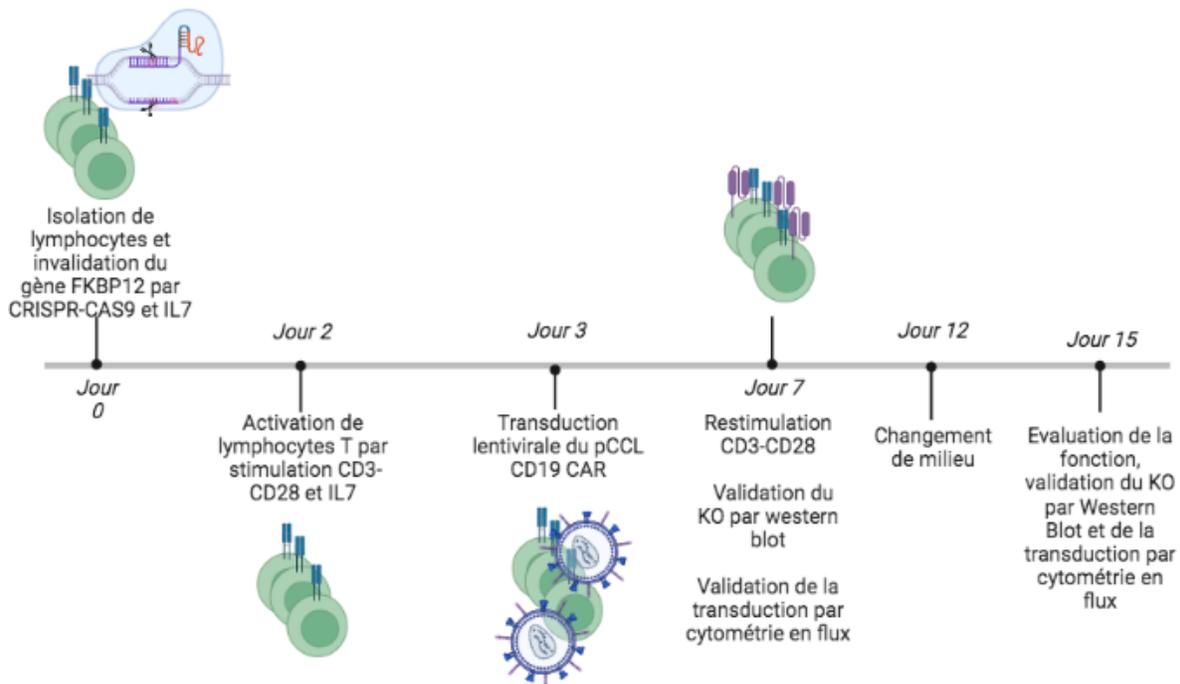


Figure 8. – Chronologie représentative de la délétion du gène du FKBP12 par CRISPR-CAS9 et transduction lentivirale par pCCL-CAR CD19 sur des lymphocytes T activés par CD3-CD28.

Les lymphocytes ont été nucléofectés par CRISPR-CAS9 au premier jour et activés par CD3-CD28 au 2^e. La transduction lentivirale a été faite le lendemain de l'activation. Les cellules ont été restimulées au 7^e avec du tacrolimus. L'évaluation de l'efficacité du KO a été faite au 7^e et 15^e jour. L'évaluation de la fonction a été faite au 15^e jour.

6.5. Culture des LTs multivirus spécifiques co-culture :

6.5.1: Délétion du gène FKBP12KO sur des LT multivirus spécifiques :

Le troisième objectif du projet s'articule autour de la génération de lymphocytes T ayant une triple fonction : Antivirale, anti-tumorale et résistante au tacrolimus. La première étape était donc de confirmer la faisabilité d'un KO par CRISPR-CAS9 sur des lymphocytes T multivirus spécifiques.

À J0, un enrichissement de lymphocytes T a été effectué (PBMC EasySep™ Human T cell enrichment kit, StemCell Technologies) à partir de PBMC. Ce procédé de séparation immuno-magnétique négative des lymphocytes T, se basant sur le marquage des cellules indésirables avec des complexes d'anticorps et particules magnétiques et leur séparation de la population désirée à l'aide d'un aimant (EasySep, StemCell technologies) avec déversement des LTs dans un nouveau tube, a été utilisé d'une façon à récupérer les PBMC restants dans le tube afin de les utiliser comme cellules présentatrices d'antigènes ou PBMC sans lymphocytes T. Ainsi, une fois les lymphocytes T séparés et collectés, le restant des cellules a été resuspendu dans du milieu CTL10%. Les cellules ont ensuite été irradiées à 40 Gy à l'aide de l'irradiateur GammaCell 3000 Elan de l'hôpital Maisonneuve Rosemont, puis mises en incubation avec 1 ng/ µl de bibliothèques de peptides viraux (PepMix, JPT peptides) pendant 2 heures à 37°C. Dans le but de générer des lignées multivirales, les bibliothèques de peptides PepMix utilisées étaient : Hexon et penton pour l'adénovirus, IE1 et pp65 pour le CMV, LMP2 et EBNA pour EBV, LTA et VP1 pour le BK virus. Ces cellules ont ensuite été mises en co-culture avec les lymphocytes T préalablement isolées en respectant un ratio PBMC : T = 1:5, dans un milieu CTL10% supplémenté de 10 ng/ml d'IL-7 et 1666 U/ml d'IL-4 dans un G-Rex 24 à 37°C. Au 5^e jour, les cellules ont été récupérées et électroporées de la même façon que pour les lymphocytes T activés par CD3-CD28 pour le knock out du FKBP12 (Voir section 6.4.1). Au 7^e jour, les cellules de chaque condition ont été comptées, puis remises en co-culture avec des PBMC ayant été décongelés, irradiés à 40 Gy à l'aide de l'irradiateur précédemment cité et incubées avec les bibliothèques de peptides viraux pareillement utilisés pour la première stimulation. Le milieu de culture contenait du CTL10%, IL-4, IL-7 et 5 ng/ml de tacrolimus. Un changement de milieu a été fait au 12^e jour. Au 15^e et dernier jour de co-

culture, les lymphocytes T ont été récupérés pour des analyses fonctionnelles et phénotypiques afin de confirmer le knock-out du FKBP12 et la réactivité de ces lymphocytes T aux multiples virus.

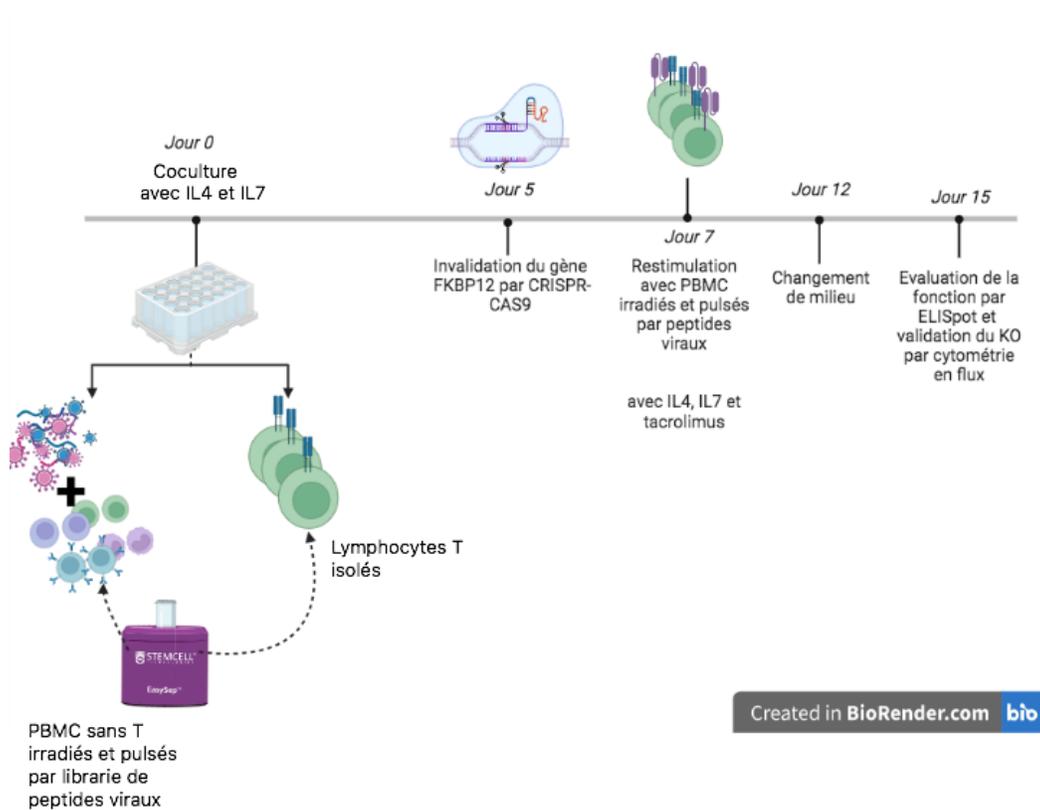


Figure 9. – Chronologie représentative de la délétion du gène du FKBP12 par CRISPR-CAS9 sur des lymphocytes T activés par co-culture.

Les lymphocytes T ont été isolés et mis en co-culture avec des PBMC sans lymphocytes T irradiés et pulsés avec des peptides viraux, puis nucléofectés par CRISPR-CAS9 au 5^e jour. Les cellules ont été restimulés au 7^e jour avec du tacrolimus. L'évaluation de l'efficacité du KO a été faite au 7^e et 15^e jour. L'évaluation de la fonction a été faite au 15^e jour.

6.5.2: Expression du CD19 CAR sur des lymphocytes FKBP12KO et multivirus spécifiques :

La dernière étape du projet était de confirmer la faisabilité d'une transduction sur des lymphocytes FKBP12KO sur des lymphocytes T multivirus spécifiques. Dans le but d'obtenir une bonne efficacité de transduction, il est nécessaire de fournir un fort signal d'activation aux

lymphocytes T. De ce fait, la co-culture a été basée sur l'utilisation de CDs matures servant de cellules présentatrices d'antigènes viraux.

6.5.2.1. Génération des cellules dendritiques matures :

À J0, les PBMC ont été décongelés et resuspendus dans un milieu de culture de Cellules dendritiques composé de X-Vivo 15 (Lonza), 5% de sérum humain décomplémenté (Sigma Aldrich), 1% de L-glutamine (Gibco) et 1mM de Sodium Pyruvate (Gibco). Les cellules ont ensuite été mises dans une plaque de 6 puits à raison de 2.5 millions de cellules/ml de milieu de Cellules dendritiques pendant 2 heures à 37°C et grâce à la capacité d'adhésion aux surfaces des monocytes, ces derniers ont pu être isolés puis remis en culture dans un milieu pour cellules dendritiques supplémenté en 1000 U/ml d'IL-4 (Miltenyi Biotec), 800 U/ml de GM-CSF (Miltenyi Biotec). Au 3^e jour, le milieu a été renouvelé. Au 7^e jour, la maturation des cellules dendritiques a été faite par l'ajout de 1 µg/ml de lipopolysaccharides (LPS, sigma-Aldrich) et de 1 µg/ml prostaglandines 2 (PGE2, Sigma Aldrich). 1000U/ml d'interféron gamma a été ajouté le lendemain. Enfin, au 9^e jour, les cellules ont été collectés et une partie a été marquée par des anticorps monoclonaux fluorescents spécifiques pour CD11c, CD80, CD86, HLA-ABC (BD biosciences), CD14 (Biolegend), CD83 et HLA-DR (ebiosciences) puis analysée en cytométrie en flux pour l'évaluation de la maturation des DCs.

6.5.2.2. Coculture de CDs avec lymphocytes T :

À J0 de la co-culture, correspondant au 9^e jour de génération et maturation de CDs à partir de PBMC, les cellules dendritiques collectées ont été irradiées à 40 Gy à l'aide de l'irradiateur GammaCell 3000 Elan de l'hôpital Maisonneuve Rosemont, puis mises en incubation avec 1ng/ µl de librairie de peptides viraux précédemment décrits (PepMix Hexon, Penton, IE1, pp65, LMP2, EBMA, LTA, VP1, JPT peptides) pendant 2 heures à 37°C et enfin, mises en co-culture avec des lymphocytes T ayant déjà été enrichis à partir de PBMC (PBMC EasySep™ Human T cell enrichment kit, StemCell Technologies), nucléofectés de la même façon que celle décrite pour les lymphocytes T activés par CD3-CD28 et mises en culture dans du milieu CTL 10% avec 10ng/ml d'IL-7 pendant 2 jours. Le ratio CD:T était de 1 :10, et les cellules étaient mises dans un milieu

CTL10% supplémenté de 10 ng/ μ l d'IL-7, 1666 U/ml d'IL-4 et 5 ug/ml d'IL-15 dans une plaque 96 à fonds ronds à 37°C à raison de 10⁴ cellules par puits.

Au 2^e jour de co-culture, une partie des conditions a été transduite par des lentivirus contenant le pCCL-CD19CAR dans un milieu CTL10% contenant 8ug/ml d'hexadimethrine bromide (Polybrène, Sigma Aldrich). La MOI utilisée était de 2 et 5. Au 7^e jour, les cellules ont été récupérées, comptées, puis remises en co-culture avec des PBMC irradiées à 40 Gy à l'aide de l'irradiateur précédemment cité et incubées avec les libraires de peptides viraux pareillement utilisés pour la 1^e stimulation pendant 2h. Le milieu de culture contenait du CTL10%, IL-4, IL-7 et 5 ng/ml de tacrolimus. Un changement de milieu a été fait au 12^e jour. Au 15^e et dernier jour de co-culture, les lymphocytes ont été récupérés pour des analyses fonctionnelles et phénotypiques afin d'évaluer, respectivement, la réactivité des lymphocytes T aux virus et l'efficacité de transduction lentivirale. Également, une partie des cellules a été récoltée à des fins de réalisation d'un Western Blot pour la confirmation du knock-out.

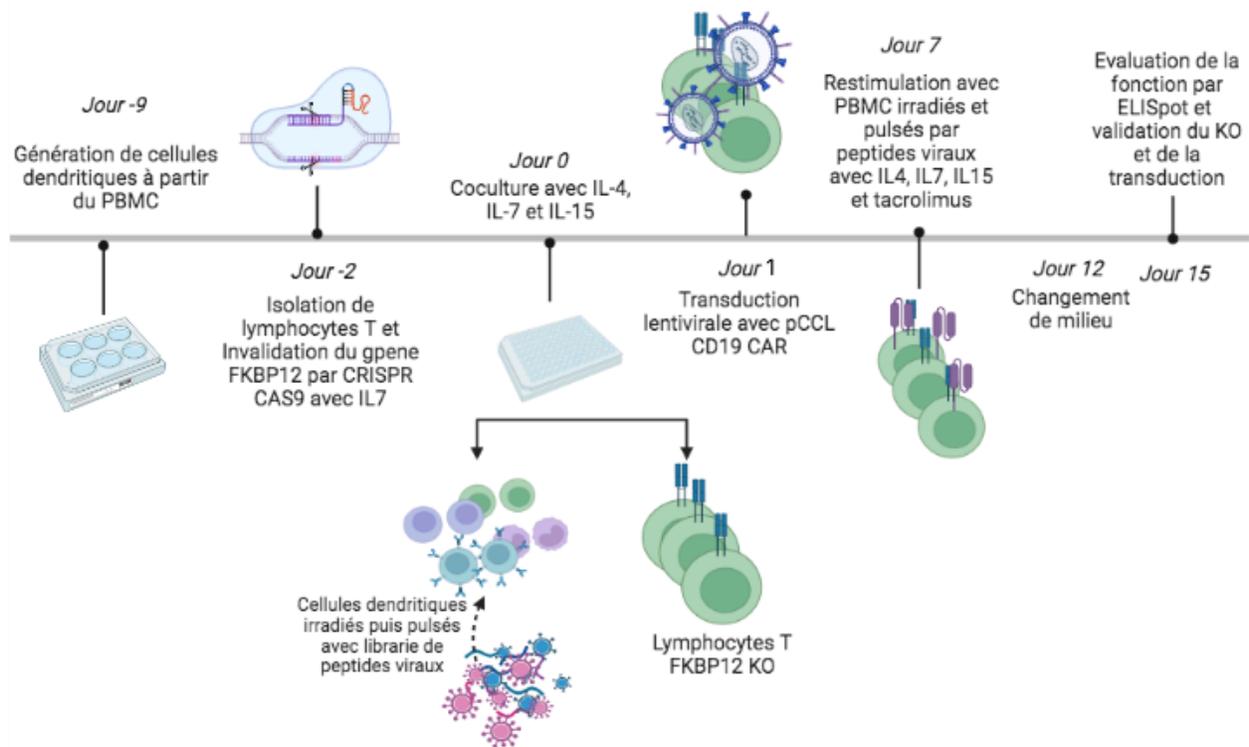


Figure 10. – Chronologie représentative de transduction lentivirale par pCCL CD19 CAR sur des lymphocytes T activés par co-culture et FKBP12 KO.

Les lymphocytes T ont été isolés et nucléofectés par CRISPR CAS9 pour l'inactivation du gène FKBP12 puis mises en coculture avec des cellules dendritiques irradiées et pulsées par les peptides viraux deux jours plus tard. La transduction lentivirale a été faite le lendemain de la co-culture. Les cellules ont été restimulés au 7^e avec du tacrolimus. L'évaluation de l'efficacité du KO et de la transduction lentivirale a été faite au 15^e jour. L'évaluation de la fonction a été faite au 15^e jour par ELIspot.

6.6. Confirmation de l'efficacité du knock-out du gène codant pour FKBP12 :

6.6.1: Western-Blots :

L'analyse de l'expression du FKBP12 s'est faite sur des extractions protéiques de $7,5 \times 10^5$ cellules de chaque condition. Les protéines ont été extraites dans un tampon de radio-immunoprécipitation (RIPA buffer) avec un inhibiteur de protéase : PMSF buffer (Phenylmethylsulfonyl fluoride) à 1mM. Ces extractions ont ensuite été diluées dans un tampon de Laemmli 6X, dénaturées pendant 10 minutes à 100°C, puis soumises à une migration sur gel 12% SDS-PAGE pendant 1 heure et 20 minutes. Le transfert des protéines a ensuite été réalisé sur membrane de polyvinylidene fluoride (PVDF, Biorad) préalablement activée dans du méthanol. Les membranes ont ensuite été bloquées par une solution de lait en poudre diluée dans du TBST (Tris-Buffered saline ou TBS – Tween 0.1% (Bioshop)) pendant 1 heure à température ambiante puis incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire de lapin dirigé contre la protéine FKBP12 (Abcam) ou de souris dirigée contre l'actine (Santa Cruz Biotechnologies). Les deux anticorps étaient dilués à 1 :1000 respectivement. Les membranes ont ensuite été lavées avec du TBST (Trois lavages de 15 minutes) puis incubées avec l'anticorps secondaire IgG de mouton anti-lapin couplé à la peroxidase de Raifort (Biorad) pendant 1 heure à température pièce, dilué à 1:3000. Les membranes ont ensuite été lavées dans du TBST (Trois lavages de 15 minutes). L'ECL (Enhanced

chemiluminescence Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer) a été utilisé pour la révélation finale via le système Azure c600 (Azure Biosystems). La quantification des bandes de protéines a été réalisée par le logiciel Image J 1.53t (National Institutes of Health)

6.6.2: Cytométrie en flux :

Le phénotype des lymphocytes T a été évalué au 15^e jour des cultures avec CD3-CD28. Les cellules ont été marquées par les anticorps couplés à des fluorochromes spécifiques pour les marqueurs suivants : CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CCR7 (BD biosciences), CD8 (Invitrogen) et CD62L (Biolegend). Les cellules ont été incubées, lavées et passées au cytomètre en flux LSR Fortessa X-20 (BD biosciences) et analysées par le logiciel Diva (BD biosciences). L'analyse de données a été faite par le logiciel FlowJo 10 (BD biosciences)

6.7. Tests de fonctionnalité

6.7.1. Marquage intracellulaire cytokinique :

Au 15^e jour de la culture de lymphocytes T FKBP12KO activés au CD3-CD28, les cellules ont été mises en incubation pendant 4 heures à 37°C avec 15 µg/ml de brefeldine A (Biolegend), un anticorps co-stimulateur anti-CD28/CD49d (BD FastImmune) à raison de 2 µg/ml, ainsi que 50 ng/ml phorbol Myristate Acetate (PMA, Sigma Aldrich) et 500ng/ml d'ionomycine (Sigma Aldrich). Le contrôle négatif ne contenait pas de PMA et ionomycine. Les cellules ont ensuite été collectées, lavées et un marquage avec les anticorps suivants a été fait : anti-CD3, anti-CD4 et anti-CD8 (BD biosciences). Les cellules ont ensuite été fixées et perméabilisées (FOXP3/Transcription Factor Staining Buffer Set, ebiosciences) pour ensuite être incubées avec les anticorps de marquage intracellulaire : Anti-TNF, anti-IL2 et anti-IFN γ (BD biosciences). Les cellules ont ensuite été lavées avec du tampon de perméabilisation, et la fluorescence a été analysée à l'aide du cytomètre en flux LSR Fortessa X-20 (BD biosciences) et analysées par le logiciel Diva (BD biosciences). L'analyse de données a été faite par le logiciel FlowJo 10 (BD biosciences)

6.7.2. Test de réactivité IFN γ enzyme-linked immunospot assay

(ELISpot):

Au 15^e jour de co-culture, 7. 10⁵ cellules ont été restimulées avec 100 μ g/ml de librairie de peptides viraux, avec un peptide témoin (DMSO seulement) ou avec un anticorps anti-CD3 (Contrôle positif) pendant 18 heures à 37% à 5% CO₂ dans une plaque 96 puits dont les puits étaient coatés d'anticorps anti-IFN γ (Mabtech). Les cellules étaient mises en incubation avec du DMSO ou 100ug/ml des peptides viraux VP1 et LTA, PP65 et LMP2, IE1 et EBNA, Penton et hexon ou de l'anticorps anti-CD3. La révélation a ensuite été effectuée selon le protocole donné par le manufacturier (Mabtech Inc, Cincinnati, OH) et l'analyse du nombre de spots et de l'activité a été déterminée par un spectre de lecture vSpot (AID, Strassberg, Allemagne)

6.8. Tests statistiques :

Les différences significatives ont été déterminées par des multiples t tests de student standards. Les tests ont été effectués sur le logiciel graphpad (Prism 8). Le seuil de significativité attribué est : $p < 0.05$, $** < 0.005$, $*** < 0.0005$

Chapitre 7 – Résultats

7.1. Le Knock-out du FKBP12 est réalisable avec la technique CRISPR-CAS9 :

Afin de générer des lymphocytes T résistants à l'action du tacrolimus, la délétion du gène FKBP12 a été réalisée à l'aide de la technique CRISPR-CAS9. Pour ce faire, quatre guides simples ARN (sgRNA) ont été confectionnés pour le gène FKBP1A au sein du laboratoire. La synthèse de ces sgRNA a été réalisée par la compagnie IDT (Integrated DNA Technologies). Ces guides ont été électroporés sur des cellules Jurkats. (Tableau 1) Le knock-out a été évalué par marquage intracellulaire du FKBP12 et analysé en cytométrie en flux et le guide sgRNA-4 avait été sélectionné. Ces premiers résultats ont confirmé la faisabilité d'un knock-out efficace du FKBP12 sur des cellules jurkats à l'aide du guide 4. De plus, du fait que le guide sgRNA-1 ait déjà été rapporté dans la littérature en 2021 (149) , nous l'avons également utilisé pour toutes les expériences de ce projet.

Guide ARN choisis	Séquences géniques
sgRNA-1	5' GGGCGCACCTTCCCAAGCG 3'
sgRNA-2	5' TGTAGTGACCCACGCAGGTC 3'
sgRNA-3	5' GATTATGCCTATGGTGCCAC 3'
sgRNA-4	5' TGCCACTCTCGTCTTCGATG 3'

Tableau 1. – Les guides sgRNA ciblant le gène FKBP1A et utilisés pour nos expériences.

La conception des sgRNA a été faite à l'aide d'outils informatiques. Le choix a été orienté en ciblant les zones exoniques communes aux différents transcrits, tout en évitant la suite GCC au niveau de la région charnière (Soit les 4 derniers nucléotides en 3' du sgRNA). Aussi, les sgRNA ne contiennent pas de polymères nucléotidiques.

Un séquençage de l'ADN des cellules électroporées avec le sgRNA-4 a été comparé à celui des cellules contrôles (électroporées avec Cas9 seulement) grâce à la technique du TIDE (Track Indels Analysis) et a démontré une efficacité de la délétion avec un taux d'insertions-délétions de 37.5% ainsi qu'une apparition de mutations introduites à partir de la 308^e paire de base, correspondant au site théorique de coupure de la Cas9 sur l'amplicon. (Figure 11) A noter que ces données ont été générées par les anciens membres du laboratoire avant le début de ma maîtrise.

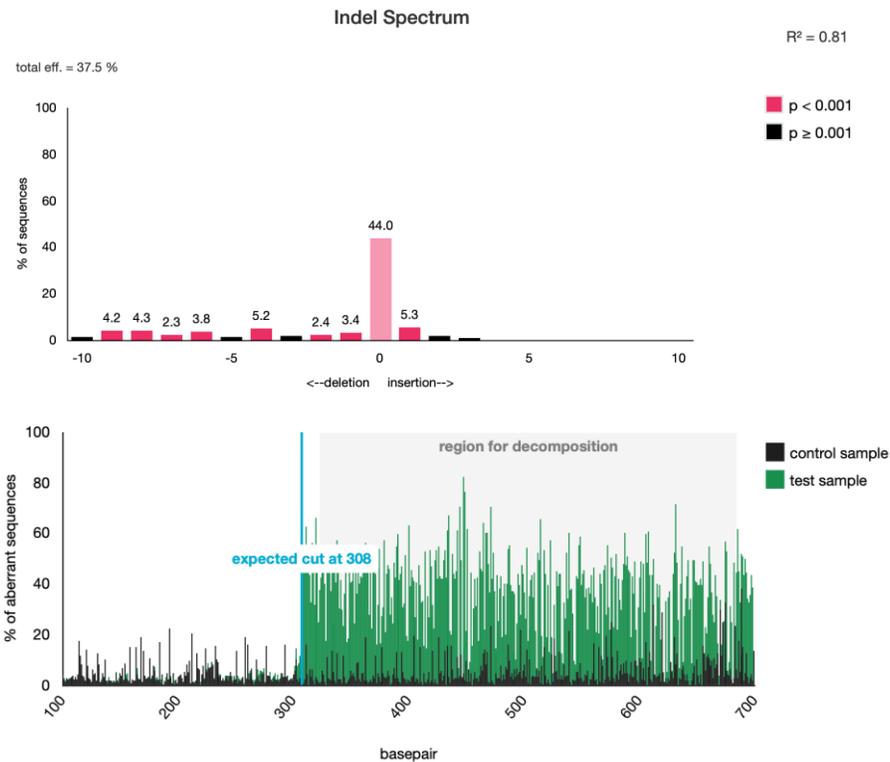


Figure 11. – Efficacité du guide sgRNA-4 au niveau génique par Tracking of indels by Decomposition (TIDE) des cellules électroporées avec Cas9 avec et sans sgRNA-4.

Taux d'insertions/délétions à taux significatif en rose foncé, et non significatif en noir dans l'histogramme d'en haut. En bas, apparition des mutations correspondant au site théorique de coupure de la Cas9 sur l'amplicon. La séquence ADN des lymphocytes T électroporées avec Cas9 en noir, et celle des cellules électroporées avec sgRNA-4 en vert.

```

> LT CD3/28 J9 Cas9
CCTCCAAGTCCTGCACAAGGAGGTGGTGATGCCTGGGCAGCTGCAAAGTCACTGGAAAGTCAATACCATCCTGGCCAAGGA
ACACCTAGGTAAACAGCTCTTTTTCTTACAGAGACAGTTGGGGCATGTGTCCAGCTGAGTCTGTCTTCCCTTTTTCACAG
ATGAGTGTGGGTGAGAGAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACC
ACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTTGGAGCTTCTAAACTGGAATGACAGGAATGGCCTCCCTCCCTAGCTCCCTGTTCTTGGG
TAAGGAAATGGAATACTGAAGGGCCCTTCACTGCCTTTGCTCCTCCCATGTTATGCCAGCGTTTGATGGGTAGCAGAGAGAA
CAAAAAACACCACAAGGCTATTTTTCCCTGCATCTTTCTGTATTGAGTATCCTTTCAGTGTATTAGTGATGCTTTGAATGT
AAAAATTGGTCACCCTAAGGAAAGGAATTGGCATGTGTATGTTCCAGTTCAACTCATGGAGATGGCAGCTGTTTAAATGTTTTT
CTATGTAGTTTATAAATTAATACTGAATTGAGGACTATGAAATGTANGCCAAATTTGTAGTGCCAACATTTAGTTCTTTGGAAAT
AAGACTCTTAATGAATGACTTTGTTCTACCCTGTGTTTCTAGAANCTAGAGA

>LT CD3/28 J9 FKsgRNA-4
CCTCCNAGTCCTGCACAAGGAGGTGGTGATGCCTGGGCAGCTGCAAAGTCACTGGAAAGTCAATACCATCCTGGCCAAGGA
ACACCTAGGTAAACAGCTCTTTTTCTTACAGAGACAGTTGGGGCATGTGTCCAGCTGAGTCTGTCTTCCCTTTTTCACAG
ATGAGTGTGGGTGAGAGAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACC
ACATGCCACTCTCGTCTTCNANNNNAGNTTCNAAAANNGGAATGACNNGAATGGCCNCCCTCCNAGCTCCCTGTTCTTGG
NNAAGGAAANGNAATACTGAAANGNCCNTCCCTGCCTTTGCTCCTCCATGTTNNNNCNANNGNNTAGATGGNNAACAAANAN
AACAAAAACACCNCNNGGNTATTTTTCCCTGCNTTCTTTCTGTATTGAGTATCCNTTCNNTGTTATTANTGTANGCTTTGAA
NGNNAAAANTGGNCACCCTAANGAAAGGAATTGNCTGTGNATGTTCCNNNNCNCTCNTGGANANNNNNCTGTTTAAAT
GTTTTCTATNNANNNTANAATNNANNTGANNTGAGGACNANGGAAATGTANGNCNAATTTGTTNNNGNCACATTTTANNNN
NTTGAAATANNNNNCTTANTGNATGACGTNGTTCTACCNNGTGNNNNNNANNCTANAGA

```

Figure 12. – Séquence ADN cible du sgRNA-4 des cellules électroporées par Cas9 seule ou associée au sgRNA-4

La séquence de 20 paires de base du sgRNA-4 en bleu clair. La séquence PAM de 3 paires de base est en bleu foncé. Les flèches rouges correspondent au site théorique de coupure de Cas9. (Les bases N en jaune signifient que deux ou plusieurs nucléotides sont possibles dû à l'hétérogénéité des amplicons. Les bases surlignées en gris sont des séquences repères identiques).

7.2. Délétion du gène FKBP1A et transductions lentivirales du pCCL-CD19 CAR dans des lymphocytes activés par CD3-CD28 :

7.2.1. Délétion du gène FKBP12 sur lymphocytes T polyclonaux :

7.2.1.1 La délétion du gène FKBP12 est réalisable sur des lymphocytes T primaires humains :

Dans le but d'identifier l'efficacité et l'effet de la délétion FKBP12 sur les lymphocytes T activés d'une façon polyclonale, un KO a été réalisé, au 3^e jour de culture, par technique d'électroporation afin de délivrer le système CRISPR-CAS9 au génome. Les deux guides ont été utilisés séparément : sgRNA-1 et sgRNA4 et complexés à la nucléase Cas9. D'abord, pour confirmer l'efficacité de l'inactivation du gène FKBP1A au niveau protéique, un western-blot a été effectué sur les extractions protéiques de cellules récupérées au 9^e et au 15^e jour, soit 4 et 10 jours après nucléofection, respectivement. (Figure 13). Ainsi, nous remarquons une diminution de la protéine FKBP12 dans les cellules électroporées avec les deux guides sgRNA-1 et sgRNA-4, en comparaison avec les cellules contrôles, représentées ici par les cellules électroporées avec la Cas-9 seulement. Ceci témoigne de l'efficacité du knock-out du FKBP12 dans les lymphocytes T sur le plan protéique. Cette diminution est plus marquée dans les cellules ayant subi un traitement au tacrolimus au 9^e jour de culture relativement aux conditions n'ayant pas encore été traitées par l'immunosuppresseur, reflétant la mort des cellules exprimant encore le FKBP12, hypothétiquement non résistantes à l'action du tacrolimus. La comparaison des niveaux de FKBP12 des différents donneurs a démontré une variabilité interindividuelle de l'efficacité du knock-out entre les 5 donneurs, pour les deux conditions de guides utilisés à différents points de temps.

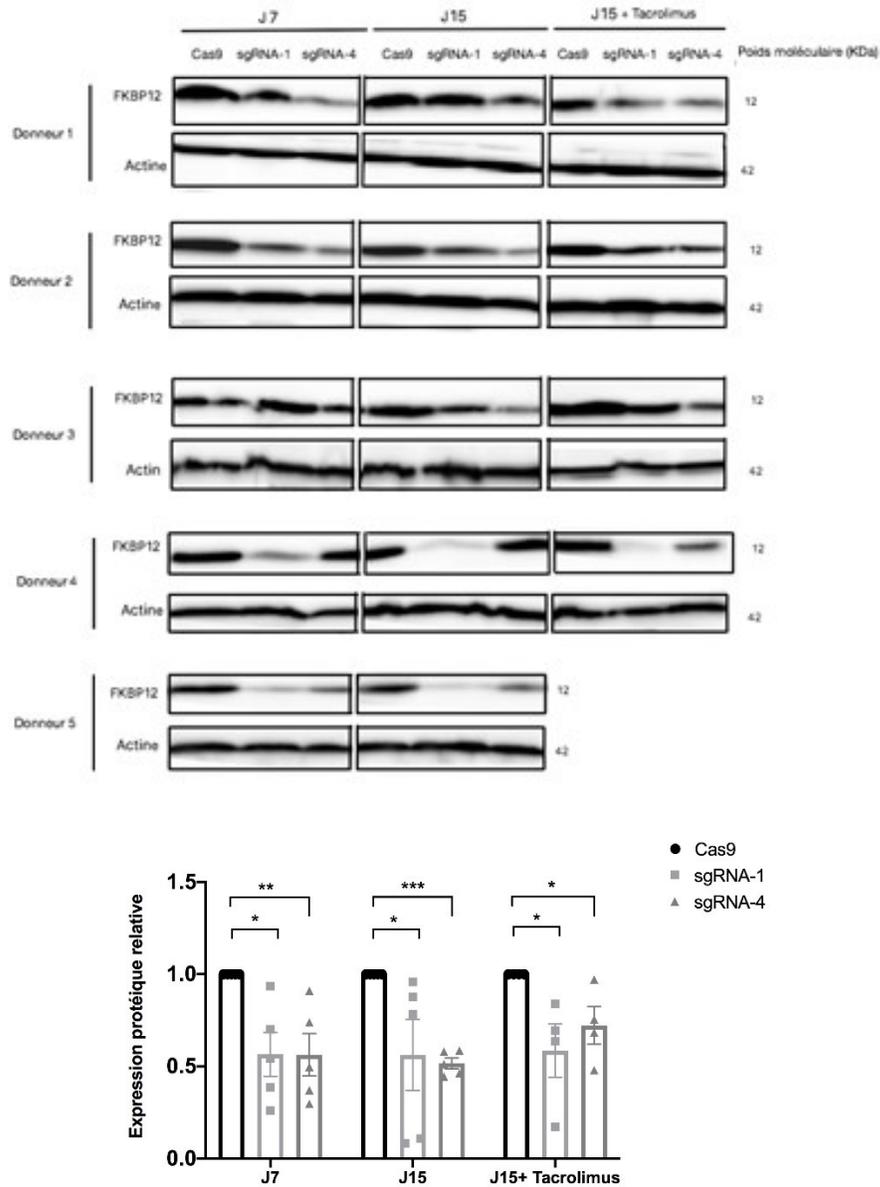


Figure 13. – Expression du FKBP12 sur le plan protéique

L'expression du FKBP12 a été détectée dans des lysats protéiques des 3 conditions : Cellules électroporées avec sgRNA-1, sgRNA-4 et Cas9 seulement (contrôle négatif), avec ou sans tacrolimus, collectées au 7e et 15e jour. La Beta-actine a été utilisée comme contrôle positif du fait qu'elle soit exprimée d'une manière ubiquitaire et qu'elle résiste aux procédures expérimentales. $n=5$.

7.2.1.2 Le knock-out du FKBP12 n'a pas d'effet délétère sur le lymphocyte T :

Dans le but d'observer l'effet de la délétion du gène FKBP1A sur la croissance des lymphocytes T activés ex vivo par CD3-CD28, un décompte de cellules a été effectué avant l'électroporation au 3^e jour, puis avant chaque restimulation au 7^e et 9^e jour. (Voir figure 14). Après 3 jours de l'électroporation, reconnue pour être toxique pour les cellules, une légère baisse de la croissance globale des cellules électroporées avec sgRNA-1 et sgRNA-4 a été observée par rapport au contrôle (Cas9 seule), mais a gardé sa cinétique exponentielle pour les 3 conditions. Cette baisse de croissance relative à la Cas9 est d'autant plus importante pour les cellules électroporées avec le sgRNA-4 et suppose l'existence d'un effet intrinsèque du knock-out dans la croissance dans ces cellules.

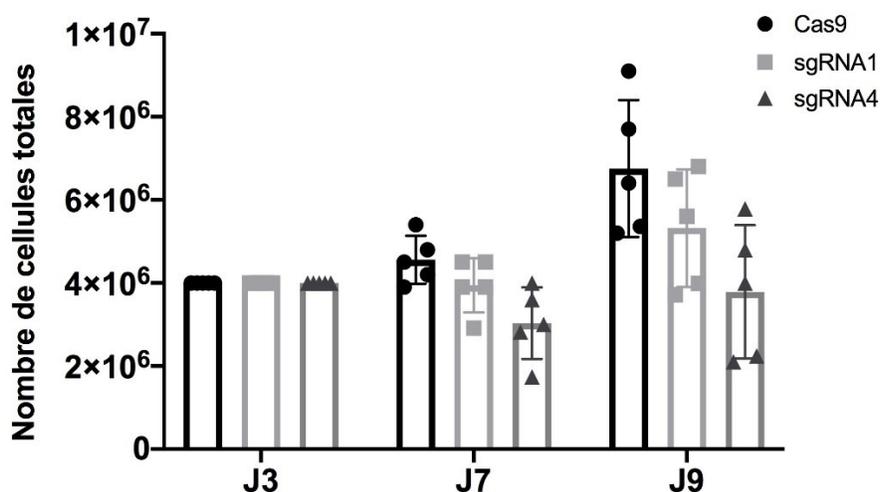


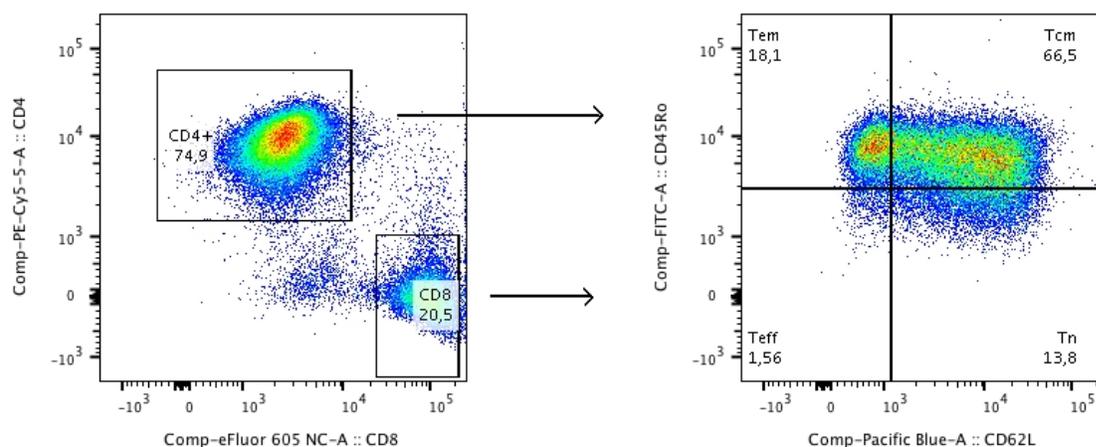
Figure 14. – Cinétique de croissance cellulaire des cellules avant ajout du tacrolimus

Représentation de la moyenne du nombre total des cellules électroporées avec la Cas-9 seule (En noir, points ronds), complexée au sgRNA-1 (En gris clair, points rectangulaires) ou au guide sgRNA-4 (En gris foncé, points triangulaires). Le décompte des cellules a été réalisée au bleu de trypan à 3^e jour (Jour de l'électroporation) puis au 7^e et 9^e en prenant compte des cellules vivantes. Chaque point représente un donneur différent. $n=5$

7.2.1.3. Le FBP12 KO n'induit pas de différences majeures dans la différenciation du lymphocytes T :

Afin de déterminer le profil de différenciation des lymphocytes T CD4 et CD8, nous avons effectué un phénotypage de ces derniers au 9^e jour, soit 5 jours post-électroporation et avant l'ajout des drogues immunosuppressives. L'utilisation des marqueurs CD45Ro et CD62L nous ont permis de catégoriser les différentes populations de lymphocytes T : Naïfs, mémoires (centraux et effecteurs), et effecteurs. Nous remarquons, pour les populations Tcm ou Tem, une tendance pour une augmentation de la population Tem, et, inversement, une même tendance pour la diminution de population Tcm attribuée aux conditions électroporées par sgRNA-1 et surtout sgRNA-4 comparativement aux cellules électroporées par Cas9 seule. Ceci témoigne ainsi d'une plus forte différenciation de ces lymphocytes T FKBP12KO. Cependant, la prédominance de la population centrale mémoire observée dans toutes les conditions (Cas9, sgRNA-1 ou sgRNA-4) comparativement aux populations naïves et effectrices, indiquent que le KO du FKBP12 n'altère pas la différenciation globale des lymphocytes T. (Figure 15.B)

(A)



(B)

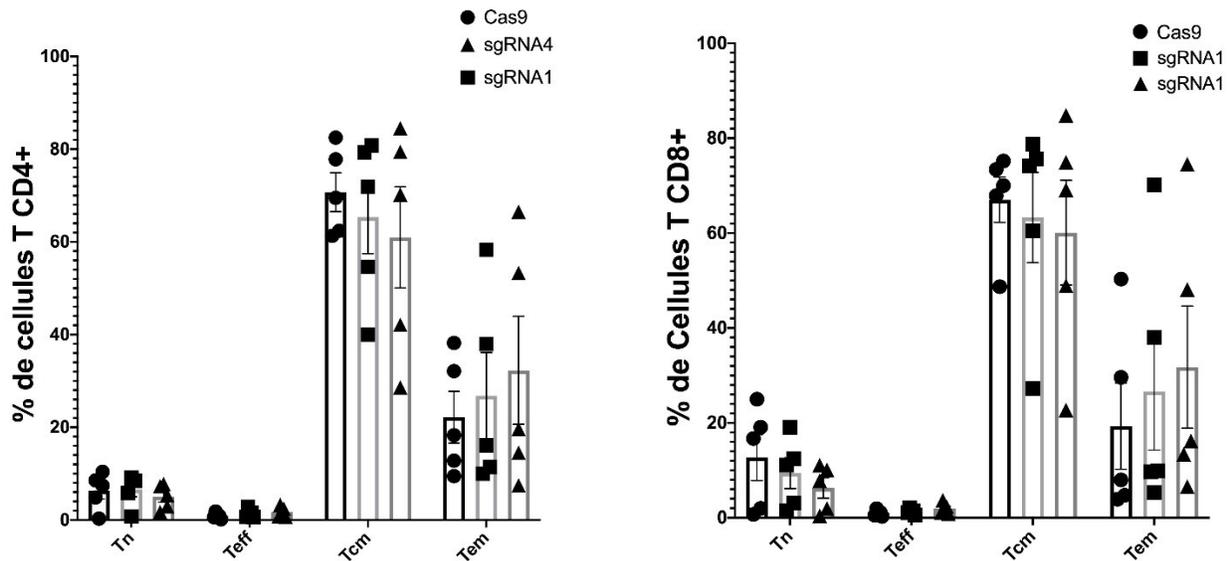


Figure 15. – Phénotype des lymphocytes T CD4+ (A gauche) et CD8+ (A droite)

A : Stratégie de gating des populations lymphocytaires TCD4 et TCD8+ en fonction de leur stade de différenciation à l'aide des marqueurs CD45Ro et CD62L : Lymphocytes T effecteurs mémoires ou Tem (CD45RO+ CD62L-), T centraux mémoires ou Tcm (CD45RO+, CD62L+), T naïfs ou Tn (CD45Ro-, CD62L+) et enfin T effecteurs ou Teff (CD45Ro-, CD62L-). B : Représentation des pourcentages de lymphocytes T naïfs, effecteurs, et mémoires centraux ou effecteurs des lymphocytes TCD4 (A gauche) et TCD8 (A droite) pour les conditions de cellules électroporées avec sgRNA1 et sgRNA4 comparativement aux cellules contrôles représentés par cellules électroporées par Cas9 uniquement au 9^e jour de culture, soit 7 jours après l'électroporation sur 5 donneurs. Chaque point représente un donneur différent.

7.2.1.4. Les cellules FKBP12 KO ont un avantage de croissance en présence de tacrolimus:

Au 15^e jour, soit 7 jours après l'ajout du Tacrolimus, un avantage sur la croissance cellulaire est attribué aux cellules électroporées avec le sgRNA-4 et sgRNA-1. En effet, nous observons une tendance (non statistiquement significative) attribuée aux conditions électroporées pour une croissance non modulée par l'action du tacrolimus comparativement aux cellules électroporées par Cas9. (Figure 16)

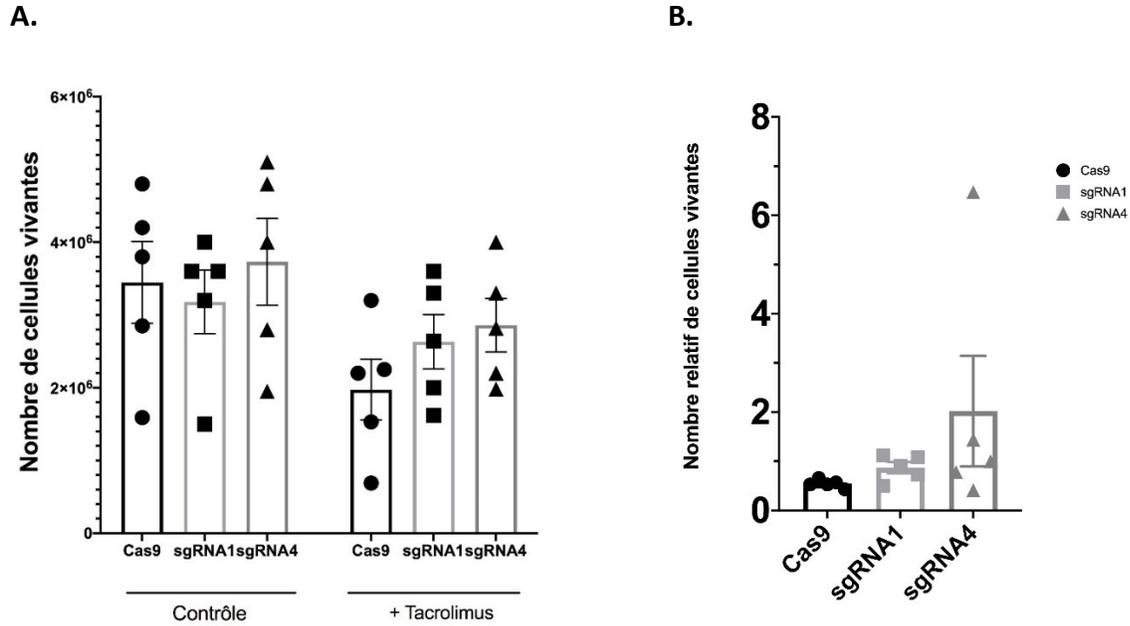


Figure 16. – Croissance cellulaire des cellules après ajout du tacrolimus.

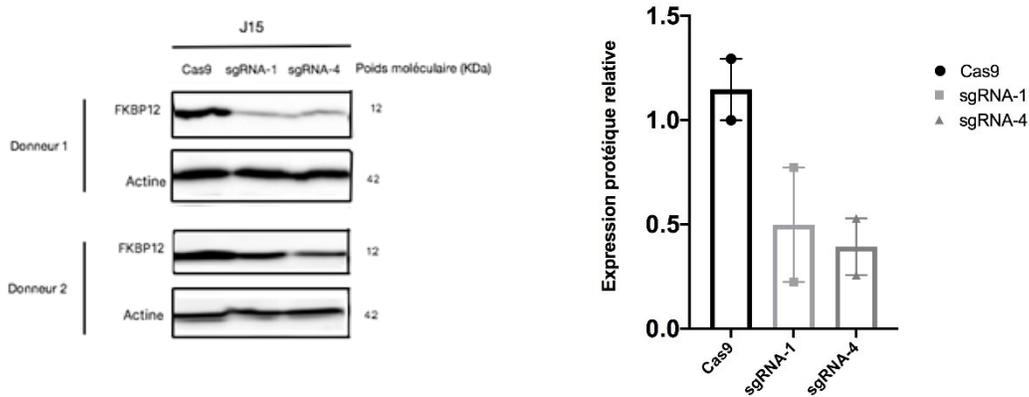
A : Représentation du nombre total des cellules électroporées avec Cas9 seule ou complexée avec sgRNA1 et sgRNA4 comparativement aux cellules contrôles représentées par les cellules ou l’ajout du tacrolimus n’a pas été fait, au 15^e jour de culture, soit 7 jours après ajout du tacrolimus sur 5 donneurs. B. Représentation des ratios entre les cellules non traitées (Contrôle) et traitées avec Tacrolimus pour les cellules électroporées avec Cas9 seule ou complexée avec sgRNA1 et sgRNA4. Chaque point représente un donneur différent. $n=5$

7.2.1.5. Les cellules FKBP12 KO ne présentent pas de meilleure croissance en présence de rapamycine :

Du fait que la FKBP12 soit une immunophiline qui médie l’action du tacrolimus, mais aussi de la rapamycine, une évaluation de l’effet adjoint de la rapamycine à des cellules FKBP12KO a été réalisée sur 3 donneurs. Une nucléofection avec les guides sgRNA-1 et 4 a été réalisée sur des cellules ayant été activés par CD3-CD28 deux jours auparavant, suivie d’une restimulation polyclonale au 7^e et 9^e jour de culture. Les cellules contrôles sont des cellules ayant été électroporées avec la Cas9 seulement.

Une baisse de la quantité du FKBP12 a été remarquée sur les extractions protéiques du 15^e jour de culture (Figure 17.A), témoignant de l'efficacité du Knock-out. Les cellules ont également été comptées. Il n'y a pas de différence observée entre les cellules électroporées avec le sgRNA-1 ou sgRNA-4 en présence de rapamycine comparativement à la condition Cas9. (Figure 17.B) Ceci est expliqué par le fait que l'immunosuppression induite par la rapamycine ne soit pas exclusivement dépendante de la FKBP12.

A.



B.

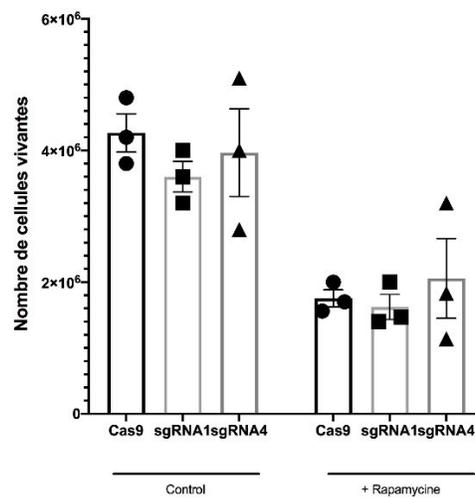


Figure 17. – Effets de la rapamycine sur les lymphocytes T FKBP12 KO

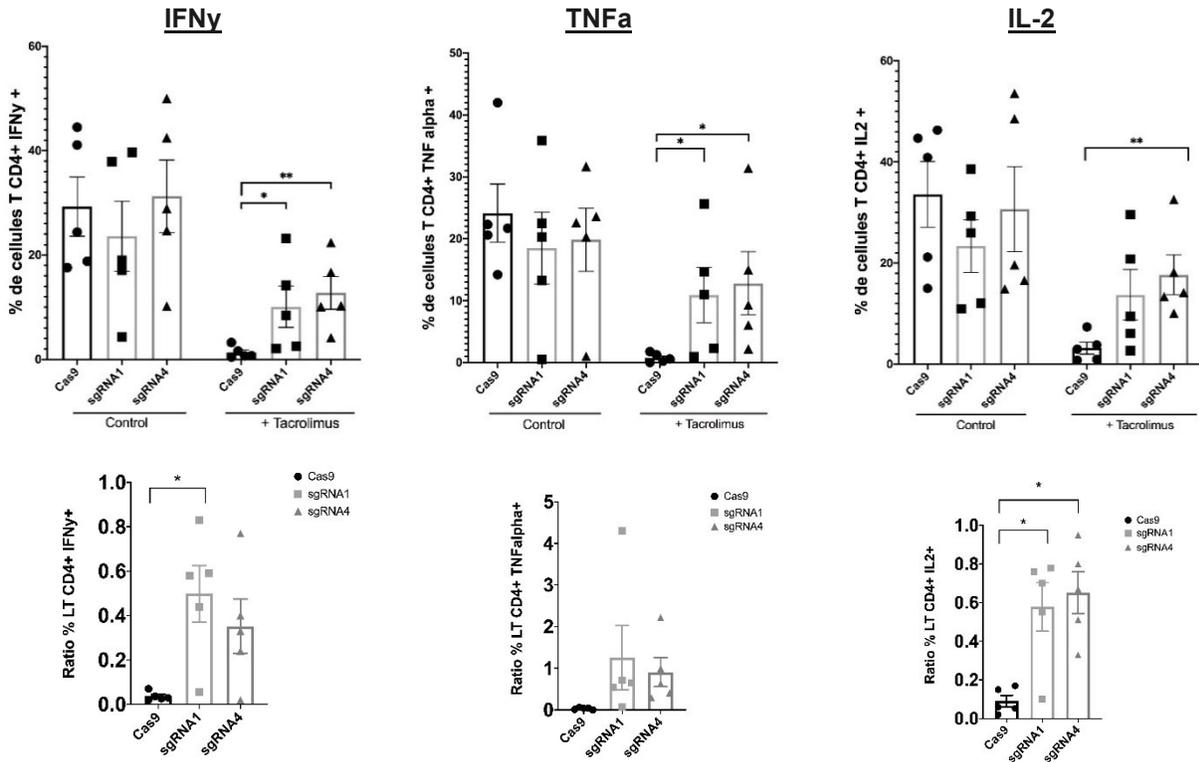
Détection de l'expression du FKBP12 dans des lysats protéiques des 3 conditions : Cellules électroporées avec sgRNA-1, sgRNA-4 et Cas9 seulement, en présence de rapamycine, collectés

au 15^e jour. $n=2$. (B) À droite, Représentation du nombre total de cellules électroporées avec Cas9 seule ou complexée avec sgRNA-1 et sgRNA-4 comparativement aux cellules contrôles représentées par les cellules ou l'ajout du tacrolimus n'a pas été fait au 15^e jour de culture, soit 7 jours après ajout de la rapamcyine. $n=3$

7.2.1.6. Le FKBP12 KO produisent des cytokines en présence au tacrolimus :

Enfin, afin de confirmer la fonctionnalité des cellules électroporées en présence du tacrolimus, nous avons effectué un marquage cytokinique intracellulaire de trois cytokines : IFN γ , TNF α et IL-2, suite à une activation par PMA et ionomycine, en présence et absence de tacrolimus, des deux conditions électroporées avec les deux guides et contrôle (Cas9 seule). On note un rétablissement partiel de la synthèse des trois cytokines pour les lymphocytes T dont le gène FKBP12 a été invalidé en présence de tacrolimus, pour les populations LT CD4 (Figure 18.A) ou LT CD8. (Figure 18.B)

A.



B.

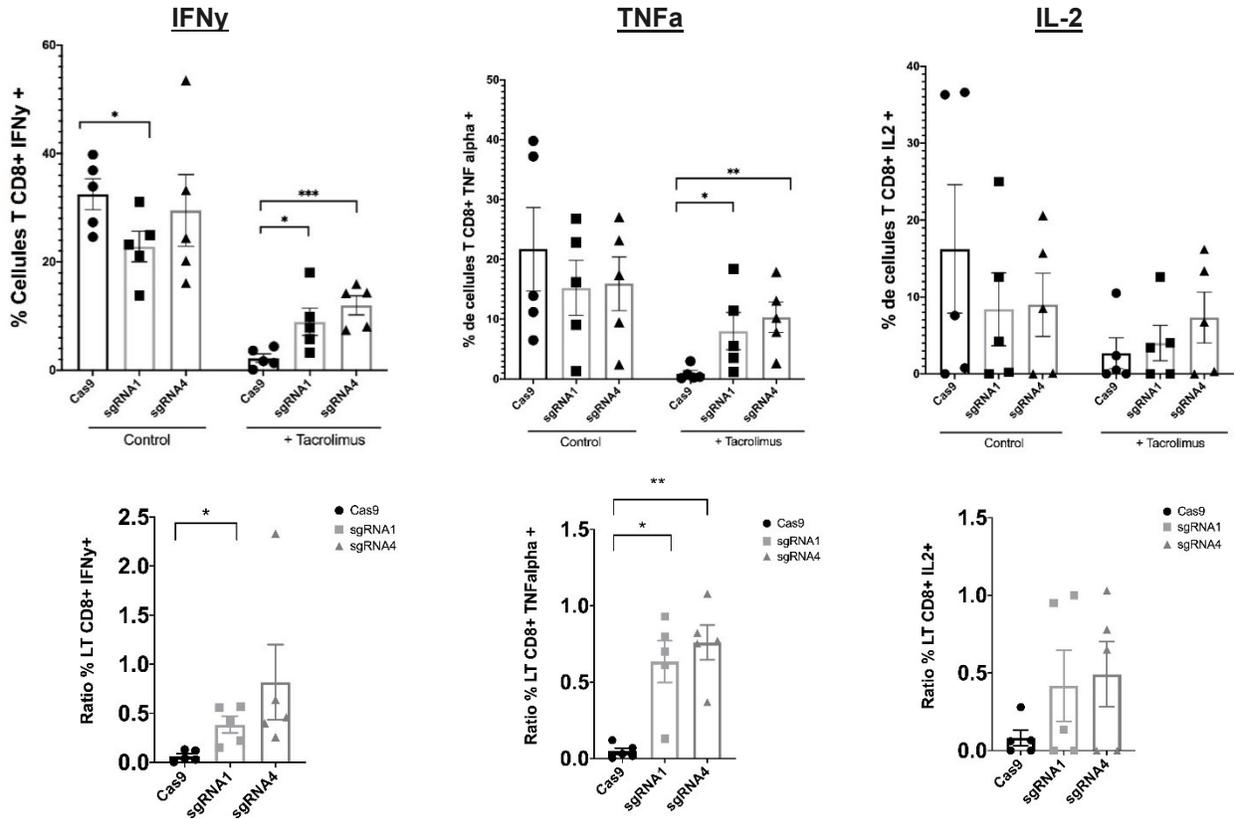


Figure 18. – Marquage intracellulaire cytokinique des lymphocytes CD4+ et CD8+

A : Pourcentage de lymphocytes T CD4+ ayant produits de l'IFN γ (A gauche), TNF α (Au milieu) ou IL-2 (A droite) pour les conditions de cellules électroporées avec Cas9 seule ou complexée avec sgRNA1 et sgRN4 comparativement aux cellules contrôles représentés par les cellules sans ajout de tacrolimus, au 15^e jour de culture, soit 12 jours après l'électroporation. En dessous, les ratios de lymphocytes T CD4+ traités et non traités par le tacrolimus et ayant produits les cytokines IFN γ (A gauche), TNF α (Au milieu) ou IL-2 (A droite). B : Pourcentage de lymphocytes T CD8+ ayant produits de l'IFN γ (A gauche), TNF α (Au milieu) ou IL-2 (A droite) pour les conditions de cellules électroporées avec Cas9 seule ou complexée avec sgRNA1 et sgRN4 comparativement aux cellules contrôles représentés par les cellules sans ajout de tacrolimus, au 15^e jour de culture, soit 12 jours après l'électroporation. En dessous, les ratios de lymphocytes T CD4+ traités et non traités par le tacrolimus et ayant produits les cytokines IFN γ (A gauche), TNF α (Au milieu) ou IL-2 (A droite). $n=5$.

des ratios de sécrétion cytokinique entre les lymphocytes T traitées avec et sans tacrolimus :

7.2.2. Transductions lentivirales du pCCL et pCCL-CD19 sur des lymphocytes polyclonaux :

7.2.2.1. Les vecteurs utilisés sont efficaces :

Ayant pour but d'ajouter une composante anti-tumorale à des lymphocytes T polyclonaux et résistants à l'action du tacrolimus, une insertion du transgène qui contient une séquence codante pour un CAR-CD19 par transduction lentivirale a été réalisée. Dans le but d'étudier l'efficacité des plasmides d'intérêt utilisés, une transfection transitoire des constructions plasmidiques a été réalisée dans des cellules HEK293T. Le transgène introduit n'est donc exprimé que pendant une période limitée et n'est pas intégré dans le génome. Notre plasmide d'intérêt est le pCCL-CAR CD19. Deux contrôles ont été utilisés : Le premier est représenté par des cellules HEK293T n'ayant pas été transduits, le deuxième est constitué de cellules de la même lignée ayant été transduites par un vecteur vide. Tous les vecteurs contenaient une séquence codante pour le marqueur d'expression : CD271 ou le récepteur NGF ou nerve growth factor tronqué, dépourvu de signalisation propre puisque tronqué.

Une efficacité de transfection est observée pour les trois vecteurs utilisés par une expression du NGFR à 49.2% et 54.7% pour les cellules transfectées par pCCL (Vecteur vide) et pCCL-CAR CD19 respectivement. (Figure 19) Ce résultat nous permet de confirmer l'efficacité des plasmides utilisés.

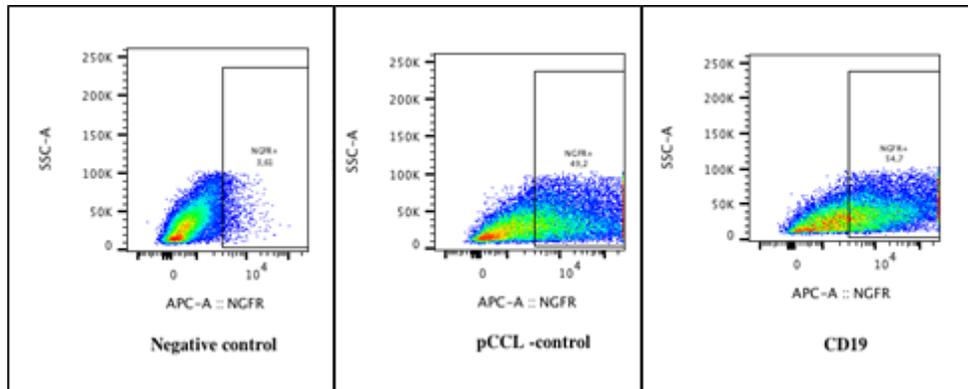


Figure 19. – Efficacité de transfection transitoire du pCCL-CAR CD19et pCCL sur des HEK293

Représentation par “dots plots” de l’expression du NGFR, exprimée en % de cellules NGFR positives, sur des cellules HEK293, suite à une transfection transitoire. Le marquage a été fait par un anticorps monoclonal fluorescent anti-CD271 (NGFR) en cytométrie en flux.

7.2.2.2. La production de virions contenant le transgène pCCL ou pCCL-CAR CD19 est efficace :

Dans le but de déterminer la concentration optimale de virions permettant d’obtenir une transduction efficace, une titration virale fonctionnelle est nécessaire et a été réalisée, dans nos expériences, sur des cellules HEK293T ayant été mises en culture et transduites au lendemain avec des dilutions sériées de virus. La titration virale fonctionnelle, exprimée en TU/mL, correspond à la dilution du virus capable d’infecter 20% de cellules HEK293, cela étant déterminé en fonction du pourcentage de NGFR+ exprimé. Ainsi, en considérant la dilution permettant un taux de transduction optimal de 20%, le calcul correspond au nombre de cellules mises en culture (30000 cellules) multiplié par le pourcentage de NGFR exprimé sur les cellules (20%) et mesuré

par cytométrie en flux, le tout divisé par le volume viral en ml (0.006ml). Le titre du virus est donc estimé à 10.000 UI/ul. (Figure 20) Ces virus ont ensuite été utilisés pour la transduction de lymphocytes T humains.

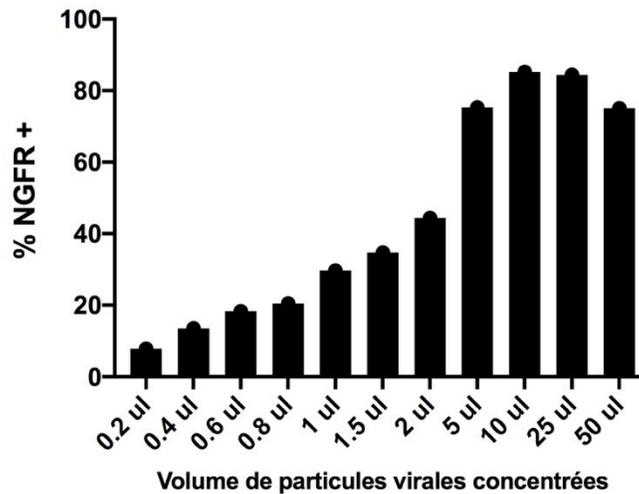


Figure 20. – Titrations sur HEK293 des lentivirus codants pour le pCCL-CAR CD19

Représentation par histogramme de l'expression du CAR, exprimée en % de cellules NGFR positives, sur des cellules HEKs avec des volumes croissants afin de déterminer la titration virale cible. Le marquage a été fait par un anticorps monoclonal fluorescent anti-CD271 (NGFR).

Afin de confirmer la faisabilité de transduction lentivirale sur des lymphocytes T, une première transduction de lymphocytes T humains a été réalisée en utilisant un vecteur lentiviral vide pCCL, qui ne contient qu'une séquence codante pour le NGFR tronqué sur des lymphocytes T ayant été isolés des PBMC puis stimulés par CD3-CD28 à J0. Ces lymphocytes ont été transduits au 2^e jour de culture à raison d'une MOI=2. Un taux de transduction de 11.5% et 25% dans les lymphocytes T CD4 et T CD8, respectivement démontre la réussite de l'expression du pCCL sur les cellules T et donc, de la transduction lentivirale. (Figure 21)

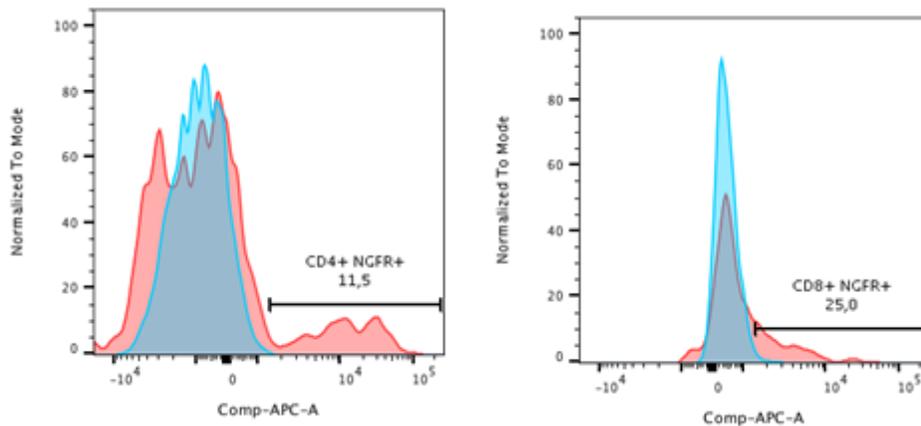


Figure 21. – Expression du pCCL (vecteur vide) sur lymphocytes T primaires activés par CD3-CD28

Représentation par histogramme de l'expression du CAR, exprimée en % de cellules NGFR positives, sur les lymphocytes T CD4+ (à gauche) et CD8+ (à droite), non transduits (en bleu) et transduits (en rouge), à une MOI=2. Le marquage a été fait par un anticorps monoclonal fluorescent anti-CD271 (NGFR).

7.2.2.4. Les lymphocytes T polyclonaux transduits expriment le pCCL-CAR CD19 :

Dans le but de faire exprimer un CAR CD19 sur des lymphocytes T activés par CD3-CD28, nous avons transduits ces derniers en utilisant un vecteur lentiviral pCCL CAR CD19 contenant le transgène d'intérêt. À J0, les lymphocytes ont été isolés et stimulés d'une façon polyclonale. La transduction a été réalisée au 2^e jour de culture à raison d'une MOI=2. Une meilleure transduction est observée pour les lymphocytes T CD4 comparativement aux TCD8 (42.9% versus 14.6%=) et démontre la réussite de l'expression du pCCL-CAR CD19 sur les LT humains. (Figure 22)

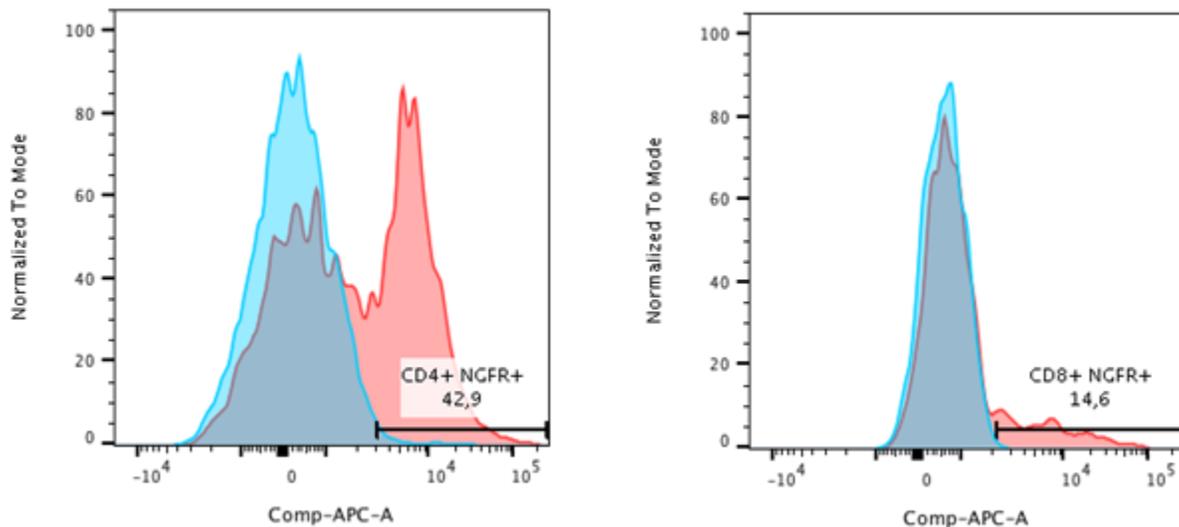


Figure 22. – Expression du pCCL-CD19 sur lymphocytes T primaires activés par CD3-CD28.

Représentation par histogramme de l’expression du CAR, exprimée en % de cellules NGFR positives, sur les lymphocytes T CD4+ (à gauche) et CD8+ (à droite), non transduits (en bleu) et transduits (en rouge), à une MOI=2. Le marquage a été fait par un anticorps monoclonal fluorescent anti-CD271 (NGFR).

7.2.3. Transductions lentivirales du pCCL et pCCL-CD19 sur des lymphocytes polyclonaux FKBP12KO :

7.2.3.1. Le KO du FKBP12 avant l’activation du lymphocyte T est efficace :

Dans le but de générer des lymphocytes T résistants à l’action du tacrolimus avec une composante anti-tumorale, une transduction lentivirale de pCCL CAR CD19 a été réalisée sur des cellules électroporées par Cas9 seulement, ou complexée au sgRNA-1 ou 4. Pour des raisons de faisabilité technique décrites dans la discussion, un changement dans la chronologie de délétion du gène FKBP12 sur des lymphocytes T isolés a été fait deux jours avant l’activation du lymphocyte T. Les cellules ont été transduites au 3^e jour pour enfin être restimulées au 7^e jour. Une diminution des quantités de FKBP12 a été observée dans les cellules électroporées avec le guide sgRNA-1 au

7^e et 15^e jour, reflétant une efficacité du KO. Dû à des problématiques d'ordre technique, étant l'apparition d'un message d'erreur de l'électroporateur de la condition électroporée par sgRNA-4, seules les conditions ayant été électroporées par sgRNA-1 et Cas9 ont été maintenues. La diminution du FKBP12 dans la condition sgRNA1 au western-Blot témoigne de l'efficacité du KO et confirme ainsi la faisabilité d'un KO efficace du FKBP12 avant l'activation du lymphocyte T. (Figure 23)

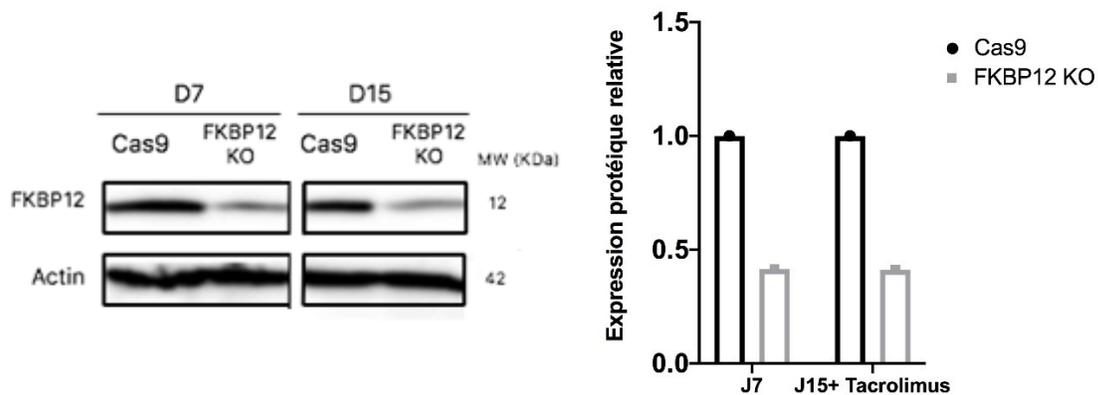


Figure 23. – Efficacité du knock-out du FKBP12 au Western Blot.

Détection de l'expression du FKBP12 dans des lysats protéiques des 2 conditions : Cellules électroporées avec Cas9 seulement ou complexée au sgRNA-1, avant et après l'ajout de tacrolimus au 7^e jour. Les cellules ont été collectées au 7^e et 15^e jour. $n = 1$

7.2.3.2. Le KO du FKBP12 à J0 n'est pas délétère pour la croissance de ces lymphocytes T :

Dans le but d'observer l'effet de la délétion du gène du FKBP12 sur la croissance des lymphocytes n'ayant été activés qu'après nucléofection, un décompte de cellules a été effectué avant l'électroporation à J0, puis lors de l'activation à J2, ainsi qu'au 7^e et 15^e jour. Il est important de noter que l'ajout du tacrolimus a été fait au 7^e jour. Après 3 jours de l'électroporation, reconnue pour être toxique pour les cellules, une baisse de la croissance globale des cellules électroporées et contrôles a été observée, suivie par son augmentation pour les 2 conditions suite à l'activation par CD3-CD28 au 2^e jour, et ce, malgré l'ajout du tacrolimus. (Figure 24)

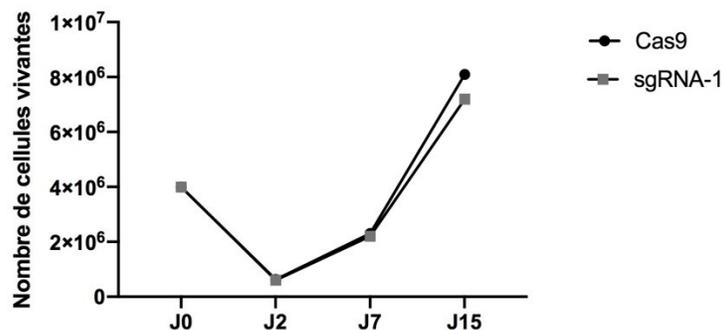


Figure 24. – Cinétique de croissance cellulaire des cellules avant et après ajout du tacrolimus:

Représentation du nombre total des cellules électroporées avec la cas 9 seule (en noir, points ronds), ou complexée au sgRNA-1 (en gris clair, points rectangulaires). Le décompte des cellules a été réalisé au bleu de trypan à 3^e jour (Jour de l'électroporation) puis au 7^e et 15^e en prenant compte des cellules vivantes. $n=1$

7.2.3.3. Les lymphocytes FKBP12KO activées après nucléofection sont fonctionnelles :

Dans le but de confirmer le caractère fonctionnel des cellules électroporées avant activation, et ce, en présence du tacrolimus, nous avons effectué un marquage cytokinique intracellulaire de trois cytokines : IFN γ , TNF α et IL-2, suite à une activation par PMA et ionomycine, en présence de tacrolimus, des deux conditions électroporées avec le guide 1 et le contrôle ayant été électroporé avec la Cas9 seulement. On note un rétablissement partiel de la synthèse des trois cytokines pour les lymphocytes T électroporées en présence de tacrolimus, signant la résistance des lymphocytes FKBP12 KO à l'action immunosuppressive du tacrolimus à la différence des lymphocytes contrôles. (Figure 25)

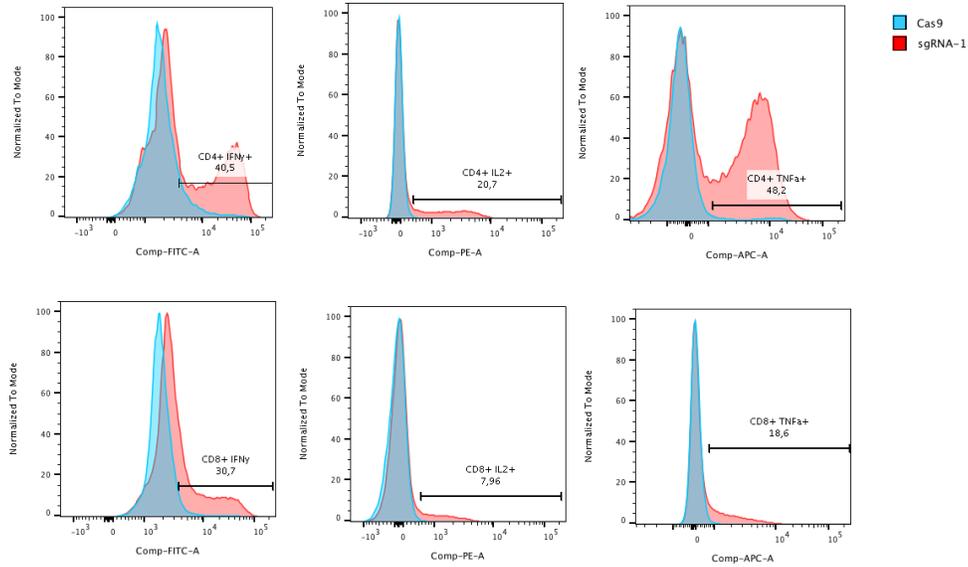


Figure 25. – Marquage intracellulaire cytokinique des lymphocytes CD4+ et CD8 :

Pourcentage de lymphocytes T CD4+ (en haut) et CD8+ (en bas) ayant produits de l'IFN gamma (à gauche), IL-2 (au milieu) ou TNF alpha (à droite) pour les conditions de cellules électroporées avec sgRNA1 comparativement aux cellules contrôles représentés par cellules électroporées par Cas9 uniquement, au 15^e jour de culture, soit 12 jours après l'électroporation. *n* = 1.

7.2.3.4. Les lymphocytes FKBP12KO transduites expriment le CAR CD19 :

À J3 de la culture, une partie des lymphocytes T a été collectée de chaque condition, c'est à dire Cas9 seulement ou sgRNA-1 à raison de 10⁴ cellules, afin d'être transduites par pCCL CD19 CAR. L'évaluation de la transduction a été réalisée au 7^e (Figure 26.A) et 15^e jour (Figure 26.B), démontrant une bonne expression de CD19 CAR dans toutes les conditions. Plus globalement, nous remarquons une meilleure transduction des conditions sgRNA-1 comparativement aux conditions Cas9.

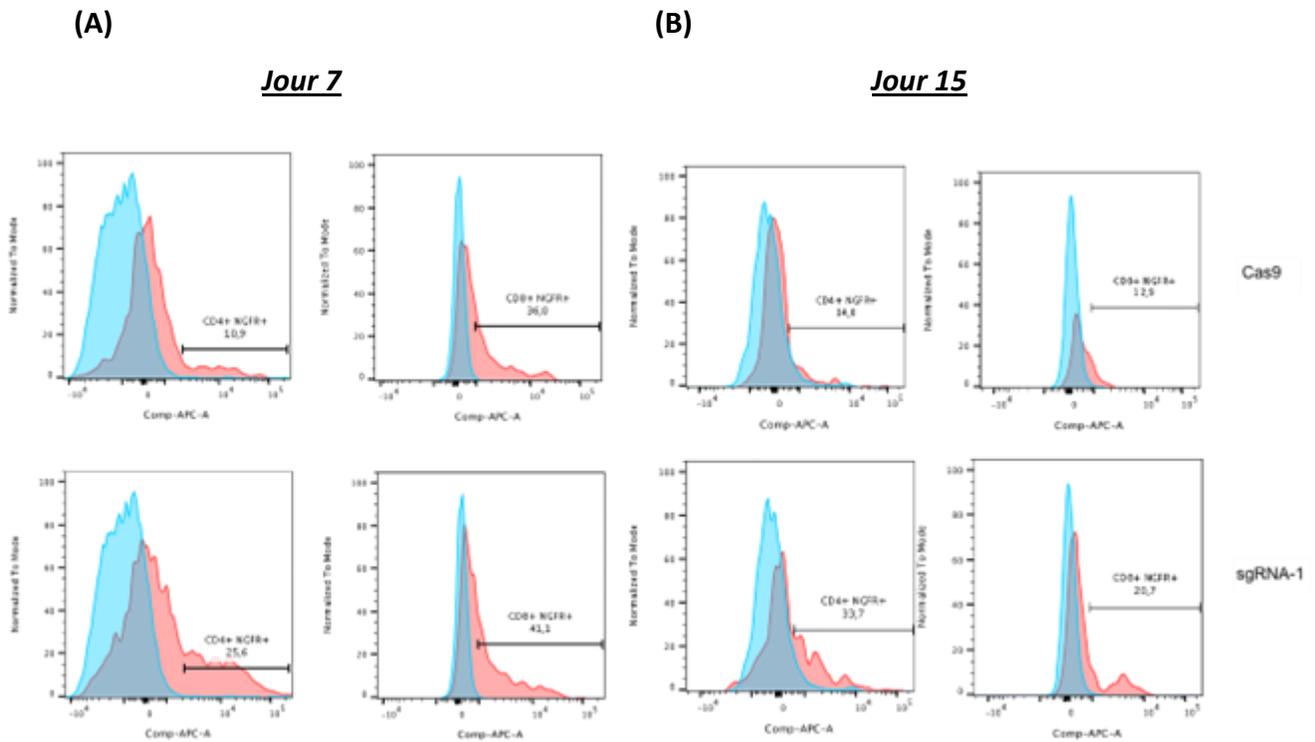


Figure 26. – Expression du pCCL-CD19 CAR sur des lymphocytes T FKBP12 KO activés par CD3-CD28

(A) Représentation par histogramme de l’expression du CAR, exprimée en % de cellules NGFR positives, sur les lymphocytes T CD4+ (à gauche) et CD8+ (à droite), des conditions électroporées par Cas9 seulement (En haut) ou complexée avec sg-RNA1 (en bas), non transduits (en bleu) et transduits (en rouge), à une MOI=3 au 7e jour. Le marquage a été fait par un anticorps monoclonal fluorescent anti-CD271 (NGFR). N=1.

(B) Représentation par histogramme de l’expression du CAR, exprimée en % de cellules NGFR positives, sur les lymphocytes T CD4+ (à gauche) et CD8+ (à droite), des conditions électroporées par Cas9 seulement (en haut) ou complexée avec sg-RNA1 (en bas), non transduits (en bleu) et transduits (en rouge), à une MOI=3 au 15e jour. Le marquage a été fait par un anticorps monoclonal fluorescent anti-CD271 (NGFR). N=1.

7.3. Délétion du gène FKBP1A et transductions lentivirales du pCCL-CD19 CAR dans des lymphocytes multivirus spécifiques:

7.3.1. Délétion du gène FKBP12 sur lymphocytes T multivirus spécifiques :

Dans le but de conférer une résistance au tacrolimus à des lymphocytes T spécifiques de multivirus, notre deuxième objectif consistait à déléter le gène FKBP12 dans les lymphocytes T ayant été mis en co-culture avec des cellules présentatrices d'antigènes ayant été pulsées avec des peptides viraux de CMV, EBV, BK et adénovirus, dont l'émergence est fréquemment observée chez les patients recevant des drogues immunosuppressives. Le KO a été fait au 5^e jour post-coculture suivi d'une restimulation au 7^e jour avec l'ajout du tacrolimus. Enfin, au 15^e jour, les cellules ont été collectées pour des fins d'évaluation finale.

7.3.1.1. Les cellules FKBP12 KO multivirus spécifiques ont une bonne croissance en présence de tacrolimus:

Dans le but d'observer l'effet de l'invalidation du FKBP12 sur la croissance des lymphocytes T activés par co-culture, un comptage de cellules a été effectué avant l'électroporation au 5^e jour, puis avant la 2^e restimulation au 7^e jour (Voir ligne de temps dans matériels et méthodes). Nous remarquons une bonne croissance des cellules, et ce, même après l'ajout du tacrolimus. Ceci confirme l'effet non délétère du knock-out dans la croissance des cellules avec ou sans tacrolimus. (Figure 27)

A

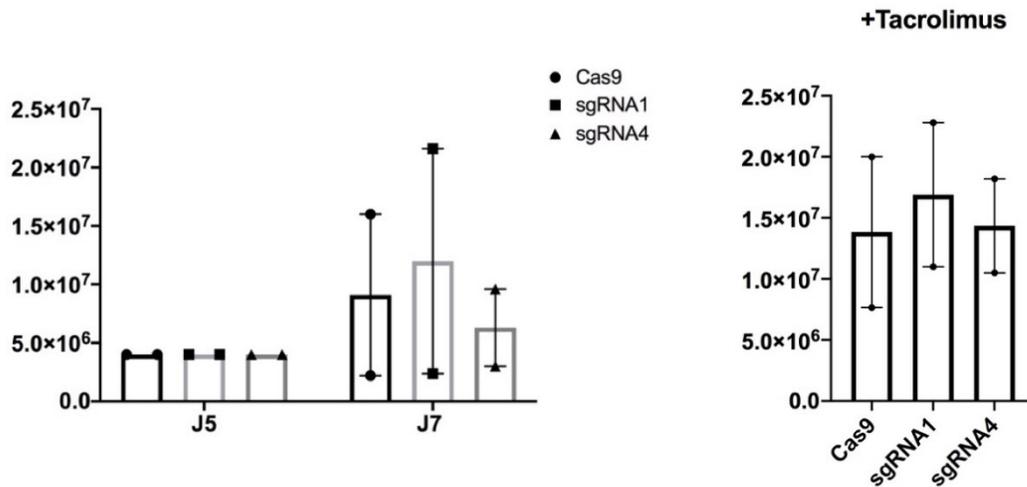


Figure 27. – Croissance cellulaire des cellules avant et après l’ajout du tacrolimus

(A) Représentation du nombre total des cellules électroporées avec sgRNA1 et sgRNA-4 comparativement aux cellules contrôles représentés par cellules électroporées par Cas9 uniquement du 5^e au 7^e jour de culture, sur 2 donneurs. Chaque point représente un donneur différent. (B) À droite, le nombre total des cellules électroporées avec sgRNA1 et sgRNA4 comparativement aux cellules contrôles représentés par cellules électroporées par Cas9 uniquement au 15^e jour de culture, soit 7 jours après ajout du tacrolimus. N=2

7.3.1.2. La délétion du FKBP12 confère une résistance à l’action du tacrolimus sur le plan fonctionnel :

Afin de déterminer la réactivité des lymphocytes T face aux différents peptides viraux de EBV, CMV, BK virus et adénovirus, un ELISpot a été fait au 15^e jour de co-culture. Les spots représentent les cellules qui sécrètent l’IFN γ en présence du peptide d’intérêt. Le tacrolimus a été ajouté à chaque condition. Une réactivité plus importante est présente pour les cellules électroporées avec le guide sgRNA-4 et sgRNA-1, en comparaison avec les conditions avec Cas9 seulement. (Figure 28) Ceci témoigne d’un rétablissement partiel de la fonction effectrice des cellules FKBP12KO en présence du tacrolimus et ainsi, de la faisabilité de génération de lymphocytes T fonctionnelle multivirus spécifiques et FKBP12 simultanément.

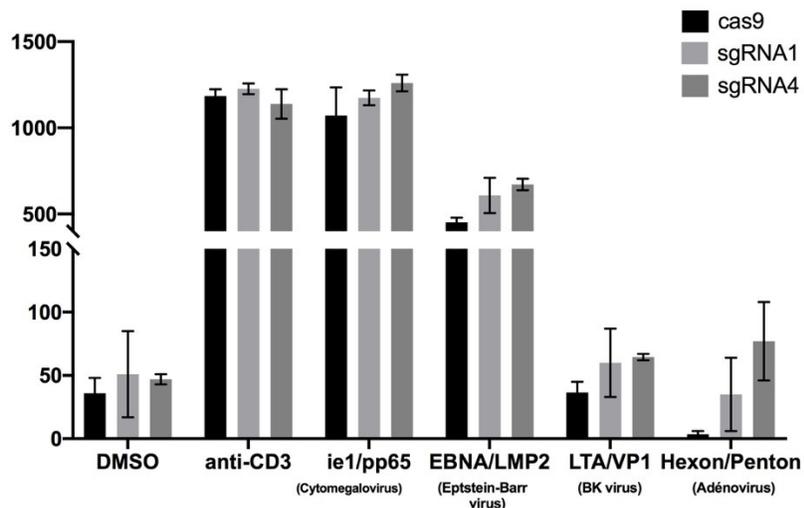


Figure 28. – Réactivité des lymphocytes T FKBP12 KO en présence de tacrolimus

Nombre de spots obtenus suite à une stimulation avec les différents peptides viraux en comparaison avec le peptide témoin de différentes conditions : Cellules électroporées avec Cas9 seulement ou composée avec sgRNA-1 ou sgRNA-4. Le témoin négatif est représenté par une condition où seul le DMSO a été ajouté. N=2.

7.3.2. Transductions lentivirales du pCCL-CD19 sur des lymphocytes lymphocytes T FKBP12KO multivirus spécifiques :

Dans le but de fournir une protection anti-virale mais également anti-tumorale et permettre la poursuite de l'immunosuppression préventive, nous avons pour dernier objectif de générer des lymphocytes T CAR-T et multivirus spécifiques résistants à l'action du tacrolimus. Ainsi, les lymphocytes T ont été nucléofectés avec Cas9 seulement, ou complexée au sgRNA-1 ou sgRNA-4 puis activés par co-culture avec des cellules dendritiques ayant été générés à partir de PBMC et pulsés par les peptides viraux d'intérêt (EBV, CMV, BKvirus et adénovirus). Les lymphocytes ont ensuite transduits par le pCCL-CD19 CAR.

7.2.3.1. Le KO du FKBP12 sur des lymphocytes T multivirus spécifiques et transduites est efficace :

Afin de générer des lymphocytes T multivirus spécifiques et résistants à l'action du tacrolimus avec une composante anti-tumorale, une transduction lentivirale de pCCL CAR CD19 a été réalisée sur des cellules électroporées par Cas9 seulement, ou complexée au sgRNA-1 ou 4. Quelques cellules électroporées avec le sgRNA-4 ont été transduites au 3^e jour pour enfin être restimulés au 7^e jour. Deux conditions de transductions ont été utilisées : MOI=2 et MOI=5. Par manque de cellules, nous n'avons pas pu effectuer de western-blot sur les lymphocytes électroporées avec sgRNA-4 et transduits à une MOI=5.

Une diminution des quantités de FKBP12 a été observée dans les cellules électroporées avec le guide sgRNA-1 et sgRNA-4 comparativement à la condition Cas9 seulement au 15^e jour,

reflétant une efficacité du KO. Cette diminution est également observée pour les cellules transduites, ce qui témoigne de la faisabilité d'un KO du FKBP12 dans des cellules générées par co-culture et transduites par le pCCL-CD19 CAR. (Figure 29)

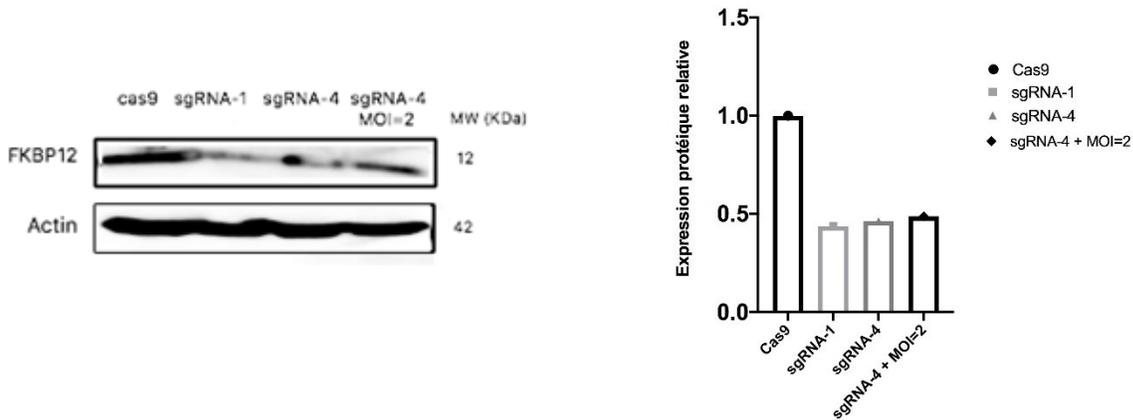


Figure 29. – Efficacité du knock-out du FKBP12 au Western Blot des cellules multivirus spécifiques et exprimant un pCCL-CAR CD19.

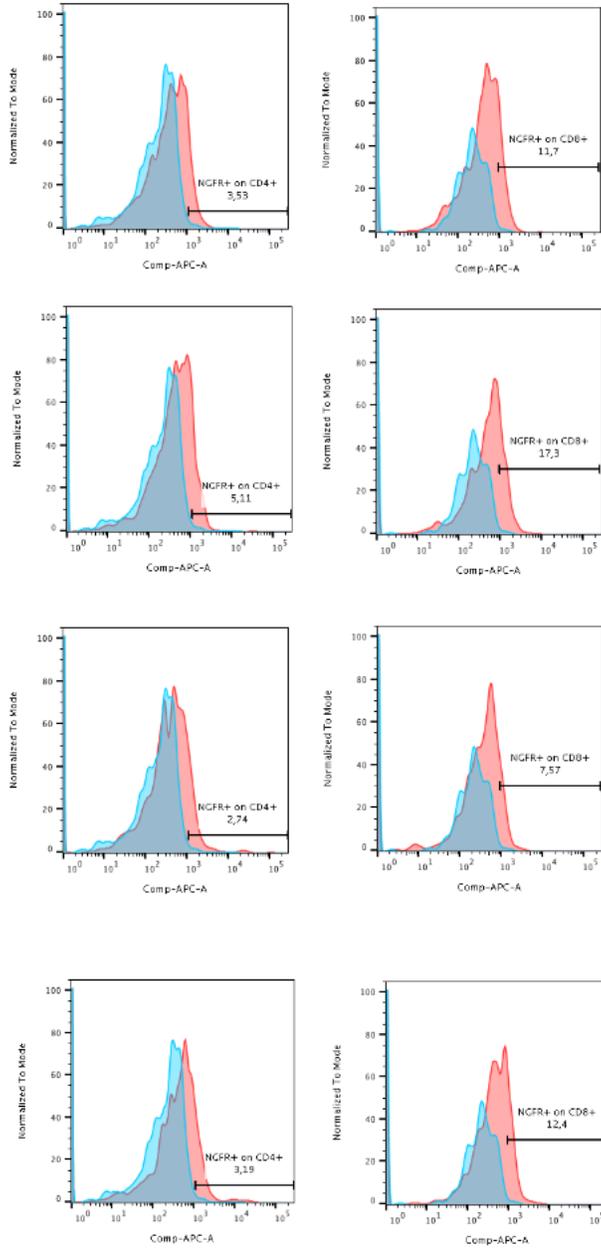
Détection de l'expression du FKBP12 dans des lysats protéiques des 4 conditions : Cellules électroporées avec Cas9 seulement ou complexée au sgRNA-1, sgRNA-4 ou sgRNA-4 transduites avec une MOI=2, après l'ajout de tacrolimus au 15^e jour. Les cellules ont été collectées au 15^e jour. *n* = 1

7.3.2.2. Les lymphocytes T FKBP12KO et multi-virus spécifiques expriment le pCCL-CAR-CD19 :

Au 2^e jour de co-culture, les cellules de chaque condition, c'est à dire Cas9 seulement ou complexée avec sgRNA-1 ou sgRNA-4, ont été collectées à raison de 100.000 cellules/future condition de transduction, afin d'être transduites par pCCL CD19 CAR. L'évaluation de la transduction a été réalisée au 7^e pour toutes les cellules transduites et au 15^e pour les conditions de cellules ayant survécu à la culture, pour des MOI=2 et 5, démontrant une bonne expression de CD19 CAR dans toutes les conditions. Globalement, nous remarquons une bonne efficacité de transduction pour toutes les conditions transduites au 7^e jour (Figure 30 A), dont la proportion augmente au 15^e jour (Figure 30 B). Ceci suggère une faisabilité de transduction dans des cellules FKBP12 KO générées par co-culture.

A

Jour 7



B

Jour 15

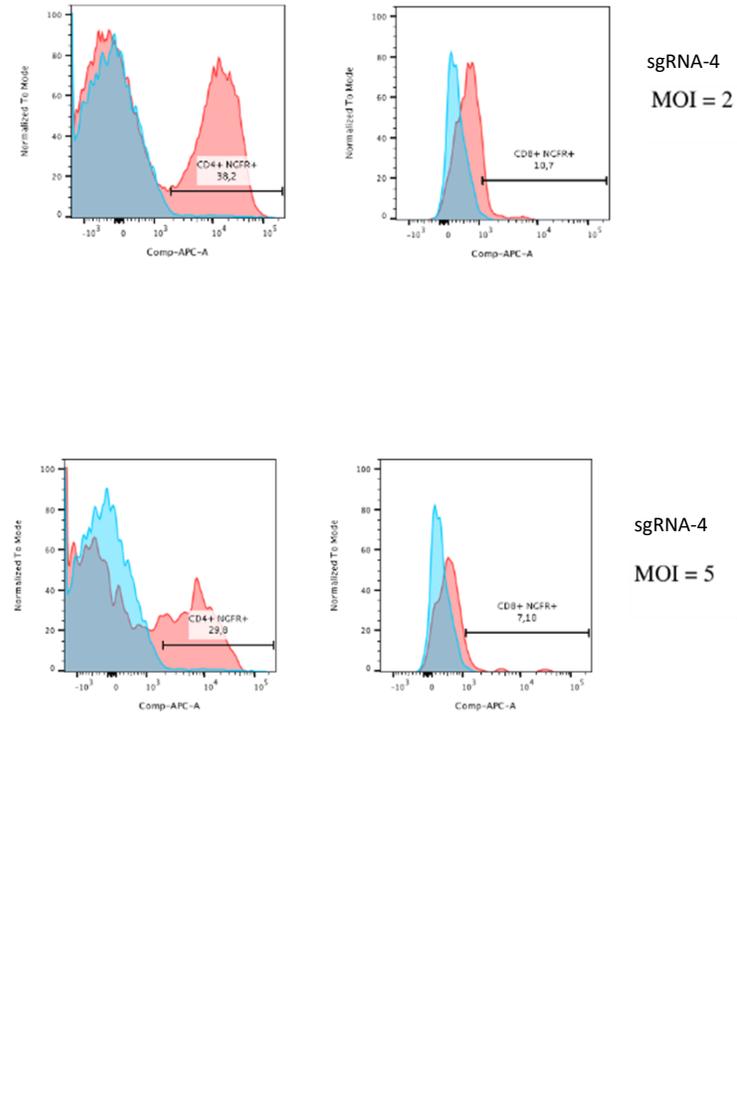


Figure 30. – Expression du pCCL-CAR CD19 sur lymphocytes T nucléofectés et activés par co-culture

A : Représentation par histogramme de l'expression du NGFR, exprimée en %, à J7, sur les lymphocytes T CD4+ (A gauche) et CD8+ (A droite), des conditions électroporées avec Cas9 seule, complexée avec sgRNA-1, ou sgRNA4 transduites avec MOI=2, ou sgRNA-4 transduites avec MOI=5. Les cellules non transduites sont représentées en bleu, et les cellules transduites en rouge. Le marquage a été fait par un anticorps monoclonal fluorescent anti-NGFR. n=1. B : Représentation par histogramme de l'expression du NGFR, exprimée en %, sur les lymphocytes T CD4+ (A gauche) et CD8+ (A droite), des conditions électroporées avec Cas9 complexée à sgRNA-4 à J15. Les cellules non transduites sont représentées en bleu, et les cellules transduites en rouge. Le marquage a été fait par un anticorps monoclonal fluorescent anti-NGFR n=1.

7.3.2.3. Les lymphocytes CD19 CAR-T et non CD19 CAR-T FKBP12KO sont multivirus spécifiques :

Enfin, dans le but de déterminer la réactivité des lymphocytes T FKBP12KO et exprimant les CAR-CD19 face aux différents peptides viraux de EBV, CMV, BK virus et adénovirus, un ELISpot a été fait au 15^e jour de co-culture en présence tacrolimus. Les cellules sécrétant de l'IFN γ sécrété sont représentés par des spots. Globalement, une réactivité dirigée envers les différents virus est remarquée pour toutes les conditions électroporées avec le sgRNA-4 en présence de tacrolimus, avec ou sans transduction. (Figure 31) Ceci témoigne de la faisabilité de génération de lymphocytes T fonctionnels multivirus spécifiques et FKBP12 KO.

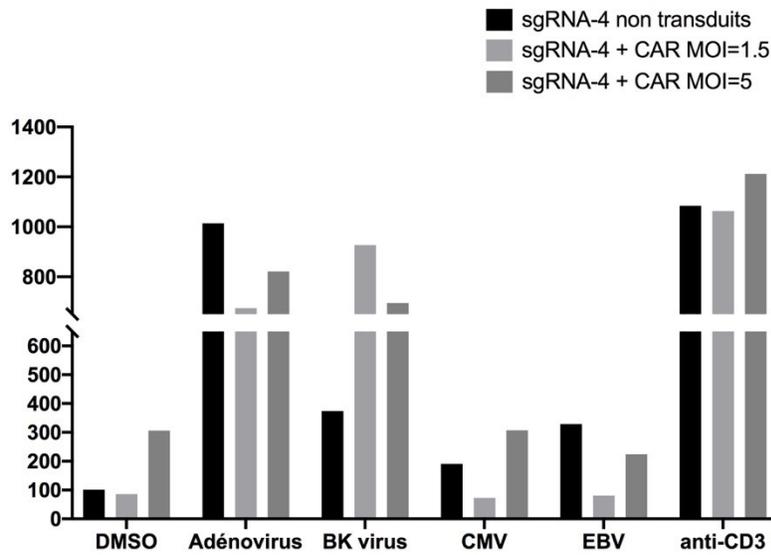


Figure 31. – Réactivité des lymphocytes T FKBP12 KO en présence de tacrolimus

Nombre de spots obtenus suite à une stimulation avec les différents peptides viraux des différentes conditions : Cellules électroporées avec sgRNA-4 non transduites ou transduites à une MOI=2 ou MOI=5. Le témoin négatif est représenté par une condition où seul le DMSO a été ajouté. N=1.

Chapitre 8 : Discussion

Le transfert adoptif de lymphocytes T est une stratégie thérapeutique qui connaît un franc succès dans le monde des immunothérapies et qui consiste à l'infusion de lymphocytes T ayant été manipulés ex-vivo à reconnaître des antigènes spécifiques, soient-ils tumoraux ou viraux. Les progrès de la thérapie génique ont permis la redirection de la spécificité et l'amélioration de l'efficacité de ces lymphocytes. Les transductions lentivirales et le CRISPR-CAS9, étant deux approches de modifications géniques très répandues, nous les avons utilisés dans ce projet afin de produire des CAR-T cells CD19 sur des lymphocytes T multivirus-spécifiques et résistants à l'action de l'immunosuppresseur tacrolimus. Cette résistance est conférée par la délétion ciblée du FKBP12, protéine médiatrice de l'action immunosuppressive du tacrolimus dans le lymphocyte T.

Le premier objectif consistait à confirmer la faisabilité d'un knock-out du gène codant pour FKBP12 et d'une insertion d'un transgène exprimant un CAR CD19 sur des lymphocytes T polyclonaux, et ce, à l'aide du système CRISPR-CAS9 et de transduction lentivirale, respectivement. Notre première cible d'optimisation fut le KO du FKBP12 dans des lymphocytes T activés ex-vivo à l'aide du CD3-CD28 par électroporation d'une CRISPR Ribonucléoprotéine composée de la nucléase Cas9 et d'un guide simple ARN spécifique à la séquence codante du gène du FKBP12. La technique d'édition génique CRISPR-CAS9, véritable révolution dans le monde de l'immunothérapie adoptive, a permis la génération de lymphocytes T édités maintenant utilisés en clinique.

Le choix du guide ARN utilisé pour la délétion du FKBP12, étant le guide-4 (Voir tableau 1) reposait sur son efficacité à produire la plus grande proportion de cellules délétées du FKBP12 sur cellules jurkats. En 2021, Amini *et al* avaient utilisé un guide ARN dont la séquence était similaire à notre guide-1 (Voir tableau 1), afin de produire des cellules résistantes à l'action du tacrolimus.(149) Nous avons donc utilisé les deux guides, sgRNA-1 et sgRNA-4. L'efficacité sur le plan génique du guide 4 a été confirmée par séquençage Sanger d'ADN de la région cible du sgRNA

et l'analyse a été faite par Track Indels Analysis ou TIDE, qui est décrite comme une méthode sensible, rapide, et efficace pour l'évaluation des indels obtenus par le système CRISPR-CAS9. (150, 151) Par la même méthode de séquençage, mais un différent algorithme d'analyse étant ICE ou index of CRISPR Edits, l'équipe Amini *et al* ont confirmé l'efficacité de notre guide 1 sur le plan génique. L'avantage présenté de la méthode ICE par rapport au TIDE n'est représenté que par la facilité de son utilisation ainsi son aspect automatisé pour le calcul des résultats d'édition CRISPR, permettant son utilisation pour l'analyse de plusieurs séquences en même temps.

Outre la confirmation du knock-out au niveau génique, la diminution de la quantité du FKBP12 constatée dans les western-blots des cellules électroporées avec les guides ARN par CRISPR-CAS9 a pu confirmer le KO de chaque donneur, ce qui n'avait pas encore été rapporté dans la littérature. La variabilité interindividuelle du knock-out entre les donneurs était attendue et repose sur le principe de variations géniques chez l'humain. En effet, cet effet a déjà été observé lors de l'utilisation d'autres technologies d'édition géniques tels que le ZFN et TALENs. L'identification des variants géniques par séquençage du génome entier (WGS) de chaque patient représente la meilleure méthode pour un choix plus personnalisé et spécifique du sgRNA, mais reste hautement coûteuse. (152, 153) Aussi, cela peut être expliqué par la variabilité des indels pouvant être générés par la voie NHEJ, qui est le mécanisme de réparation de l'ADN le plus fréquent chez l'humain. (154)

Cette voie de réparation d'ADN peut aussi représenter une cause de baisse de la croissance globale des cellules, cette dernière ayant été constatée pour les conditions de cellules électroporées avec les guides sgRNA-1 et d'une manière plus importante avec le guide sgRNA-4 (figure 14). Ceci s'expliquerait par la survenue d'un arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN occasionnés par ces DSB. (155) De plus, l'implication du knock-out du FKBP12 dans l'arrêt du cycle cellulaire a déjà été documentée dans la littérature. En effet, plusieurs équipes ont objectivé un impact de ce KO dans la levée d'inhibition de notre protéine d'intérêt sur le récepteur du TGF β , induisant par le biais des voies SMAD un arrêt du cycle cellulaire. Une autre hypothèse qui nous permettrait d'expliquer cette diminution serait un possible effet hors-cibles. Ces effets correspondent à une complémentarité du guide utilisé à une autre séquence génique et peuvent induire des erreurs ou des insertions pouvant induire un effet non voulu.

La baisse de croissance attribuée au sgRNA-1 et sg-RNA4 semble ne pas être directement corrélée à la toxicité rapportée de l'électroporation puisque la cinétique de croissance du contrôle demeure exponentielle et plus importante que celle des cellules électroporées avec les guides. Elle peut cependant être liée à un effet intrinsèque et spécifique du FKBP12 dans l'homéostasie du calcium du lymphocyte T. En effet, à l'instar du récepteur TGF β , le FKBP12 a déjà été rapporté comme régulateur des canaux calciques Ryanodine et IP₃R des lymphocytes T. L'invalidation du FKBP12 pourrait induire une diminution du seuil d'ouverture des canaux calciques, et ainsi, une libération importante du calcium intracellulaire qui peut être responsable d'une suractivation du lymphocyte T. Il a également été précédemment démontré que de forts signaux du TCR favorisaient la différenciation du lymphocyte T vers un phénotype T effecteur mémoire, dont la survie et la prolifération sont moindres que les T centraux mémoires ou naïfs. (156) Dans nos expériences, la tendance vers la diminution de la croissance cellulaire des conditions électroporées avec sgRNA-1 et surtout sgRNA-4 comparativement aux conditions électroporées avec Cas9 (Figure 14) est similaire à celle retrouvée au sein des populations de lymphocytes T centraux mémoires au 9^e jour de culture (Figure 15.B). Inversement, une tendance vers une augmentation dans la population des lymphocytes T centraux effecteurs est plus retrouvée pour les cellules électroporées par sgRNA-1 et 4, comparativement aux conditions Cas9. Ceci suggère donc un effet indirect du knock-out du FKBP12 dans la différenciation du lymphocyte T. Néanmoins, cet effet reste minime puisqu'il n'induit pas de différences significatives majeures dans la distribution globale des lymphocytes T puisqu'en effet, la population T centrale mémoire est la plus représentée, ce qui rejoint l'équipe d'Amini *et al* qui ont trouvé que les cellules éditées pour FKBP12 par la même méthode utilisée CRISPR-CAS9 étaient en majorité mémoires précoces. Ceci suggère que le knock-out du gène, bien qu'étant responsable de possibles changements dans la signalisation et différenciation du lymphocyte T, n'a pas d'effet majeur voir délétère sur la survie de nos cellules.

Notre première cible d'optimisation étant de conférer aux lymphocytes T une résistance au tacrolimus, l'ajout de ce médicament au 9^e jour de culture nous a permis d'apprécier son effet sur la croissance et la fonctionnalité au dernier jour de la culture. Ceci est d'autant plus soutenu par le fait que la croissance cellulaire soit basée sur le décompte cellulaire en prenant compte des

cellules vivantes et non des cellules totales. Aussi, l'absence de différence significative relative à la condition cas 9 était également attendue, car, à contrario de l'effet des autres immunosuppresseurs tels que le mycophenolate mofetil, le tacrolimus induit une diminution de l'expansion des lymphocytes T, mais à court terme. (157)

D'un point de vue fonctionnel, la délétion a conféré aux les cellules électroporés par les sgRNAs une résistance au tacrolimus puisque la synthèse cytokinique de l'IFN γ , de IL-2 et TNF sont conservés, au contraire des conditions contrôles électroporés avec seulement la Cas9. Ce rétablissement partiel de la synthèse cytokinique est plus significatif pour les conditions électroporées par le guide sgRNA-4, témoignant de son efficacité supérieure comparativement au guide sg-RNA1.

La FKBP12 est une immunophiline qui médie l'action du tacrolimus, mais également de la rapamycine. Cependant, l'immunosuppression induite par cette dernière n'est pas dépendante du FKBP12 d'une manière exclusive. Ainsi, l'observation de l'effet partiel de la rapamycine sur les cellules électroporées par sgRNA-1 ou sgRNA-4 comparativement aux conditions Cas9 était attendu. (Figure 17). Cependant, le grand écart type entre les différents donneurs ne nous permet pas de tirer une quelconque conclusion.

Le premier objectif du projet consistait également à produire des lymphocytes T exprimant un CAR-T CD19. Le choix de ce CAR repose sur son efficacité vis-à-vis des cellules tumorales exprimant le récepteur CD19 tels que les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC), des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et de certains lymphomes non-hodgkiniens à cellules B (NHL), ainsi que sa grande utilisation approuvée en clinique. Le choix d'utilisation d'un CAR CD19 de deuxième génération revient à son utilisation approuvée et plus étendue en clinique comparativement aux autres générations de CAR. (158)

Pour ce faire, le transgène codant pour le CAR CD19 a été introduit dans le génome des lymphocytes T par transduction lentivirale, qui représente la méthode la plus populaire. Le choix de cette méthode reposait aussi sur la résistance des lentivirus à l'extinction de gène, ou gene silencing ainsi que l'innocuité de son intégration dans le génome.(159) Cette technique nécessite l'utilisation d'un plasmide de packaging et de l'enveloppe, codants pour Gag/Pol/Rev/Tat et Env

respectivement. (160) Le plasmide de l'enveloppe utilisé dans nos expériences est le VSV-G en raison de son haut taux d'infectiosité. La vérification des vecteurs clonés par séquençage a été effectuée par l'équipe du laboratoire qui nous les a offert. Nous avons ensuite évalué son efficacité de transfection sur des cellules HEKs en effectuant une transfection transitoire. L'utilisation d'un contrôle positif étant nécessaire afin d'approuver les procédés et protocoles utilisés, le pCCL a donc été utilisé en tant que tel dans notre expérience de transfection transitoire ainsi que sur les essais de transduction sur des lymphocytes T primaires humains. L'efficacité de transfection et transductions a été évaluée, pour toutes nos expériences, par marquage du NGFR en cytométrie en flux, du fait de la présence dans le transgène d'intérêt de la séquence codante pour le récepteur NGF ou nerve growth factor tronqué. Toutes nos transductions ont été réalisées en présence du polybrène, une molécule polycationique permettant d'amplifier l'efficacité de transcription. Bien que cette molécule soit toxique pour les lymphocytes, elle reste communément utilisée, car elle permet d'avoir une bonne efficacité. (161)

Afin d'objectiver la concentration optimale de lentivirus pour une transduction efficace, nous avons réalisé une titration virale fonctionnelle sur des cellules HEKs, exprimée par unités de transduction par millilitre et reflétant la capacité du lentivirus à transduire une lignée cellulaire, représentée ici par les HEK293. L'utilisation de cette lignée repose sur sa facilité de transduction par l'utilisation du VSVg. Les méthodes de détermination de l'efficacité de transduction varient en fonction du marqueur inséré dans le transgène. En effet, pour les vecteurs ne contenant pas de marqueur fluorescent, ou ne fonctionnant pas sur des HEKs, le titre viral peut être déterminé par quantification de l'ADN génomique virale par PCR en temps réel. (162)

S'en est suivi des essais de transductions sur des lymphocytes T primaires qui étaient activés par CD3-CD28. Les protocoles de production lentivirale en clinique pour l'édition génique sur lymphocytes T se basant sur une stimulation CD3-CD28, l'utilisation de cette méthode est justifiée. (159) Cette activation, bien que facultative dans le cadre d'utilisation des lentivirus, est nécessaire lors de la transduction sur lymphocytes T. En effet, l'efficacité de transduction dans ce type cellulaire est dépendante de sa bonne activation et de sa prolifération. (163) Ceci justifie, sur un plan fondamental, l'acquisition d'une résistance des lymphocytes transduits par lentivirus aux drogues immunosuppressives ciblant leur activation, dont le tacrolimus. Cette efficacité

dépend également de l'infectiosité du lentivirus utilisé, déterminée par la MOI ou multiplicity of infection. La MOI, spécifique à chaque lignée cellulaire, est un ratio de nombre de particules virales capables d'infecter les cellules et du nombre de ces dernières. Pour nos expériences de transductions lentivirales du CAR CD19 sur ces lymphocytes T, l'utilisation d'une MOI de 3, ayant déjà été décrite par plusieurs équipes, a démontré une bonne efficacité de transduction. (164)

L'efficacité supérieure de transduction retrouvée dans les lymphocytes T CD4+ comparativement aux TCD8 était attendue dans cette culture basée sur une stimulation par CD3-CD28, car elle a déjà été décrite par Aleksandrova *et al* (165) Cette méthode d'activation, bien que conventionnellement utilisée pour une expansion polyclonale efficace, a le désavantage d'expansion minime de CD8 par rapport au CD4, ce qui peut expliquer la différence de transduction entre les deux populations dans nos expériences (166) Une forte proportion de lymphocytes T CD4 exprimant le CAR-T CD19 n'est pas problématique en soi. En effet, dans une étude de Melenhorst *et al*, une persistance de CD4+ a été observée chez des patients en rémission de leucémie de plus de 10 ans et ayant reçu un traitement à base de CAR-T CD19, prouvant ainsi le rôle de lymphocytes TCD4+ dans la cytotoxicité anti-tumorale.(131)

Le premier objectif du projet étant la génération de lymphocytes CAR-T résistants à l'action du tacrolimus, nous avons donc procédé à l'adjonction d'une transduction du pCCL CD19 sur des cellules ayant été éditées par CRISPR-CAS9 pour le knock-out du FKBP12. L'utilisation simultanée de ces deux techniques d'édition génique sur des lymphocytes T a déjà été décrite par l'équipe Stadtmayer *et al* en 2020 pour la génération de lymphocytes T qui à la fois expriment un TCR transgénique spécifique au NY-ESO-1 et dont les chaînes TRAC et TRBC du TCR endogène ainsi que le PD1 ont été invalidés. (147) La faisabilité de cette approche ainsi que son efficacité et innocuité a permis à la même équipe de conduire le concept en essai clinique et nous permet aujourd'hui d'utiliser la même approche.

Pour des raisons techniques, notamment la nécessité d'un grand nombre de lymphocytes T pour une nucléofection efficace par l'électroporateur Lonza 2D utilisé ainsi que la nécessité d'utilisation de grands volumes de virus concentrés pour une MOI optimale, nous avons procédé au changement de la chronologie de la nucléofection par rapport à l'activation et transduction.

En effet, l'activation puis la transduction ont été faits suivants la nucléofection. En prenant compte de l'effet du FKBP12 KO sur le lymphocyte T par sa suractivation et le possible passage rapide à un profil effecteur mémoire, une nucléofection de lymphocytes T considérés comme naïfs permettrait de freiner cette différenciation potentiellement "rapide" et néfaste pour les lymphocytes T. Cette chronologie "nucléofection puis l'activation suivie par la transduction" a également été utilisée par Agarwal *et al* en 2021, qui ont combiné l'utilisation d'une transduction lentivirale de CAR CD19 et un KO du gène codant pour PD1 et les chaînes du TCR endogène. Ces derniers ont d'abord isolés à J0, nucléofectés à J1, activés par CD3-CD28 à J2, puis transduits à J3, en présence d'IL-7 et IL-15. D'autres équipes ont également utilisé la même approche, mais en utilisant une chronologie différente : En 2017, l'équipe de Zhang *et al* ont combiné la transduction lentivirale pour l'expression d'un CAR CD19 avec une délétion du gène codant pour le LAG3 par méthode CRISPR-Cas9. Dans cette expérience, les lymphocytes dérivés de sang de cordon ombilical ont d'abord été purifiés et activés, transduits au 2^e jour et délétés au 5^e. (167) Tandis que l'équipe Choi *et al* avait procédé au KO de la chaîne TRAC du TCR et de la B2M en même temps qu'une transduction d'un CAR-T par l'utilisation d'un vecteur AA6 recombinant. De ce fait, et en se référant à ces différents travaux, des changements dans la chronologie des expériences sont à considérer dans notre projet. La première approche consistera à transduire les cellules au 2^e jour puis procéder au KO du gène FKBP12 au 5^e jour. Aussi, une édition génique par KO avec CRISPR-Cas9 du FKBP12 et une transduction lentivirale faite en même temps peut être envisagée.

L'utilisation de l'IL-7 dans nos expériences était justifiée par son rôle favorisant la viabilité des lymphocytes T non activés. Cependant, cette cytokine n'étant pas impliquée dans la prolifération des lymphocytes T (168), ceci expliquerait la baisse de croissance entre J0 et J3 des conditions électroporées sans activation préalable. Ceci est d'autant plus expliqué par la toxicité de l'électroporation, déjà décrite par Agarwal *et al* (164), et qui est passagère puisque l'augmentation de la croissance reprend au 7^e jour, soit 5 jours après la stimulation par CD3-CD28. Aussi, la croissance similaire des conditions électroporées avec Cas9 et sgRNA-1 en présence du tacrolimus peut être expliquée, comme pour les conditions électroporées après l'activation polyclonale, par le mode d'action inhibiteur du tacrolimus sur l'activation et non sur l'expansion du lymphocyte T. La résistance au tacrolimus est donc appréciée par la récupération partielle de

la synthèse des cytokines IFN gamma, TNF alpha et IL-2 en présence du tacrolimus comparativement aux conditions électroporées avec Cas9 seulement, témoignent de la résistance des cellules FKBP12 KO à l'égard de cet immunosuppresseur.

Quant à la portion de cellules transduites, nous remarquons une bonne efficacité de transduction pour les conditions contrôles Cas9 et, d'une manière plus importante, pour les conditions sgRNA-1, mais qui est transitoire. En effet, une moindre efficacité d'expression du CD19 CAR est remarquée au 15^e jour, et ce, pour les deux conditions Cas9 et sgRNA-1. Ceci peut être expliqué par une possible expansion des lymphocytes T non transduits entre le 7^e et le 15^e jour mais soulève, d'une part, la nécessité d'optimisation plus approfondie du protocole de transduction lentivirale et d'autre part, la reproduction de la même expérience sur plus de donneurs.

De plus, et d'une manière plus globale, l'expression du CD19 CAR est plus marquée pour les cellules FKBP12 KO que Cas9, suggérant une possible corrélation entre le KO et la transduction lentivirale. L'intégration des lentivirus se faisant d'une façon aléatoire dans le génome, l'insertion dans des sites ayant une activité transcriptionnelle beaucoup trop élevée ou au contraire beaucoup trop basse peut avoir un rôle sur la variabilité de l'expression du CAR (169).

Ceci nous ayant permis de prouver la faisabilité d'un knock-out par CRISPR-CAS9 et d'une transduction lentivirale CAR CD19 sur des lymphocytes T activés par CD3-CD28, le deuxième objectif était de reprendre le même principe et l'appliquer sur des cellules multi-virus spécifiques, et ce, dans le but de fournir une protection supplémentaire contre les virus les plus fréquemment retrouvés chez les patients recevant des drogues immunosuppressives tel que le tacrolimus. La première étape fut la confirmation de la faisabilité d'un knock-out par système CRISPR-Cas9 du FKBP12 dans des lymphocytes T générés par co-culture avec des cellules présentatrices d'antigènes pulsés par des peptides viraux d'intérêt.

Tout d'abord, la faisabilité de génération de lymphocytes T multi-virus spécifiques dans la prévention et traitement des infections virales post-transplantation est une approche qui a été rapportée par plusieurs équipes. (90, 170-177) et menée en clinique en 2006 par l'équipe Leen et

al (174). Au-delà de l'aspect antiviral, elle trouve également son utilité dans le traitement des maladies lymphoprolifératives post-transplantation associées au virus Epstein-Barr. (178)

L'avènement du système CRISPR-CAS9 et son utilisation dans l'édition génique des lymphocytes T a permis d'élaborer plusieurs approches ayant pour but l'augmentation de l'efficacité, prolifération et persistance des lymphocytes T virus ou multivirus spécifiques utilisés dans le cadre de leur transfert adoptif, notamment chez les patients recevant des traitements immunosuppresseurs. En effet, l'équipe Basar *et al* ont procédé à la génération de lymphocytes T multivirus-spécifiques résistantes à l'action des glucocorticoïdes. Le knock-out du gène du récepteur de glucocorticoïdes a été fait 7 jours après stimulation de PBMC en présence de bibliothèques de peptides viraux et des cytokines IL-7, IL-2 et IL-15. Une autre équipe Kaeuferle *et al*, quant à elle, a également généré des lymphocytes T résistants à la même molécule immunosuppressive, mais en utilisant un procédé qui se base sur l'isolation de lymphocytes T puis la sélection des virus spécifiques de virus par système de capture cytokinique. Les cellules T spécifiques ont ensuite été nucléofectés pour le KO du récepteur de glucocorticoïdes. (179, 180) Par le même principe de délétion du récepteur des glucocorticoïdes, Koukoulis *et al* a généré des lymphocytes T résistants à ces derniers et spécifiques aux multivirus (Adénovirus, CMV, EBV, BK) et à l'*Aspergillus fumigatus* par nucléofection de lymphocytes T 3 jours après activation. Cette activation a été faite par stimulation de PBMC par des peptides viraux en présence d'IL-4 et d'IL-7. Quant au tacrolimus, l'équipe d'Amini *et al*. a procédé au knockout du gène du FKBP12 par CRISPR-CAS9 7 jours après stimulation de PBMC par des peptides viraux du CMV et, ainsi, la sélection de LTs CMV-spécifiques en fonction de leur capacité de sécrétion de l'IFN gamma. (149) La même équipe a utilisé le même procédé afin de générer des lymphocytes T spécifiques du SARS CoV2 et résistants au tacrolimus. (181) Cette approche avait auparavant été décrite par De Angelis *et al*, qui avaient eu recours à la technique d'ARN interférence (siRNA) pour l'invalidation du gène FKBP12. (182)

Dans nos expériences, l'utilisation de PBMC autologues sans T irradiés (Voir section 6.5.1.) en tant que cellules présentatrices d'antigènes permet d'avoir un meilleur contrôle de ratio des populations utilisées, au-delà de l'aspect économique des réactifs puisque les PBMC sans lymphocytes T sont récupérés lors de l'isolation de ces derniers. Aussi, une délétion du FKBP12

ciblée et restreinte aux lymphocytes T multivirus-spécifiques évitera la délétion de cette protéine ubiquitaire dans d'autres populations, prévenant ainsi le risque de survenue de phénomènes physiopathologiques de l'homéostasie cellulaire calcique ou signalétique du TGF beta. Aussi, le choix de l'utilisation de l'IL-4 et IL-7 revient à leur rôle dans la promotion de l'expansion des lymphocytes T activés par des peptides viraux in-vitro. (172) Sur un plan technique, Le bénéfice de l'utilisation des G-Rex pour amoindrir l'apoptose est un argument solide pour son utilisation dans nos expériences. En effet, les G-Rex sont des plaques de culture spécifiques dont la membrane en silicone permet les échanges de gaz, prévenant l'hypoxie des cellules. La technologie G-Rex est utilisée dans les laboratoires de recherche mais également dans les centres de thérapie cellulaire pour la production de quantités importantes de lymphocytes T. (183) (126)

Afin d'objectiver la délétion du FKBP12 sur le plan protéique, nous avons procédé à un marquage intracellulaire du FKBP12 par des anticorps monoclonaux fluorescents et une analyse par cytométrie en flux pour quelques expériences. Cependant, le marquage semblait ne pas être concluant, car les populations positives et négatives n'étaient pas bien définies. Un retour au western-Blot comme méthode de détection du FKBP12 a donc été considéré pour les expériences qui ont suivi.

Comme pour les cultures de lymphocytes T FKBP12KO stimulées par CD3-CD28, nous remarquons une bonne croissance des cellules FKBP12 KO en présence du tacrolimus, mais aussi une absence de différence significative entre les cellules Cas9 et sgRNA-1 ou sgRNA-4 dans la croissance cellulaire. En effet, et comme expliqué précédemment, le tacrolimus agit sur le pouvoir prolifératif des lymphocytes T, mais seulement à court terme. (157) Sur le plan fonctionnel, nous objectivons une réactivité des lymphocytes T vis-à-vis de tous les peptides viraux utilisés dans l'expérience, et ce, en présence du tacrolimus, à travers une ELISpot IFN γ . Nous pouvons également observer une tendance attribuée aux cellules électroporées par les guides sgRNA-1 et sgRNA-4 par rapport aux contrôles pour un avantage de réactivité à tous les peptides viraux. Ceci nous a permis de valider la faisabilité d'une édition génique par CRISPR-CAS9 sur des lymphocytes T multivirus spécifiques. Cette approche n'avait été décrite que par l'équipe Basar *et al*, par leur génération de lymphocytes T multivirus spécifiques et résistants à l'action des glucocorticoïdes. (180)

Enfin, afin de confirmer la faisabilité de génération de lymphocytes CAR-T CD19 résistants à l'action du tacrolimus et multivirus spécifiques, notre dernière étape consistait à la transduction lentivirale du CD19 CAR dans des lymphocytes T nucléofectés par la Cas9 seule ou complexée aux guides sgRNA-1 et sgRNA-4 générés par des co-cultures. L'utilisation de cellules présentatrices d'antigène professionnelles (Cellules dendritiques), pulsées avec les différents peptides viraux ciblés permet de fournir un signal d'activation puissant aux lymphocytes T, notamment aux populations naïves. Cette activation intense améliore non seulement l'efficacité de la transduction des cellules, mais favorise également une prolifération efficace des lymphocytes T. (163) Une résistance de ces lymphocytes T aux médicaments dont la cible d'action est l'activation du LT tel que le tacrolimus, permet de ce fait la persistance et l'efficacité des lymphocytes T virus-spécifiques et CAR-T, ce qui justifie notre volonté de délétion du FKBP12 dans cette stratégie thérapeutique.

La combinaison des effets synergiques et complémentaires d'un TCR endogène activé et d'un CAR fonctionnel sur les mêmes cellules est un concept introduit par l'équipe de Cliona M. Rooney. Cette approche repose sur l'expression d'un CAR sur des lymphocytes T qui conservent leur TCR endogène. Ainsi, le CAR peut cibler spécifiquement un antigène spécifique de la cellule tumorale, tandis que le TCR endogène permet de reconnaître d'autres antigènes, notamment des antigènes viraux. Ce procédé a d'abord été prouvé comme étant efficace lors d'essais in vitro de stimulation de lymphocytes CAR-T dont le TCR natif reconnaissait des virus EBV. Ces lymphocytes EBV-spécifiques démontraient une survie prolongée comparativement aux lymphocytes T transduits avec le même CAR, mais activés par CD3-CD28. (184) Ceci a ouvert la voie à l'utilisation de ce concept dans des essais cliniques, notamment par l'utilisation de CAR-CD19-28 ζ sur des lymphocytes T multivirus spécifiques anti CMV, EBV et adénovirus. (185) Aussi, l'utilisation d'un CAR CD19 avec un module de co-stimulation 4-1BB a démontré une plus grande expression des marqueurs d'activation causant une apoptose des cellules, à l'inverse des CAR CD19 CD28 que nous avons choisis d'utiliser dans notre projet. (186)

L'utilisation de cette approche trouve également toute son utilité dans la prévention de GVHD. En effet, chez de patients non-HLA identiques n'ayant reçu aucune lympho-déplétion antérieure, aucune GVHD n'a été observée. Ceci a été expliqué par la réduction du répertoire du

TCR des lymphocytes CAR-T infusés, au contraire des lymphocytes polyclonaux CAR-T activés par CD3-CD28. (185) De plus, la principale limite de l'utilisation de lymphocytes T virus spécifiques résidait dans l'incompatibilité entre le donneur et receveur. L'utilisation de lymphocytes virus-spécifiques autologues était une alternative, mais le temps de génération, étant de 2 à 3 mois, représente une autre limite d'utilisation. Les lymphocytes T allogéniques "off the shelf" ont également été décrits comme une bonne alternative, mais l'action des immunosuppresseurs représentaient un enjeu pour leur persistance. (93) Dans notre approche, la combinaison du TCR spécifique aux virus et d'un CAR-T CD19 nous permettrait de générer les lymphocytes T autologues ou allogéniques, voire même HLA non compatibles, qui sont résistants au tacrolimus préventif d'une maladie du greffon contre l'hôte et du rejet de greffe.

Dans nos expériences, la transduction lentivirale a été effectuée au 2^e jour après activation des lymphocytes nucléofectés par les cellules dendritiques ayant été pulsés avec une librairie de peptides viraux de EBV, CMV, BK virus et adénovirus. Le choix de ces quatre virus revient à leur fréquence de survenue chez les patients immunodéprimés, mais également à la mortalité qui leur est liée. Les cellules ont ensuite été transduites le lendemain de la co-culture. Cette transduction précoce est justifiée par les travaux de l'équipe Sun *et al* qui démontrent l'utilité de transduire les lymphocytes T au deuxième jour de culture à produire des lymphocytes Tcm ayant une grande capacité de prolifération. (187) De plus, il a été démontré que l'ajout de IL-15 favorisait la génération et la maintenance de lymphocytes T CD8+ virus spécifiques, ce qui justifie son utilisation dans nos expériences. (188)

Ainsi, la faisabilité de notre approche est confirmée par la démonstration réussie de la délétion du FKBP12 confirmée par WesternBlot, de la bonne expression du NGFR dans les cellules transduites à J7 et J15 ainsi que la réactivité de ces lymphocytes T FKBP12KO aux virus BK virus, CMV, EBV et adénovirus à l'ELISpot. La différence de réactivité envers les différents virus entre les conditions soulève l'hypothèse de compétition entre les antigènes immunodominants, induisant une "dilution" des produits clonaux finaux. Cependant, ces résultats sont à confirmer par l'utilisation d'un nombre plus grand de donneurs pour des fins de généralisation de l'observation mais également d'une condition contrôle Cas9, afin d'objectiver la résistance de ces lymphocytes T au tacrolimus.

Malgré la démonstration de la faisabilité du concept, plusieurs pistes sont à poursuivre :

A- La recherche des effets hors-cibles :

En effet, certains résultats tels que la baisse de la croissance pour le sgRNA-4 peuvent être expliqués par cet effet. De nombreuses méthodes ont été décrites pour la détection affinée de ces effets. D'abord, les méthodes "biaisés", se basant sur l'utilisation de la bio-informatique afin de prédire in-silico des séquences pouvant être à l'origine d'un effet hors cible, puis leur identification par méthode T7E1 ou Surveyor. Le manque de spécificité de ces techniques, mais également de fiabilité par le biais qu'elles présentent ont poussé les chercheurs à utiliser d'autres méthodes : le Circle-Seq, le Guide Seq, le discover-seq et le BLISS. Les 4 méthodes se basent sur la détection des coupures doubles brins ou DSB à travers tout le génome, sans être dirigés, avec une amplification sélective suivie d'un séquençage. Le circle-Seq est un outil de haute définition pour le criblage (Screening) de multiples guides, mais son aspect in vitro et l'utilisation d'ADN génomique extrait sans enzymes de répartition peuvent constituer une limite importante à cette technique. Le Guide Seq est décrit comme le moyen le plus fiable de détection des off-target par son avantage de détection de coupures doubles brins dans des cellules vivantes, dont l'architecture de la chromatine est préservée. Le Guide-Seq est réalisé en deux étapes : En premier, l'incorporation d'oligodésoxynucléotides doubles brins (dsODN) aux sites de coupures produits par le système CRISPR-Cas9 suivie d'une amplification des sites d'intégration et leur séquençage pour une détection spécifique des off-targets. Le Discover Seq et le BLISS peuvent également être utilisés, mais ont également plusieurs limitations : Le Discover Seq donnerait des faux positifs, et l'utilisation de cellules fixées pour le BLISS limite la possibilité de détection des DSB se produisant en dehors du moment de la fixation.(189)

B- Exploration de l'activation et de l'épuisement du lymphocyte T :

La deuxième piste est d'ordre biochimique et signalétique, dans le but de confirmer un possible lien entre le KO du FKBP12 et une suractivation de lymphocyte T. Ainsi, une mesure de l'IL-2, du calcium intracellulaire, de l'activité phosphatase de la calcineurine, la mesure de la translocation du facteur nucléaire NFAT ainsi que l'expression du CD25 peuvent apporter des

réponses sur l'état d'activation du lymphocytes T. La signalisation répétitive à travers un TCR natif et/ou un CAR serait à l'origine d'un épuisement chronique des lymphocytes T, d'une activation de la caspase induisant ainsi une apoptose. Ainsi, d'un point de vue technique, des tests d'apoptose ainsi qu'un marquage par des marqueurs d'épuisements tels que le TIM3, PD1 sont une piste à suivre pour les prochaines expériences relatives au projet. Également, d'un point de vue thérapeutique, l'utilisation d'un inhibiteur des kinases Src tel que le dasatinib a prouvé son efficacité dans la réduction transitoire de la signalisation accrue du lymphocyte T. (190) Dans ce même contexte, l'exploration de la signalisation en aval du récepteur du TGF bêta pourrait également contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire.

C- Optimisation de la fonction anti-tumorale:

D'un point de vue fonctionnel, l'activité anti-tumorale du CAR CD19 transduit (dont l'expression a été évaluée par l'expression du tNGFR dans nos expériences) et de sa fonction cytotoxique devra être évalué en utilisant des lignées cellulaires NALM6 positives au CD19. Cette étape pourrait faire conduire le projet vers un modèle animal permettant de valider l'efficacité anti-tumorale de ces lymphocytes T in vivo, et ce, par l'injection de tumeurs NALM6 par voie intraveineuse dans des souris NSG (NOD SCID GAMMA de souche NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) en suivant le protocole ayant déjà été utilisé par le passé dans notre laboratoire (191), puis l'infusion de nos lymphocytes T "triple fonction" édités et enfin l'évaluation de la réduction tumorale et de la survie des souris.

D- Utilisation d'autres méthodes d'édition génique :

Notre approche utilise deux moyens pour la livraison des gènes : La combinaison de nucléases pour la délétion du gène FKBP12 et de la transduction lentivirale pour l'expression du CAR-CD19. Ceci peut être à l'origine de dommages à l'ADN importants pouvant mettre en jeu l'application de notre stratégie en clinique. De plus, l'édition génique par méthode CRISPR-Cas9 peut représenter un enjeu important à cause des nombreux effets hors-cibles qui peuvent en

résulter. L'utilisation d'une autre méthode telle que le shRNA ou les petits ARN à épingle à cheveux (short Hairpin RNA) pour le knock down du gène FKBP12 peut être une alternative. Cette technique permet la répression des ARNm cibles par la coupure de ces dernières. L'apport du shRNA par l'utilisation de vecteurs viraux tels que les lentivirus nous permettraient d'utiliser une seule approche pour la délivrance simultanée du transgène du CAR CD19 et du shRNA pour le knock down du FKBP12. L'inconvénient de cette perspective réside dans son efficacité limitée du fait que le shRNA ne puisse pas apporter de modifications sur le plan génique à la différence du CRISPR-Cas9 qui permet de cibler des sites spécifiques du génome. L'utilisation de cette approche permettrait, certes, l'obtention d'un produit plus sécuritaire mais son efficacité serait potentiellement moindre.

Par ailleurs, les technologies ZFN et TALENs peuvent également être envisagés pour la délétion du gène FKBP12 puisqu'ils permettent de cibler l'ADN de façon plus spécifique. Cependant, leur faible efficacité et leur coût élevé ainsi que la complexité de production des endonucléases utilisées représentent un enjeu à leur utilisation. (192)

D'un autre côté, les insertions aléatoires des vecteurs viraux peuvent représenter un autre enjeu. Ainsi, l'utilisation du CRISPR-Cas9 pour une insertion ciblée d'un knock out du gène FKBP12 et un Knock in pour l'expression d'un CAR-CD19 représente une autre alternative. Cette approche a déjà été décrite par l'équipe Kath *et al* en 2022 par une co-électroporation de gènes codant pour un CAR-T CD19 sur des lymphocytes T délétées de leur chaîne TRAC dans des lymphocytes T humains par système CRISPR-Cas9. (193) L'utilisation de cette approche pour un knock-out du FKBP12 et, simultanément, une insertion du gène codant pour le CAR CD19 permettrait de limiter le risque d'insertion aléatoire, tout en améliorant l'efficacité du knock-out et knock-in.

E- Application de l'approche sur des lymphocytes CAR-T CD19 multivirus spécifiques et multi-résistants aux drogues :

La génération de LTs virus spécifiques et résistants à l'action des glucocorticoïdes ayant déjà été décrite par Basar *et al* et Kaeuferle *et al*. (179, 180) , un ajout d'une composante CAR-T

CD19 et FKBP12 KO permettrait d'obtenir un produit optimal dans un cadre de transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Une multi-résistance aux drogues immunosuppressives tacrolimus et glucocorticoïdes, combinée à une réactivité aux multiples virus émergents et réactivés chez ces patients et une activité anti-tumorale pourrait améliorer la prise en charge et le pronostic des patients. Aussi, afin de limiter les potentiels effets secondaires liés à cette approche tel que le syndrome de relargage cytokinique, des stratégies déjà décrites peuvent être mises en place pour une utilisation plus sécuritaire de ces cellules, par exemple l'utilisation d'une caspase 9 inductible (Safety switch) ou d'un récepteur tronqué du facteur de croissance épidermique. (133, 134)

Chapitre 9 : CONCLUSION

Ce projet représente une nouvelle stratégie d'immunothérapie adoptive chez les patients recevant une immunosuppression à base de tacrolimus pour la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte ou du rejet de greffe suite à la transplantation de moelle osseuse. Les résultats obtenus ont permis de prouver la faisabilité d'un KO du FKBP12 dans des lymphocytes T spécifiques aux virus CMV, EBV, BK virus et adénovirus et exprimant un CAR-T CD19, conférant ainsi aux lymphocytes T une résistance à l'action du tacrolimus. Cette approche triple-fonction des lymphocytes T n'avait jamais été rapportée dans la littérature auparavant.

Dans ce projet, nous avons généré des lymphocytes T polyclonaux résistants à l'action du tacrolimus et transduits par le CAR CD19 par invalidation du FKBP12 et transduction lentivirale respectivement. Notre première cible d'optimisation impliquait l'utilisation du guide 4 choisi au niveau du laboratoire. Le guide 1, ayant déjà été rapporté dans la littérature, a également été utilisé dans toutes nos expériences. L'efficacité du knock-out a été déterminée par western-blot. Ce knock-out a conféré un rétablissement partiel de la fonction effectrice telle que la synthèse de cytokines IL-2, TNF α et IFN γ en présence de tacrolimus des cellules électroporées par sgRNA1 ou sgRNA-4 comparativement aux cellules contrôles. En parallèle, l'expression du CAR CD19 démontre l'efficacité de transduction lentivirale.

Par la même méthode, nous avons également pu invalider le gène du FKBP12 sur des lymphocytes T multivirus-spécifiques. Les cellules étaient fonctionnelles et réactives envers les multiples virus ciblés en présence de tacrolimus. Enfin, des lignées de lymphocytes T multivirus spécifiques dont le gène du FKBP12 a été invalidé ont été transduites avec un vecteur lentiviral dans le but d'exprimer un CAR CD19 dont l'expression a été validée par cytométrie en flux. La diminution du FKBP12 au western blot démontre l'efficacité de KO sur des lymphocytes T triple-fonction. La réactivité de ces lymphocytes était maintenue en présence de tacrolimus et démontrée par ELISpot en présence des peptides viraux. En conclusion, ces résultats nous ont permis de démontrer la faisabilité de génération de lymphocytes T « triple fonction » anti-tumorales, anti-virales et résistantes au tacrolimus. L'application de cette approche semble

prometteuse dans un contexte d'une immunothérapie adoptive anti-virale et anti-tumorale post-transplantation de moelle osseuse.

Références bibliographiques

1. Southam CM, Brunschwig A, Levin AG, Dizon QS. Effect of leukocytes on transplantability of human cancer. *Cancer*. 1966;19(11):1743-53.
2. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med*. 1979;300(19):1068-73.
3. Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, et al. Donor Leukocyte Transfusions for Treatment of Recurrent Chronic Myelogenous Leukemia in Marrow Transplant Patients. *Blood*. 1990;76(12):2462-5.
4. Rooney CM, Ng CYC, Loftin S, Smith CA, Li C, Krance RA, et al. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *The Lancet*. 1995;345(8941):9-13.
5. Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of Viral Immunity in Immunodeficient Humans by the Adoptive Transfer of T Cell Clones. *Science*. 1992;257(5067):238-41.
6. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957;257(11):491-6.
7. Mathe G, Jammet H, Pendic B, Schwarzenberg L, Duplan JF, Maupin B, et al. [Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation]. *Rev Fr Etud Clin Biol*. 1959;4(3):226-38.
8. Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med*. 2007;357(15):1472-5.
9. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006;354(17):1813-26.
10. Gratwohl A, Baldomero H, Horisberger B, Schmid C, Passweg J, Urbano-Ispizua A, et al. Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood*. 2002;100(7):2374-86.
11. Galaine J, Godet Y, Adotevi O. [Not Available]. *Bull Cancer*. 2016;103 Suppl 1:S127-S31.
12. Wucherpfennig KW, Gagnon E, Call MJ, Huseby ES, Call ME. Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(4):a005140.
13. Mariuzza RA, Agnihotri P, Orban J. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;295(4):914-25.
14. Morch AM, Balint S, Santos AM, Davis SJ, Dustin ML. Coreceptors and TCR Signaling - the Strong and the Weak of It. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:597627.
15. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591-619.
16. Judy A. Owen JP, Sharon A. Stranford. *Immunologie : Le cours de Janis Kuby*. DUNOD, editor2014.

17. Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, et al. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature*. 1993;365(6444):352-5.
18. Cantrell D. Signaling in lymphocyte activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(6).
19. Herrero-Sanchez MC, Rodriguez-Serrano C, Almeida J, San Segundo L, Inoges S, Santos-Briz A, et al. Targeting of PI3K/AKT/mTOR pathway to inhibit T cell activation and prevent graft-versus-host disease development. *J Hematol Oncol*. 2016;9(1):113.
20. Fung MM, Rohwer F, McGuire KL. IL-2 activation of a PI3K-dependent STAT3 serine phosphorylation pathway in primary human T cells. *Cell Signal*. 2003;15(6):625-36.
21. Tong M, Jiang Y. FK506-Binding Proteins and Their Diverse Functions. *Curr Mol Pharmacol*. 2015;9(1):48-65.
22. Chan JD, Lai J, Slaney CY, Kallies A, Beavis PA, Darcy PK. Cellular networks controlling T cell persistence in adoptive cell therapy. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(12):769-84.
23. Arrabi L, Jan A, Hosing C, Milton DR, Yeh J. Transitioning tacrolimus to sirolimus in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Eur J Haematol*. 2021;107(6):634-41.
24. Sung AD, Chao NJ. Concise review: acute graft-versus-host disease: immunobiology, prevention, and treatment. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(1):25-32.
25. Hutt D. Engraftment, Graft Failure, and Rejection. In: Kenyon M, Babic A, editors. *The European Blood and Marrow Transplantation Textbook for Nurses: Under the Auspices of EBMT*. Cham (CH)2018. p. 259-70.
26. Fleischhauer K, Locatelli F, Zecca M, Orofino MG, Giardini C, De Stefano P, et al. Graft rejection after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia is associated with nonpermissive HLA-DPB1 disparity in host-versus-graft direction. *Blood*. 2006;107(7):2984-92.
27. Ciurea SO, Champlin RE. Donor selection in T cell-replete haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: knowns, unknowns, and controversies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(2):180-4.
28. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:139-70.
29. Marks R, Finke J. Biologics in the prevention and treatment of graft rejection. *Springer Semin Immunopathol*. 2006;27(4):457-76.
30. Chen X, Sun H, Cassady K, Yang S, Chen T, Wang L, et al. The Addition of Sirolimus to GVHD Prophylaxis After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Meta-Analysis of Efficacy and Safety. *Front Oncol*. 2021;11:683263.
31. Gao Y, Ma J. Tacrolimus in adult hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019;15(10):803-11.
32. Gao L, Liu J, Zhang Y, Chen X, Gao L, Zhang C, et al. Low incidence of acute graft-versus-host disease with short-term tacrolimus in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia Research*. 2017;57:27-36.
33. Yoshikawa N, Urata S, Yasuda K, Sekiya H, Hirabara Y, Okumura M, et al. Retrospective analysis of the correlation between tacrolimus concentrations measured in whole blood and variations of blood cell counts in patients undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *European Journal of Hospital Pharmacy*. 2020;27(e1):e7.

34. Fortune K, Couriel D. Tacrolimus in hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009;5(7):835-41.
35. Huang B, Lin X, Zhang Z, Zhang Y, Zheng Z, Zhong C, et al. Comparison of Tacrolimus and Cyclosporine Combined With Methotrexate for Graft Versus Host Disease Prophylaxis After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Transplantation.* 2020;104(2):428-36.
36. Arai S, Vogelsang GB. Management of graft-versus-host disease. *Blood Rev.* 2000;14(4):190-204.
37. Xu X, Su B, Barndt RJ, Chen H, Xin H, Yan G, et al. FKBP12 is the only FK506 binding protein mediating T-cell inhibition by the immunosuppressant FK506. *Transplantation.* 2002;73(11).
38. Elens L, Bouamar R, Hesselink DA, Haufroid V, van der Heiden IP, van Gelder T, et al. A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clin Chem.* 2011;57(11):1574-83.
39. Thervet E, Anglicheau D, Legendre C, Beaune P. Role of Pharmacogenetics of Immunosuppressive Drugs in Organ Transplantation. *Therapeutic Drug Monitoring.* 2008;30(2).
40. Hagen PA, Adams W, Smith S, Tsai S, Stiff P. Low mean post-transplantation tacrolimus levels in weeks 2-3 correlate with acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from related and unrelated donors. *Bone Marrow Transplant.* 2019;54(1):155-8.
41. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(2):481-508.
42. Maffini E, Festuccia M, Brunello L, Boccadoro M, Giaccone L, Bruno B. Neurologic Complications after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017;23(3):388-97.
43. Abouelnasr A, Roy J, Cohen S, Kiss T, Lachance S. Defining the role of sirolimus in the management of graft-versus-host disease: from prophylaxis to treatment. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(1):12-21.
44. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem.* 1998;31(5):335-40.
45. Abraham RT, Wiederrecht GJ. IMMUNOPHARMACOLOGY OF RAPAMYCIN. *Annual Review of Immunology.* 1996;14(1):483-510.
46. Slavik JM, Lim DG, Burakoff SJ, Hafler DA. Uncoupling p70(s6) kinase activation and proliferation: rapamycin-resistant proliferation of human CD8(+) T lymphocytes. *J Immunol.* 2001;166(5):3201-9.
47. Rangan GK. Sirolimus-associated proteinuria and renal dysfunction. *Drug Saf.* 2006;29(12):1153-61.
48. Siekierka JJ, Hung SH, Poe M, Lin CS, Sigal NH. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature.* 1989;341(6244):755-7.
49. Shou W, Aghdasi B, Armstrong DL, Guo Q, Bao S, Charng MJ, et al. Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature.* 1998;391(6666):489-92.
50. Friedman J, Weissman I. Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA. *Cell.* 1991;66(4):799-806.

51. Aghdasi B, Ye K, Resnick A, Huang A, Ha HC, Guo X, et al. FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(5):2425-30.
52. Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature.* 1989;341(6244):758-60.
53. Bierer BE, Mattila PS, Standaert RF, Herzenberg LA, Burakoff SJ, Crabtree G, et al. Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(23):9231-5.
54. Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, Gerull S, Buser A, Bucher C, et al. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(9):1309-14.
55. Wang T, Donahoe PK, Zervos AS. Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12. *Science.* 1994;265(5172):674-6.
56. Chen YG, Liu F, Massague J. Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J.* 1997;16(13):3866-76.
57. Yao D, Doré JJE, Leof EB. FKBP12 Is a Negative Regulator of Transforming Growth Factor- β Receptor Internalization*. *Journal of Biological Chemistry.* 2000;275(17):13149-54.
58. Samsó M, Shen X, Allen PD. Structural characterization of the RyR1-FKBP12 interaction. *J Mol Biol.* 2006;356(4):917-27.
59. Brillantes AB, Ondrias K, Scott A, Kobrinisky E, Ondriasova E, Moschella MC, et al. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell.* 1994;77(4):513-23.
60. Carmody M, Mackrill JJ, Sorrentino V, O'Neill C. FKBP12 associates tightly with the skeletal muscle type 1 ryanodine receptor, but not with other intracellular calcium release channels. *FEBS Lett.* 2001;505(1):97-102.
61. Cameron AM, Steiner JP, Roskams AJ, Ali SM, Ronnett GV, Snyder SH. Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca²⁺ flux. *Cell.* 1995;83(3):463-72.
62. MacMillan D. FK506 binding proteins: cellular regulators of intracellular Ca²⁺ signalling. *Eur J Pharmacol.* 2013;700(1-3):181-93.
63. Wang Z, Feng J, Yu J, Chen G. FKBP12 mediates necroptosis by initiating RIPK1-RIPK3-MLKL signal transduction in response to TNF receptor 1 ligation. *J Cell Sci.* 2019;132(10).
64. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1953;84(3):570-3.
65. Gallardo J, Perez-Illana M, Martin-Gonzalez N, San Martin C. Adenovirus Structure: What Is New? *Int J Mol Sci.* 2021;22(10).
66. Suparno C, Milligan DW, Moss PA, Mautner V. Adenovirus infections in stem cell transplant recipients: recent developments in understanding of pathogenesis, diagnosis and management. *Leuk Lymphoma.* 2004;45(5):873-85.
67. McConnell MJ, Imperiale MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2004;15(11):1022-33.

68. Cesaro S, Berger M, Tridello G, Mikulska M, Ward KN, Ljungman P, et al. A survey on incidence and management of adenovirus infection after allogeneic HSCT. *Bone Marrow Transplantation*. 2019;54(8):1275-80.
69. Ison MG. Adenovirus Infections in Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;43(3):331-9.
70. Feuchtinger T, Lang P, Handgretinger R. Adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(2):244-55.
71. Chakrabarti S, Mautner V, Osman H, Collingham KE, Fegan CD, Klapper PE, et al. Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood*. 2002;100(5):1619-27.
72. Smith CA, Woodruff LS, Kitchingman GR, Rooney CM. Adenovirus-pulsed dendritic cells stimulate human virus-specific T-cell responses in vitro. *J Virol*. 1996;70(10):6733-40.
73. Di Nardo M, Li Pira G, Amodeo A, Cecchetti C, Giorda E, Ceccarelli S, et al. Adoptive immunotherapy with antigen-specific T cells during extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) for adenovirus-related respiratory failure in a child given haploidentical stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(2):376-9.
74. Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C, Lion T, Fuhrer M, Hamprecht K, et al. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2006;134(1):64-76.
75. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):76-98, Table of Contents.
76. Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Pasa-Tolic L, et al. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol*. 2004;78(20):10960-6.
77. Wang YQ, Zhao XY. Human Cytomegalovirus Primary Infection and Reactivation: Insights From Virion-Carried Molecules. *Front Microbiol*. 2020;11:1511.
78. Jakharia N, Howard D, Riedel DJ. CMV Infection in Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Prevention and Treatment Strategies. *Curr Treat Options Infect Dis*. 2021;13(3):123-40.
79. Schmidt-Hieber M, Tridello G, Ljungman P, Mikulska M, Knelange N, Blaise D, et al. The prognostic impact of the cytomegalovirus serostatus in patients with chronic hematological malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a report from the Infectious Diseases Working Party of EBMT. *Ann Hematol*. 2019;98(7):1755-63.
80. Hill GR, Tey SK, Beagley L, Crough T, Morton JA, Clouston AD, et al. Successful immunotherapy of HCMV disease using virus-specific T cells expanded from an allogeneic stem cell transplant recipient. *Am J Transplant*. 2010;10(1):173-9.
81. Peggs KS, Verfuether S, Pizzey A, Khan N, Guiver M, Moss PA, et al. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet*. 2003;362(9393):1375-7.
82. Schmitt A, Tonn T, Busch DH, Grigoleit GU, Einsele H, Odendahl M, et al. Adoptive transfer and selective reconstitution of streptamer-selected cytomegalovirus-specific CD8+ T cells leads to virus clearance in patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transfusion*. 2011;51(3):591-9.

83. Peggs KS, Thomson K, Samuel E, Dyer G, Armoogum J, Chakraverty R, et al. Directly selected cytomegalovirus-reactive donor T cells confer rapid and safe systemic reconstitution of virus-specific immunity following stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2011;52(1):49-57.
84. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Loffler J, et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood*. 2002;99(11):3916-22.
85. Feuchtinger T, Opherk K, Bethge WA, Topp MS, Schuster FR, Weissinger EM, et al. Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*. 2010;116(20):4360-7.
86. Bao L, Cowan MJ, Dunham K, Horn B, McGuirk J, Gilman A, et al. Adoptive immunotherapy with CMV-specific cytotoxic T lymphocytes for stem cell transplant patients with refractory CMV infections. *J Immunother*. 2012;35(3):293-8.
87. Micklethwaite K, Hansen A, Foster A, Snape E, Antonenas V, Sartor M, et al. Ex vivo expansion and prophylactic infusion of CMV-pp65 peptide-specific cytotoxic T-lymphocytes following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(6):707-14.
88. Koehne G, Hasan A, Doubrovina E, Prockop S, Tyler E, Wasilewski G, et al. Immunotherapy with Donor T Cells Sensitized with Overlapping Pentadecapeptides for Treatment of Persistent Cytomegalovirus Infection or Viremia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(9):1663-78.
89. Shafat MS, Mehra V, Peggs KS, Roddie C. Cellular Therapeutic Approaches to Cytomegalovirus Infection Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2020;11:1694.
90. Houghtelin A, Bollard CM. Virus-Specific T Cells for the Immunocompromised Patient. *Front Immunol*. 2017;8:1272.
91. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000;343(7):481-92.
92. Al Hamed R, Bazarbachi AH, Mohty M. Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease (EBV-PTLD) in the setting of allogeneic stem cell transplantation: a comprehensive review from pathogenesis to forthcoming treatment modalities. *Bone Marrow Transplant*. 2020;55(1):25-39.
93. Gottschalk S, Heslop HE, Rooney CM. Adoptive immunotherapy for EBV-associated malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2005;46(1):1-10.
94. Sun Q, Burton R, Reddy V, Lucas KG. Safety of allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for patients with refractory EBV-related lymphoma. *Br J Haematol*. 2002;118(3):799-808.
95. Haque T, Wilkie GM, Taylor C, Amlot PL, Murad P, Iley A, et al. Treatment of Epstein-Barr-virus-positive post-transplantation lymphoproliferative disease with partly HLA-matched allogeneic cytotoxic T cells. *Lancet*. 2002;360(9331):436-42.
96. Heslop HE, Ng CY, Li C, Smith CA, Loftin SK, Krance RA, et al. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med*. 1996;2(5):551-5.
97. Ghinai R, Sutak J, Saleem M, Moppett J. BK virus nephropathy without haemorrhagic cystitis following bone marrow transplantation. *Br J Haematol*. 2020;188(2):200.

98. Jandial A, Mishra K, Sandal R, Kant Sahu K. Management of BK virus-associated haemorrhagic cystitis in allogeneic stem cell transplant recipients. *Ther Adv Infect Dis.* 2021;8:2049936121991377.
99. Li TC, Takeda N, Kato K, Nilsson J, Xing L, Haag L, et al. Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *Virology.* 2003;311(1):115-24.
100. Hirsch HH. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis.* 2005;41(3):354-60.
101. Leung AY, Yuen KY, Kwong YL. Polyoma BK virus and haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation: a changing paradigm. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36(11):929-37.
102. Tzannou I, Papadopoulou A, Naik S, Leung K, Martinez CA, Ramos CA, et al. Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol.* 2017;35(31):3547-57.
103. Nelson AS, Heyenbruch D, Rubinstein JD, Sabulski A, Jodele S, Thomas S, et al. Virus-specific T-cell therapy to treat BK polyomavirus infection in bone marrow and solid organ transplant recipients. *Blood Adv.* 2020;4(22):5745-54.
104. Ahmad U, Khan Z, Ualiyeva D, Amisshah OB, Noor Z, Khan A, et al. Chimeric antigen receptor T cell structure, its manufacturing, and related toxicities; A comprehensive review. *Advances in Cancer Biology - Metastasis.* 2022;4:100035.
105. Sullivan KM, Storb R, Buckner CD, Fefer A, Fisher L, Weiden PL, et al. Graft-versus-host disease as adoptive immunotherapy in patients with advanced hematologic neoplasms. *N Engl J Med.* 1989;320(13):828-34.
106. Barrett DM, Grupp SA, June CH. Chimeric Antigen Receptor– and TCR-Modified T Cells Enter Main Street and Wall Street. *The Journal of Immunology.* 2015;195(3):755-61.
107. Zhao Z, Chen Y, Francisco NM, Zhang Y, Wu M. The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2018;8(4):539-51.
108. June CH, Sadelain M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med.* 2018;379(1):64-73.
109. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJ, Hamieh M, Cunanan KM, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature.* 2017;543(7643):113-7.
110. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(24):10024-8.
111. Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomark Res.* 2017;5:22.
112. Chandran SS, Klebanoff CA. T cell receptor-based cancer immunotherapy: Emerging efficacy and pathways of resistance. *Immunological Reviews.* 2019;290(1):127-47.
113. Jayaraman J, Mellody MP, Hou AJ, Desai RP, Fung AW, Pham AHT, et al. CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine.* 2020;58:102931.
114. Teppert K, Wang X, Anders K, Evaristo C, Lock D, Künkele A. Joining Forces for Cancer Treatment: From “TCR versus CAR” to “TCR and CAR”. *International Journal of Molecular Sciences [Internet].* 2022; 23(23).

115. Mazinani M, Rahbarizadeh F. CAR-T cell potency: from structural elements to vector backbone components. *Biomark Res.* 2022;10(1):70.
116. Alabanza L, Pegues M, Geldres C, Shi V, Wiltzius JJW, Sievers SA, et al. Function of Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Human Variable Regions Is Affected by Hinge and Transmembrane Domains. *Molecular Therapy.* 2017;25(11):2452-65.
117. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design. *Cancer Discovery.* 2013;3(4):388-98.
118. Zhao Z, Chen Y, Francisco NM, Zhang Y, Wu M. The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges. *Acta Pharm Sin B.* 2018;8(4):539-51.
119. Sadelain M. CAR therapy: the CD19 paradigm. *J Clin Invest.* 2015;125(9):3392-400.
120. Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, Ingaramo M, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med.* 2015;21(6):581-90.
121. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(8):1145-54.
122. Helsen CW, Hammill JA, Lau VWC, Mwawasi KA, Afsahi A, Bezverbnaya K, et al. The chimeric TAC receptor co-opts the T cell receptor yielding robust anti-tumor activity without toxicity. *Nat Commun.* 2018;9(1):3049.
123. Irving M, Lanitis E, Migliorini D, Ivics Z, Guedan S. Choosing the Right Tool for Genetic Engineering: Clinical Lessons from Chimeric Antigen Receptor-T Cells. *Hum Gene Ther.* 2021;32(19-20):1044-58.
124. Micklethwaite KP, Gowrishankar K, Gloss BS, Li Z, Street JA, Moezzi L, et al. Investigation of product-derived lymphoma following infusion of piggyBac-modified CD19 chimeric antigen receptor T cells. *Blood.* 2021;138(16):1391-405.
125. Zhang X, Cheng C, Sun W, Wang H. Engineering T Cells Using CRISPR/Cas9 for Cancer Therapy. *Methods Mol Biol.* 2020;2115:419-33.
126. Wang X, Riviere I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther Oncolytics.* 2016;3:16015.
127. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(16):1509-18.
128. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008;112(5):1570-80.
129. Greenbaum U, Mahadeo KM, Kebriaei P, Shpall EJ, Saini NY. Chimeric Antigen Receptor T-Cells in B-Acute Lymphoblastic Leukemia: State of the Art and Future Directions. *Front Oncol.* 2020;10:1594.
130. Guercio M, Manni S, Boffa I, Caruso S, Di Cecca S, Sinibaldi M, et al. Inclusion of the Inducible Caspase 9 Suicide Gene in CAR Construct Increases Safety of CAR.CD19 T Cell Therapy in B-Cell Malignancies. *Front Immunol.* 2021;12:755639.
131. Melenhorst JJ, Chen GM, Wang M, Porter DL, Chen C, Collins MA, et al. Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4(+) CAR T cells. *Nature.* 2022;602(7897):503-9.
132. Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2013;121(7):1165-74.

133. Zhou X, Dotti G, Krance RA, Martinez CA, Naik S, Kamble RT, et al. Inducible caspase-9 suicide gene controls adverse effects from alloplete T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Blood*. 2015;125(26):4103-13.
134. Paszkiewicz PJ, Frassle SP, Srivastava S, Sommermeyer D, Hudecek M, Drexler I, et al. Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia. *J Clin Invest*. 2016;126(11):4262-72.
135. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*. 2005;435(7042):646-51.
136. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 2010;186(2):757-61.
137. Mir A, Edraki A, Lee J, Sontheimer EJ. Type II-C CRISPR-Cas9 Biology, Mechanism, and Application. *ACS Chem Biol*. 2018;13(2):357-65.
138. Ellis GI, Sheppard NC, Riley JL. Genetic engineering of T cells for immunotherapy. *Nat Rev Genet*. 2021;22(7):427-47.
139. Wang W, Ye C, Liu J, Zhang D, Kimata JT, Zhou P. CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection. *PLoS One*. 2014;9(12):e115987.
140. Li C, Guan X, Du T, Jin W, Wu B, Liu Y, et al. Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4+ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. *J Gen Virol*. 2015;96(8):2381-93.
141. Su S, Hu B, Shao J, Shen B, Du J, Du Y, et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. *Sci Rep*. 2016;6:20070.
142. Mandal PK, Ferreira LM, Collins R, Meissner TB, Boutwell CL, Friesen M, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*. 2014;15(5):643-52.
143. Hendel A, Bak RO, Clark JT, Kennedy AB, Ryan DE, Roy S, et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat Biotechnol*. 2015;33(9):985-9.
144. Schumann K, Lin S, Boyer E, Simeonov DR, Subramaniam M, Gate RE, et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(33):10437-42.
145. Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*. 2008;26(7):808-16.
146. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clin Cancer Res*. 2017;23(9):2255-66.
147. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*. 2020;367(6481).
148. Boudreau G, Carli C, Lamarche C, Rulleau C, Bonnaure G, Neron S, et al. Leukoreduction system chambers are a reliable cellular source for the manufacturing of T-cell therapeutics. *Transfusion*. 2019;59(4):1300-11.

149. Amini L, Wagner DL, Rossler U, Zarrinrad G, Wagner LF, Vollmer T, et al. CRISPR-Cas9-Edited Tacrolimus-Resistant Antiviral T Cells for Advanced Adoptive Immunotherapy in Transplant Recipients. *Mol Ther*. 2021;29(1):32-46.
150. Sentmanat MF, Peters ST, Florian CP, Connelly JP, Pruett-Miller SM. A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing. *Sci Rep*. 2018;8(1):888.
151. Brinkman EK, Chen T, Amendola M, van Steensel B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(22):e168.
152. Canver MC, Joung JK, Pinello L. Impact of Genetic Variation on CRISPR-Cas Targeting. *CRISPR J*. 2018;1(2):159-70.
153. Lessard S, Francioli L, Alfoldi J, Tardif JC, Ellinor PT, MacArthur DG, et al. Human genetic variation alters CRISPR-Cas9 on- and off-targeting specificity at therapeutically implicated loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(52):E11257-E66.
154. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv*. 2018;25(1):1234-57.
155. Friskes A, Koob L, Krenning L, Severson TM, Koeleman ES, Vergara X, et al. Double-strand break toxicity is chromatin context independent. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(17):9930-47.
156. Reading JL, Galvez-Cancino F, Swanton C, Lladser A, Peggs KS, Quezada SA. The function and dysfunction of memory CD8(+) T cells in tumor immunity. *Immunol Rev*. 2018;283(1):194-212.
157. Laskin BL, Jiao J, Baluarte HJ, Amaral S, Furth SL, Akimova T, et al. The Effects of Tacrolimus on T-Cell Proliferation Are Short-Lived: A Pilot Analysis of Immune Function Testing. *Transplant Direct*. 2017;3(8):e199.
158. Tomasik J, Jasinski M, Basak GW. Next generations of CAR-T cells - new therapeutic opportunities in hematology? *Front Immunol*. 2022;13:1034707.
159. Yang S, Dudley ME, Rosenberg SA, Morgan RA. A simplified method for the clinical-scale generation of central memory-like CD8+ T cells after transduction with lentiviral vectors encoding antitumor antigen T-cell receptors. *J Immunother*. 2010;33(6):648-58.
160. Matrai J, Chuah MK, VandenDriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol Ther*. 2010;18(3):477-90.
161. Delville M, Soheili T, Bellier F, Durand A, Denis A, Lagresle-Peyrou C, et al. A Nontoxic Transduction Enhancer Enables Highly Efficient Lentiviral Transduction of Primary Murine T Cells and Hematopoietic Stem Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;10:341-7.
162. Sena-Esteves M, Gao G. Titration of Lentivirus Vectors. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(4).
163. Lo Presti V, Cornel AM, Plantinga M, Dunnebach E, Kuball J, Boelens JJ, et al. Efficient lentiviral transduction method to gene modify cord blood CD8(+) T cells for cancer therapy applications. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2021;21:357-68.
164. Agarwal S, Wellhausen N, Levine BL, June CH. Production of Human CRISPR-Engineered CAR-T Cells. *J Vis Exp*. 2021(169).
165. Aleksandrova K, Leise J, Priesner C, Melk A, Kubaink F, Abken H, et al. Functionality and Cell Senescence of CD4/ CD8-Selected CD20 CAR T Cells Manufactured Using the Automated CliniMACS Prodigy(R) Platform. *Transfus Med Hemother*. 2019;46(1):47-54.

166. Zhang H, Snyder KM, Suhoski MM, Maus MV, Kapoor V, June CH, et al. 4-1BB is superior to CD28 costimulation for generating CD8⁺ cytotoxic lymphocytes for adoptive immunotherapy. *J Immunol*. 2007;179(7):4910-8.
167. Zhang Y, Zhang X, Cheng C, Mu W, Liu X, Li N, et al. CRISPR-Cas9 mediated LAG-3 disruption in CAR-T cells. *Front Med*. 2017;11(4):554-62.
168. Albanese M, Ruhle A, Mittermaier J, Mejias-Perez E, Gapp M, Linder A, et al. Rapid, efficient and activation-neutral gene editing of polyclonal primary human resting CD4(+) T cells allows complex functional analyses. *Nat Methods*. 2022;19(1):81-9.
169. Dimitri A, Herbst F, Fraietta JA. Engineering the next-generation of CAR T-cells with CRISPR-Cas9 gene editing. *Mol Cancer*. 2022;21(1):78.
170. Gerdemann U, Vera JF, Rooney CM, Leen AM. Generation of multivirus-specific T cells to prevent/treat viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *J Vis Exp*. 2011(51).
171. Hanley PJ, Shaffer DR, Cruz CR, Ku S, Tzou B, Liu H, et al. Expansion of T cells targeting multiple antigens of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and adenovirus to provide broad antiviral specificity after stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2011;13(8):976-86.
172. Ma CK, Blyth E, Clancy L, Simms R, Burgess J, Brown R, et al. Addition of varicella zoster virus-specific T cells to cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and adenovirus tri-specific T cells as adoptive immunotherapy in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2015;17(10):1406-20.
173. Kallay K, Kassa C, Reti M, Karaszi E, Sinko J, Goda V, et al. Early Experience With CliniMACS Prodigy CCS (IFN-gamma) System in Selection of Virus-specific T Cells From Third-party Donors for Pediatric Patients With Severe Viral Infections After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Immunother*. 2018;41(3):158-63.
174. Leen AM, Myers GD, Sili U, Huls MH, Weiss H, Leung KS, et al. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med*. 2006;12(10):1160-6.
175. Sili U, Leen AM, Vera JF, Gee AP, Huls H, Heslop HE, et al. Production of good manufacturing practice-grade cytotoxic T lymphocytes specific for Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and adenovirus to prevent or treat viral infections post-allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Cytotherapy*. 2012;14(1):7-11.
176. Leen AM, Christin A, Myers GD, Liu H, Cruz CR, Hanley PJ, et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*. 2009;114(19):4283-92.
177. Papadopoulou A, Gerdemann U, Katari UL, Tzannou I, Liu H, Martinez C, et al. Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med*. 2014;6(242):242ra83.
178. Bollard CM, Rooney CM, Heslop HE. T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(9):510-9.
179. Kaeuferle T, Deisenberger L, Jablonowski L, Stief TA, Blaeschke F, Willier S, et al. CRISPR-Cas9-Mediated Glucocorticoid Resistance in Virus-Specific T Cells for Adoptive T Cell Therapy Posttransplantation. *Mol Ther*. 2020;28(9):1965-73.

180. Basar R, Daher M, Uprety N, Gokdemir E, Alsuliman A, Ensley E, et al. Large-scale GMP-compliant CRISPR-Cas9-mediated deletion of the glucocorticoid receptor in multivirus-specific T cells. *Blood Adv.* 2020;4(14):3357-67.
181. Peter L, Wendering DJ, Schlickeiser S, Hoffmann H, Noster R, Wagner DL, et al. Tacrolimus-resistant SARS-CoV-2-specific T cell products to prevent and treat severe COVID-19 in immunosuppressed patients. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2022;25:52-73.
182. De Angelis B, Dotti G, Quintarelli C, Huye LE, Zhang L, Zhang M, et al. Generation of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes resistant to the immunosuppressive drug tacrolimus (FK506). *Blood.* 2009;114(23):4784-91.
183. Gerdemann U, Keirnan JM, Katari UL, Yanagisawa R, Christin AS, Huye LE, et al. Rapidly generated multivirus-specific cytotoxic T lymphocytes for the prophylaxis and treatment of viral infections. *Mol Ther.* 2012;20(8):1622-32.
184. Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Dotti G, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med.* 2008;14(11):1264-70.
185. Lapteva N, Gilbert M, Diaconu I, Rollins LA, Al-Sabbagh M, Naik S, et al. T-Cell Receptor Stimulation Enhances the Expansion and Function of CD19 Chimeric Antigen Receptor-Expressing T Cells. *Clin Cancer Res.* 2019;25(24):7340-50.
186. Omer B, Castillo PA, Tashiro H, Shum T, Huynh MTA, Cardenas M, et al. Chimeric Antigen Receptor Signaling Domains Differentially Regulate Proliferation and Native T Cell Receptor Function in Virus-Specific T Cells. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:343.
187. Sun J, Huye LE, Lapteva N, Mamonkin M, Hiregange M, Ballard B, et al. Early transduction produces highly functional chimeric antigen receptor-modified virus-specific T-cells with central memory markers: a Production Assistant for Cell Therapy (PACT) translational application. *J Immunother Cancer.* 2015;3:5.
188. Becker TC, Wherry EJ, Boone D, Murali-Krishna K, Antia R, Ma A, et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med.* 2002;195(12):1541-8.
189. Sullivan NT, Allen AG, Atkins AJ, Chung CH, Dampier W, Nonnemacher MR, et al. Designing Safer CRISPR/Cas9 Therapeutics for HIV: Defining Factors That Regulate and Technologies Used to Detect Off-Target Editing. *Front Microbiol.* 2020;11:1872.
190. Weber EW, Parker KR, Sotillo E, Lynn RC, Anbunathan H, Lattin J, et al. Transient rest restores functionality in exhausted CAR-T cells through epigenetic remodeling. *Science.* 2021;372(6537).
191. Dahmani A, Janelle V, Carli C, Richaud M, Lamarche C, Khalili M, et al. TGFbeta Programs Central Memory Differentiation in Ex Vivo-Stimulated Human T Cells. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(9):1426-39.
192. Ghaffari S, Khalili N, Rezaei N. CRISPR/Cas9 revitalizes adoptive T-cell therapy for cancer immunotherapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021;40(1):269.
193. Kath J, Du W, Pruene A, Braun T, Thommandru B, Turk R, et al. Pharmacological interventions enhance virus-free generation of TRAC-replaced CAR T cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2022;25:311-30.