



HAL
open science

Expression contrôlée d'un gène thérapeutique dans les lymphocytes T pour une utilisation en immunothérapie cellulaire

Aurore Dougé

► **To cite this version:**

Aurore Dougé. Expression contrôlée d'un gène thérapeutique dans les lymphocytes T pour une utilisation en immunothérapie cellulaire. Cancer. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC060 . tel-04599842

HAL Id: tel-04599842

<https://theses.hal.science/tel-04599842>

Submitted on 4 Jun 2024

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

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

**ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**

Thèse

Présentée à l'Université Clermont-Auvergne pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

**Spécialité
Biologie Santé**

Soutenue le 30 novembre 2022

Aurore Dougé

**Expression contrôlée d'un gène thérapeutique dans les lymphocytes T
pour une utilisation en immunothérapie cellulaire**

Présidente du jury

Pr Marie-Thérèse RUBIO

Rapporteurs

Pr Florence SABATIER
Dr Marina DESCHAMPS
Dr Iban SEILIEZ

Examineurs

Dr Françoise DEGOUL
Pr Jacques-Olivier BAY

Directeurs de thèse

Dr Alain BRUHAT
Dr Paul-Olivier ROUZAIRE

UMR 1019 de Nutrition Humaine INRAe de Clermont-Ferrand/Theix

REMERCIEMENTS

J'exprime en premier lieu mes sincères remerciements à Mme le Pr Florence Sabatier, Mme le Dr Marina Deschamps, et M le Dr Iban Seiliez pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie également l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de participer à ce jury, en particulier Mme le Pr Marie-Thérèse Rubio et Mme le Dr Françoise Degoul.

Je remercie particulièrement le Pr Jacques-Olivier Bay, sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour. Merci de me porter et de me pousser toujours plus loin. Merci de croire en moi et pour votre indéfectible soutien.

Je remercie également le Pr Olivier Tournilhac, le Dr Thierry Walzer, le Dr Christophe Ferrand, le Dr Marina Deschamps, le Pr Pierre Verrelle et le Dr Pierre Fafournoux, pour avoir accepté de participer à mes différents comités de thèse. Merci pour vos avis éclairés et pour les échanges très enrichissants que nous avons pu avoir et qui nous ont permis d'avancer dans ce beau projet.

Merci mille fois à mes deux directeurs de thèse, Alain Bruhat et Paul Rouzair.

A toi Alain, merci de m'avoir guidé dans ce monde qui est celui de la sciences, de m'avoir soutenu au cours de ces cinq années passées ensemble depuis l'année de M2, d'avoir respecté mon mode de fonctionnement, et d'avoir supporté mon caractère pas toujours facile. Je suis ravie de ce travail accompli ensemble.

A toi Paul, mon ami, merci d'être à mes côtés. Merci d'avoir été d'un tel soutien pendant ces trois années de thèse, merci de m'avoir fait tenir bon dans les moments difficiles. Merci pour ces échanges scientifiques qui m'ont fait grandir. Je suis fière de ce que nous avons accompli ensemble, et je suis confiante en l'avenir car je sais qu'il sera fait de beaux projets communs.

Je remercie aussi sincèrement

Toute l'équipe Protéostasis ...

... Vous allez tellement me manquer

Toute l'équipe d'Oncologie du CHU ...

... Hâte de vous retrouver pour la suite de l'aventure

Tous mes amis...

... Merci d'être à mes côtés, merci d'être vous

Ma famille ...

... Hâte de retrouver du temps pour vous, je vous aime !

*Jean-Mi, merci pour ton éternel soutien, pour tout ce que nous
partageons, pour être mon meilleur ami <3*

*" La vie, ce n'est pas d'attendre que les orages passent,
c'est d'apprendre à danser sous la pluie. "*

Sénèque

SOMMAIRE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
<i>INTRODUCTION GENERALE</i>	<i>3</i>
<i>Chapitre I. L'immunothérapie cellulaire</i>	<i>5</i>
I. Rappels sur les principes d'immunité innée et adaptative	5
II. L'immunité anti-tumorale	7
III. L'immunothérapie anti-tumorale : focus sur les stratégies d'immunothérapie cellulaire	9
1) L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	11
2) Les cellules CAR-T	13
IV. Le lymphocyte T, acteur clé dans les stratégies d'immunothérapie cellulaire	19
1) Généralités	19
2) Activités des lymphocytes T	21
3) Métabolisme des lymphocytes T	25
4) Lymphocytes T et immunothérapie cellulaire	31
<i>Chapitre II. La voie de signalisation GCN2-ATF4</i>	<i>35</i>
I. L'homéostasie des acides aminés	35
II. Situations de déséquilibre en acides aminés	37
1) En cas de sous-nutrition protéique	37
2) En cas de consommation d'un régime carencé en acides aminés	37
3) Dans des situations d'agressions	39
III. La voie GCN2-eIF2 α -ATF4	41
1) La kinase GCN2	41
2) Le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α	43
3) Les gènes cibles de la voie GCN2-ATF4	45
IV. Principaux rôles de la voie GCN2-ATF4	49
1) Contrôle de la prise alimentaire	49

2)	Contrôle de l'autophagie et interaction avec la voie mTOR	49
3)	GCN2 et cancers	53
V.	La voie de signalisation GCN2-ATF4 dans les lymphocytes T	55
1)	GCN2 et cellules de l'immunité innée	55
2)	GCN2 et réponse à l'Indoléamine-2,3-Dioxygénase (IDO)	57
3)	GCN2 et réponse à l'Halofuginone (HF)	59
4)	GCN2 et réponse à l'Asparaginase (ASNase)	61
5)	GCN2 et réponse à une carence en acide aminé	63
6)	Impact de l'activation du lymphocyte T sur la réponse à une carence en AA	67
<i>Chapitre III. NUTRIREG : un système de régulation de l'expression génique qui implique la voie GCN2-ATF4</i>		<i>71</i>
I.	La construction génétique délivrant le transgène	71
II.	L'inducteur : un régime carencé en un AAI	73
III.	Preuves de concept avec un gène rapporteur	73
IV.	Preuve de concept avec un gène à orientation thérapeutique	75
V.	Les avantages de la technologie NUTRIREG	77
OBJECTIFS du travail		79
RESULTATS EXPERIMENTAUX		83
<i>Publication soumise</i>		<i>87</i>
<i>Résultats complémentaires hors publication</i>		<i>163</i>
I.	Analyse transcriptomique de l'impact d'une carence en leucine de 6 heures sur des lymphocytes T humains	163
1)	Rationnel	163
2)	Matériel et Méthodes	163
3)	Analyse en composantes principales	165
4)	Identification des gènes différentiellement exprimés en cas d'exposition de lymphocytes T humains à une carence en leucine de 6h	167

5) Identification des processus biologiques impactés par la carence en leucine pendant 6 heures dans les lymphocytes T humains _____	173
6) Identification des gènes dont l'expression est dépendante de la kinase GCN2 _____	183
7) Analyse en <i>Gene Ontology</i> du rôle de GCN2 dans l'impact d'une carence en leucine de 6 heures dans les lymphocytes T humains _____	191
8) Perspectives _____	193
II. Une autre piste pour démontrer la fonctionnalité de NUTRIREG dans les lymphocytes T : avec le gène à orientation thérapeutique <i>FoxP3</i> _____	195
1) Rationnel _____	195
2) Matériel et méthodes _____	199
3) Premiers résultats _____	199
4) Synthèse et perspectives _____	207
DISCUSSION & PERSPECTIVES _____	209
<i>Synthèse et discussion des résultats du travail de thèse</i> _____	<i>211</i>
I. Description des conditions d'activation de la voie GCN2-ATF4 et de ses conséquences dans les lymphocytes T humains _____	211
I. Preuve de concept de la fonctionnalité de la technologie NUTRIREG dans des lymphocytes T humains <i>in vitro</i> _____	219
1) A l'aide d'un gène rapporteur _____	219
2) A l'aide d'un gène à orientation thérapeutique _____	221
II. Preuve de concept de la fonctionnalité de la technologie NUTRIREG dans des lymphocytes T humains <i>in vivo</i> _____	225
<i>Perspectives de ce travail de thèse</i> _____	<i>231</i>
I. NUTRIREG et allogreffe de cellules souches hématopoïétiques _____	231
1) Rationnel de l'utilisation de lymphocytes T régulateurs pour la prévention ou le traitement de la réaction du greffon contre l'hôte (GvH) _____	231
2) Données pré-cliniques et cliniques de l'utilisation de Treg et de Tr1 pour la prévention ou le traitement de la GvH _____	235

3)	Quelle place pour NUTRIREG pour la prévention ou le traitement de la GvH ? _____	241
4)	Stratégie expérimentale pour démontrer la fonctionnalité de NUTRIREG pour la prévention ou le traitement de la GvH avec le transgène AARE-TK-IL-10 _____	245
5)	Une autre piste potentielle pour l'utilisation de NUTRIREG au cours d'une allo-CSH : stimuler le greffon en cas de rechute ? _____	247
II.	NUTRIREG et cellules T à récepteur antigénique chimérique _____	251
1)	Cellules CAR-T : les problématiques actuellement rencontrées et les stratégies développées pour y faire face _____	251
2)	Quelle place pour NUTRIREG dans le domaine des cellules CAR-T ? _____	265
3)	Stratégie expérimentale pour démontrer à court terme la fonctionnalité de NUTRIREG dans les cellules CAR-T _____	271
	<i>CONCLUSION GENERALE</i> _____	279
	BIBLIOGRAPHIE _____	283
	ANNEXES _____	313

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Principe d'immunoédition des cellules tumorales.	6
Figure 2. Mécanismes d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire.	8
Figure 3. Physiopathologie de la GvH aigue (<i>Graft-versus-Host Disease</i>) digestive.	12
Figure 4. Différences structurelles et fonctionnelles entre un TCR classique et un CAR.	14
Figure 5. Structure d'un CAR (<i>Chimeric Antigen Receptor</i>).	14
Figure 6. Procédure de production des cellules CAR-T et de réinjection au patient.	16
Figure 7. Mécanisme d'action de la cellule CAR-T après injection au patient.	16
Figure 8. Signaux d'activation du lymphocyte T par une cellule présentatrice d'antigène.	20
Figure 9. Les différents sous-types de lymphocytes T CD4+.	20
Figure 10. Mécanismes d'action des Tregs.	22
Figure 11. Mécanismes d'action des lymphocytes T CD8+.	22
Figure 12. « Immune checkpoint » pour la régulation du lymphocyte T.	24
Figure 13. Métabolisme des lymphocytes T naïfs et activés.	26
Figure 14. Régulation de l'homéostasie des acides aminés et des protéines chez l'Homme.	34
Figure 15. Conséquence de la consommation d'un régime déséquilibré en acide aminé chez la souris.	38
Figure 16. Structure de la kinase GCN2.	40
Figure 17. Mécanisme d'action de la kinase GCN2 par une carence en acides aminés.	40
Figure 18. Impact de la phosphorylation d'eIF2 α sur l'initiation de la traduction.	42

Figure 19. Régulation de la traduction d'ATF4 en réponse à la carence en acides aminés	44
Figure 20. Conditions de stress pouvant induire la phosphorylation d'eIF2α.	46
Figure 21. Séquences CARE de différents gènes cibles de la voie eIF2α-ATF4.	46
Figure 22. Mécanismes d'action des voies mTORC1 et GCN2 dans la régulation de l'autophagie en réponse à une carence en acide aminé.	50
Figure 23. Implications potentielles de la voie GCN2-ATF4 dans les pathologies tumorales.	54
Figure 24. Mécanisme d'action de l'Indoléamine-2,3-Dioxygénase (IDO) sur les lymphocytes T.	58
Figure 25. Mécanisme d'action de l'asparaginase sur les cellules tumorales	62
Figure 26. Sélection des séquences AARE et du promoteur pour une construction NUTRIREG optimale.	72
Figure 27. Construction génétique de la technologie NUTRIREG.	72
Figure 28. Principe général de la technologie NUTRIREG.	74
Figure 29. Le modèle de souris transgénique CARE-LUC.	74
Figure 30. Preuve de la fonctionnalité du transgène AARE-TK-LUC après consommation d'un régime carencé en leucine chez la souris bioluminescente CARE-LUC	76
Figure 31. Preuve de la fonctionnalité du transgène AARE-TK-LUC après consommation d'un régime carencé de 6h en chacun des 9 AAI chez la souris bioluminescente CARE-LUC	76
Figure 32. Visualisation des tissus dans lesquels la voie GCN2-ATF4 est induite lors de la consommation d'un régime carencé en un AAI (6h) grâce au modèle de souris bioluminescente CARE-LUC.	78
Figure 33. Preuve de la fonctionnalité du transgène AARE-TK-TRAIL dans un modèle murin de glioblastome.	78
Figure 34. Analyse en composantes principales des résultats de RNA-Seq.	167

Figure 35. Identification du nombre de gènes surexprimés en cas de carence en leucine (6h) selon <i>Fold Change</i> (FC) et P-value ajustée (adj p value).	169
Figure 36. Nombre de gènes surexprimés ($FC \geq 1,5$) ou réprimés ($FC \leq 0,67$) en cas de carence en leucine (6h) avec une P-value ajustée $< 0,001$.	169
Figure 37. Liste des 30 gènes les plus fortement surexprimés (à gauche) et des 30 gènes les plus fortement réprimés (à droite) en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.	171
Figure 38. Résultats d'analyse en <i>Gene Ontology</i> des gènes surexprimés ou réprimés en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.	175
Figure 39. Identification du nombre de gènes surexprimés ou réprimés par <i>clusters</i> de GO en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.	177
Figure 40. Liste des gènes surexprimés ou réprimés dans les principaux <i>clusters</i> de GO en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.	179
Figure 41. Identification des facteurs de transcription régulant l'expression des gènes surexprimés ou réprimés en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.	181
Figure 42. Stratégie d'identification des gènes dont l'expression est dépendante de la kinase GCN2 en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains	185
Figure 43. Nombre de gènes surexprimés (à gauche) ou réprimés (à droite) dont l'expression est dépendante, partiellement dépendante, ou indépendante de la kinase GCN2 en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.	187
Figure 44. <i>Heatmap</i> représentant les gènes surexprimés (en rouge) ou réprimés (en vert), dont l'expression est dépendante de la kinase GCN2 en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.	187
Figure 45. Liste des 30 gènes les plus fortement surexprimés en cas de carence en leucine (6h) et dont l'expression est dépendante de la kinase GCN2 dans les lymphocytes T humains.	189

Figure 46. Résultats d'analyse en <i>Gene Ontology</i> des gènes surexprimés ou réprimés de manière dépendante de GCN2 en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.	191
Figure 47. Identification des facteurs de transcription régulant l'expression des gènes surexprimés ou réprimés de manière dépendante de GCN2 en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.	193
Figure 48. Schéma représentant les caractéristiques phénotypiques et les mécanismes d'action des lymphocytes Tregs FoxP3+ (à gauche) et Tr1 (à droite).	194
Figure 49. Analyse du niveau d'expression par RT-qPCR de l'ARNm du gène FoxP3 de LT non transduits (NT cells) et de LT transduits avec le transgène AARE-TK-FoxP3 (MOI 10) cultivés en milieu contrôle (Ctl) ou carencé en leucine pendant 16h (-Leu (16h)).	201
Figure 50. Analyse du niveau d'expression de la protéine FoxP3 et d'eIF2 α (forme totale et phosphorylée) par western blot dans des LT non transduits (NT cells) et dans des LT transduits avec le transgène AARE-TK-FoxP3 (MOI 10) cultivés en milieu contrôle (Ctl) ou carencé en leucine pendant 16h (-Leu (16h)).	201
Figure 52. Analyse du niveau d'expression par RT-qPCR de l'ARNm des gènes TGF- β , IL-10, Granzyme B (GZMb) et Perforine 1 (PRF1) de LT non transduits (NT cells) et de LT transduits avec le transgène AARE-TK-FoxP3 (MOI 10) cultivés en milieu contrôle (Ctl) ou carencé en leucine pendant 16h (-Leu (16h)).	205
Figure 53. Stratégie potentielle d'utilisation de NUTRIREG pour la prévention ou le traitement de la GvH dans le cadre de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.	242
Figure 54. Stratégie expérimentale pour démontrer la fonctionnalité de NUTRIREG pour la prévention ou le traitement de la GvH avec le transgène AARE-TK-IL-10 dans un modèle murin.	246
Figure 55. Stratégie potentielle d'utilisation de NUTRIREG pour stimuler ou freiner l'activité d'une cellule CAR-T.	266
Figure 56. Représentation schématique de la construction génétique commune IL1RAP-CAR-AARE-TK-eGFP.	272

Figure 57. Stratégie expérimentale pour valider <i>in vitro</i> la fonctionnalité de la construction génétique commune IL1RAP-CAR-AARE-TK-eGFP.	274
Figure 58. Stratégie expérimentale pour valider <i>in vivo</i> la fonctionnalité de la construction génétique commune IL1RAP-CAR-AARE-TK-eGFP.	274
Figure 59. Stratégie expérimentale pour valider <i>in vivo</i> la fonctionnalité de la construction génétique commune IL1RAP-CAR-AARE-TK-c-JUN.	276
Figure 60. Schéma de synthèse de l'apport potentiel de NUTRIREG dans le domaine de l'immunothérapie cellulaire.	280

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Synthèse des données de la littérature sur la voie GCN2-ATF4 dans les lymphocytes T. 68

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4-1BB (TNFRSF9) : Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 9
AA : Acide Aminé
AAI : Acide Aminé Indispensable
AARE : Amino Acid Response Elements
AAV : Adeno-Associated Virus
ADM2 : Adrenomedullin 2
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc (cDNA) : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AhR : Aryl hydrocarbure
Allo-CSH : Allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques
AP-1 : Activator Protein-1
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ARNt : Acide RiboNucléique de transfert
ASCT2 : Alanine, Serine, Cysteine Transporter 2
ASNS : Asparagine Synthétase
ATF : Activating Transcription Factor
ATG : Autophagy-related genes
ATP : Adenosine TriPhosphate
BCL2 : B-Cell Lymphoma 2
BCMA : B-Cell Maturation Antigen
βG : beta-globine
Bim : Bcl2-like-protein 11
bZIP : basic Leucine-Zipper
CARE : C/EBP-ATF-Responsive Elements
CAR-T : Chimeric Antigen Receptor-T
CAT : Catalase
CAT-1 : Cationic Amino Acids Transporter 1
CD : Cluster of Differentiation
C/EBP : CCAAT/Enhancer Binding Protein
CHAC1 : ChaC glutathione-specific γ -glutamylcyclotransferase 1
CHOP : C/EBP Homologous Protein
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène
CREB : cAMP Responsive Element Binding protein
CRS : Cytokine Release Syndrom
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
CTH : Cystathionine Gamma-Lyase
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
Ctl : Contrôle
CXCR : C-X-C motif chemokine Receptor
DC : Dendritic cell
DDIT3 : DNA Damage-inducible Transcript 3
DLI : Donor Lymphocyte Infusion
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO : DiMethyl SulfOxyde
DSS : Dextran Sodium Sulfate
EAA : Essential Amino Acid
EFS : Établissement Français du Sang
eGFP : enhanced Green Fluorescence Protein
eIF : eucaryotic Initiation Factor

eIF2 α : eucaryotic Initiation Factor 2 (α subunit)
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay
FasL : Fas Ligand
FC : Fold Change
FoxP3 : Forkhead Box P3
GADD34 : Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 34
Gal-1 : Galectin 1
GATA3 : GATA binding protein 3
GCN2 : General Control Nonrepressed 2
GDF15 : Growth/Differentiation Factor 15
GDP : Guanidine DiPhosphate
GILZ (TSC22D3) : Glucocorticoid-Induced Leucine-Zipper
GITR : Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein
GLUT1 : Glucose Transporter 1
GLS : Glutaminases
GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GO : Gene Ontology
GR : Glucocorticoids receptor
GTP : Guanidine TriPhosphate
GvH : Graft versus Host disease
GvL : Graft-versus-Leukemia
GvT : Graft-versus-Tumor
Gy : Gray
GZMb : Granzyme B
HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2
HERP : Homocysteine-induced ER Protein
HF : Halofuginone
His : Histidine
HLA : Human Leukocyte Antigen
HOXB9 : Homeobox B9
HRI : Heme-Regulated eIF2 α kinase
HSPG : Heparin Sulfate ProteoGlycan
IBTK α : Inhibitor of Bruton Tyrosine Kinase α
iCASP9 : inducible Caspase 9
IDO : Indoléamine-2,3-Dioxygénase
IFN- γ : Interferon- γ
IGF : Insulin Growth Factor
IGFBP1 : Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1
IL : Interleukin
IL1RAP : Interleukin-1 Receptor Accessory Protein
Inh : Inhibiteur
INHBE : Inhibine E
INRAe : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement
IPEX : Immunodérégulation, Polyendocrinopathie, et Entéropathie liées au chromosome X
ISR : Integrated Stress Response
ISRIB : Integrated Stress Response InhiBitor
KO : Knock-Out
KYN : Kynurénines
LAG3 : Lymphocyte-Activation Gene 3
LAT1 : Large neutral Amino acid Transporter 1
Leu : Leucine
LPS : LipoPolySaccharide
LT : Lymphocyte T
LTR : Long Terminal Repeat
Luc : Luciférase

LV : Lentivirus
LXRs : Liver X Receptors
Lys : Lysine
LY9 : Lymphocyte Antigen 9
mAb : monoclonal Antibody
MAP1LC3B : Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MDSCs : Myeloid-Derived Suppressor Cell
Met : Methionine
MKX : Mohawk Homeobox
MOI : Multiplicity of Infection
mTOR : mammalian Target Of Rapamycine
mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycine Complex 1
MUC1 : Mucin 1
NEAA : Non Essential Amino Acid
NFAT : Nuclear Factor of Activated T cell
NF- κ B : Nuclear Factor- κ B
NK : Natural Killer
NXG : NOD Xenograft Gamma strain
p70S6K : ribosomal protein S6 Kinase
pb : paire de base
PBMCs : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PD-1 : Programmed cell Death protein 1
PDL-1 : Programmed Death ligand 1
PERK : Pancreatic Endoplasmic Reticulum eIF2 Kinase
Phe : Phenylalanine
PI3K : PhosphoInositide 3 Kinase
PK : Proteine Kinase
PKC : Protein Kinase C
PKR : Protein Kinase RNA-activated
PMA : Phorbol Myristate Acetate
PRF1 : Perforine 1
PRR : Pattern Recognition Receptor
PUMA : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RAG : Recombination Activating Genes
REDD1 : Regulated in Development and DNA damage response 1
Rheb : Ras homolog enriched in brain
RNA-Seq : RNA Sequencing
ROR- γ t : Retineic-acid-receptor-related Orphan receptor gamma
ROS : Reactive Oxygen Species
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
RT-qPCR : Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction
S100P : S100 calcium binding-protein P
scFv : single-chain variable Fragment
S.E.M : Standard Error of the Mean
SESN2 : Sestrin2
sh-RNA : small hairpin-RNA
Slc : Solute carrier family
SNAT : Sodium-coupled Neutral Amino acid Transporter
SQSTM1 : Sequestosome 1
SREBP-2 : Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
STC2 : Stanniocalcin 2
TAA : Tumor Associated Antigen

TAMs : Tumor-Associated Macrophages
T-bet : T-box expressed in T cells
TBX21 : T-box transcription factor
TCA : Tricarboxylic acid cycle
TCR : T-Cell Receptor
TERT : Telomerase Reverse Transcriptase
TFEB : Transcription Factor EB
TGF- β : Transcription Growth Factor β
T_H : T helper
Thr : Thréonine
TIM-3 : T-cell Immunoglobulin and Mucin containing protein 3
TK : Thymidine Kinase
TLR : Toll Like Receptors
TNC : Tenascin-C
TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
Tr1 : T regulatory type 1
TRAIL : Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRB3 : Tribbles Pseudokinase 3
Treg : T régulateur
Trp : Tryptophane
TRRUST : Transcription Regulatory Relationships Unraveled Sentence-based Text mining
TRUCKs : T cells Redirected for Universal Cytokine-mediated Killing
TSC2 : Tuberous Sclerosis Complex 2
ULBP1 : UL16 Binding Protein 1
ULK1 : Unc51 Like Autophagy activating Kinase 1
 μ M : micro Molaire
UMR : Unité Mixte de Recherche
uORF : upstream Open Reading Frame
UTR : UnTranslated Region
UV : Ultra-Violet
Val : Valine
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
xCT : sodium independent aspartate/glutamate/cystine Transporter



INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION GENERALE

L'immunothérapie cellulaire est actuellement en pleine expansion en cancérologie. Il s'agit d'une approche thérapeutique utilisant des cellules du système immunitaire pour remplacer, réparer, augmenter ou modifier l'activité biologique d'un tissu ou d'un organe endommagé. Ce principe est largement utilisé dans le traitement des hémopathies malignes, avec des thérapies cellulaires anciennes comme l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ou plus récentes comme les cellules CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor-T*). Ces deux exemples de thérapie cellulaire sont certes efficaces, mais il existe à ce jour de nombreuses difficultés à contrôler les cellules une fois réinjectées au malade, soit pour majorer leur action thérapeutique, soit pour limiter leur toxicité. Il apparaît donc important de pouvoir apporter un système de régulation d'expression génique souple et facilement réversible pour maîtriser le plus simplement possible les effets de ces cellules. Nous nous sommes ainsi intéressés à une technologie qui permet d'induire l'expression d'un transgène suite à la consommation d'un régime carencé en un acide aminé indispensable. Cette technologie innovante appelée NUTRIREG, développée et brevetée par l'équipe Proteostasis (UMR 1019 – INRAe – Clermont-Ferrand), utilise les propriétés d'une voie de signalisation, la voie GCN2-ATF4, pour induire l'expression de son transgène.

Nous développerons donc dans cette introduction bibliographique les concepts de l'immunothérapie cellulaire et le rôle clé joué par les lymphocytes T dans ce domaine. Nous aborderons ensuite les données concernant la voie GCN2-ATF4 de manière générale, puis celles concernant cette voie de signalisation dans les lymphocytes T. Enfin, nous décrirons le principe de la technologie NUTRIREG et les preuves de concept déjà établies pour son utilisation.

CHAPITRE I. L'IMMUNOTHÉRAPIE CELLULAIRE

I. Rappels sur les principes d'immunité innée et adaptative

Le système immunitaire est un système de défense qui protège l'organisme contre les agents pathogènes tels que les virus et les bactéries, mais aussi contre les cellules tumorales. Au sein du système immunitaire, on distingue deux grands types d'immunité : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

L'immunité innée est celle qui se met en place en premier lors de l'attaque d'un agent pathogène, au bout de quelques minutes, quelques heures au maximum. Les principaux types cellulaires appartenant à cette immunité sont les cellules phagocytaires (monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles), les cellules *Natural Killer* (NK), et les cellules dendritiques. Ces cellules vont être capable de reconnaître de manière commune, avec une spécificité fixe et limitée, des molécules ou des motifs moléculaires associés aux pathogènes, grâce aux récepteurs de type PRR (*Pattern Recognition Receptor*), les plus représentés étant les TLR (*Toll Like Receptors*). Cette immunité est certes rapide, mais reste souvent insuffisante et n'entraîne de plus pas de mémoire immunologique.

Les cellules de l'immunité innée vont alors contribuer à la mise en place d'une **réponse immunitaire adaptative**, certes plus tardive, mais bien plus spécifique. Les principales cellules de l'immunité adaptative sont les lymphocytes B (immunité humorale) et les lymphocytes T (immunité cellulaire). Les lymphocytes B peuvent être activés directement par l'antigène, et/ou par un lymphocyte T CD4⁺ effecteur. Une fois activés, les lymphocytes B vont subir une expansion clonale et se différencier en plasmocytes afin de produire des immunoglobulines spécifiques de l'antigène. Les lymphocytes T eux ne peuvent être activés que si une cellule présentatrice d'antigène leur présente à la surface de molécules du Complexe Majeur

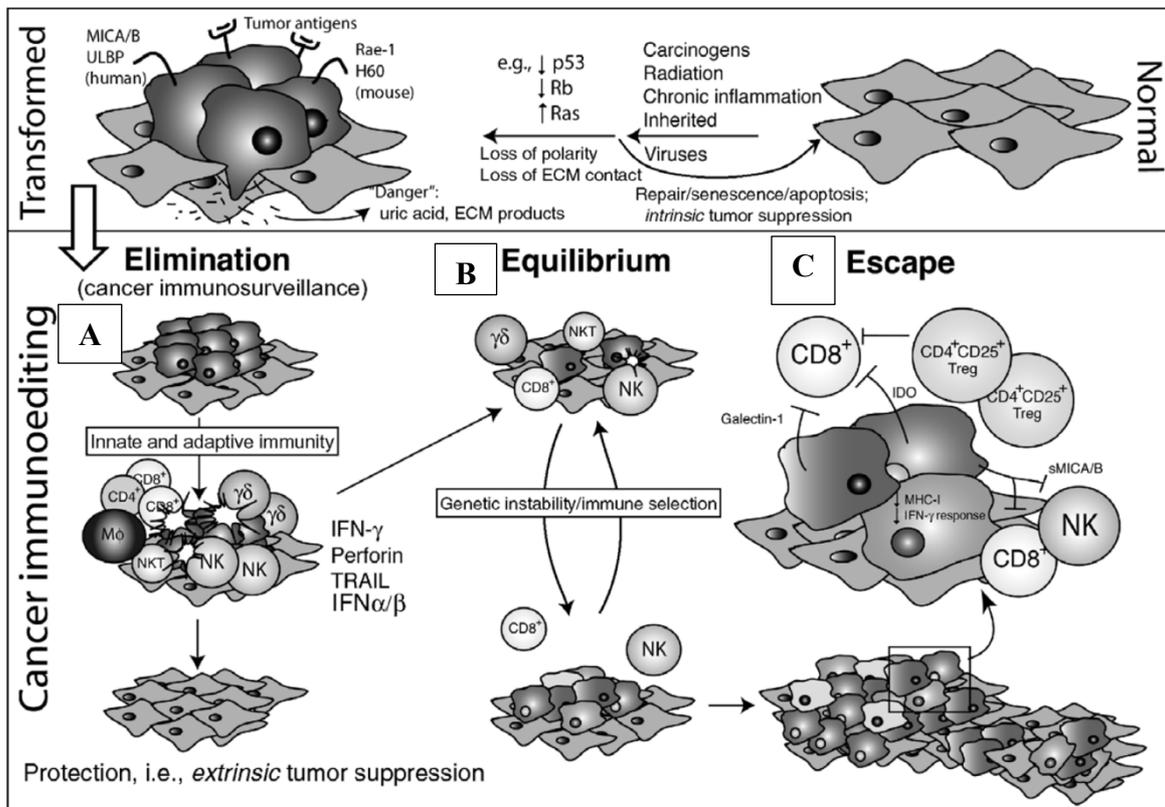


Figure 1. Principe d'immunoédition des cellules tumorales. A. Détection des cellules anormales par l'immunité innée puis activation d'une immunité adaptative plus spécifique (lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et lymphocytes T CD4+ de type T_H1 principalement). Élimination des cellules tumorales par mécanisme cytolitique et par la sécrétion d'IFN-γ. B. Phase dite d'équilibre en cas d'élimination partielle des cellules tumorales, qui sont alors contrôlées dans un état de « dormance » par le système immunitaire mais ne sont pas détruites. C. Sélection de clones tumoraux capables d'échapper au système immunitaire. Les cellules tumorales deviennent totalement invisibles pour les cellules de l'immunité, et développent des mécanismes d'immunosuppression favorisant une tolérance du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur (d'après Smyth et al., 2006).

d'Histocompatibilité (CMH) le peptide antigénique dont ils sont spécifiques. Une fois activé, le lymphocyte T va alors proliférer, se différencier et produire des cytokines afin d'amplifier la réponse immune. Cette immunité adaptative aboutira à une mémoire immunitaire permettant la mise en place rapide d'une réponse spécifique en cas de nouvelle exposition au pathogène.

II. L'immunité anti-tumorale

Longtemps controversée, l'hypothèse que le système immunitaire joue un rôle important dans la protection de son hôte contre le développement d'une tumeur maligne est maintenant clairement validée. Ce concept d'immuno-surveillance a d'abord été évoqué par Paul Ehrlich en 1909, puis les différents travaux réalisés au cours des décennies suivantes ont permis de confirmer et d'étayer cette idée (*Smyth et al., 2006*). Cette phase d'immuno-surveillance sera alors intégrée dans une théorie plus large dite d'immunoédition. Cette théorie est classiquement décrite en trois temps : un premier temps d'élimination des cellules tumorales (immuno-surveillance), suivi d'un temps d'équilibre, puis enfin un temps d'échappement au système immunitaire, aboutissant alors au développement tumoral (**Figure 1**).

La première phase d'immuno-surveillance repose tout d'abord sur la détection des cellules anormales par certains effecteurs de l'immunité innée : essentiellement les cellules *Natural Killer* (NK), les cellules dendritiques et les macrophages. Suivra alors l'activation d'une immunité adaptative plus spécifique, impliquant principalement les lymphocytes T. L'action anti-tumorale des cellules T repose essentiellement sur celle des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, et de façon moindre sur celle des lymphocytes T CD4⁺ de type T_H1 du fait de leur sécrétion d'interferon- γ , cytokine ayant un puissant effet anti-tumoral. Les lymphocytes T cytotoxiques peuvent reconnaître directement les cellules tumorales *via* les molécules de Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I, présentes à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme. Une fois activés par leur antigène cible, ces lymphocytes peuvent

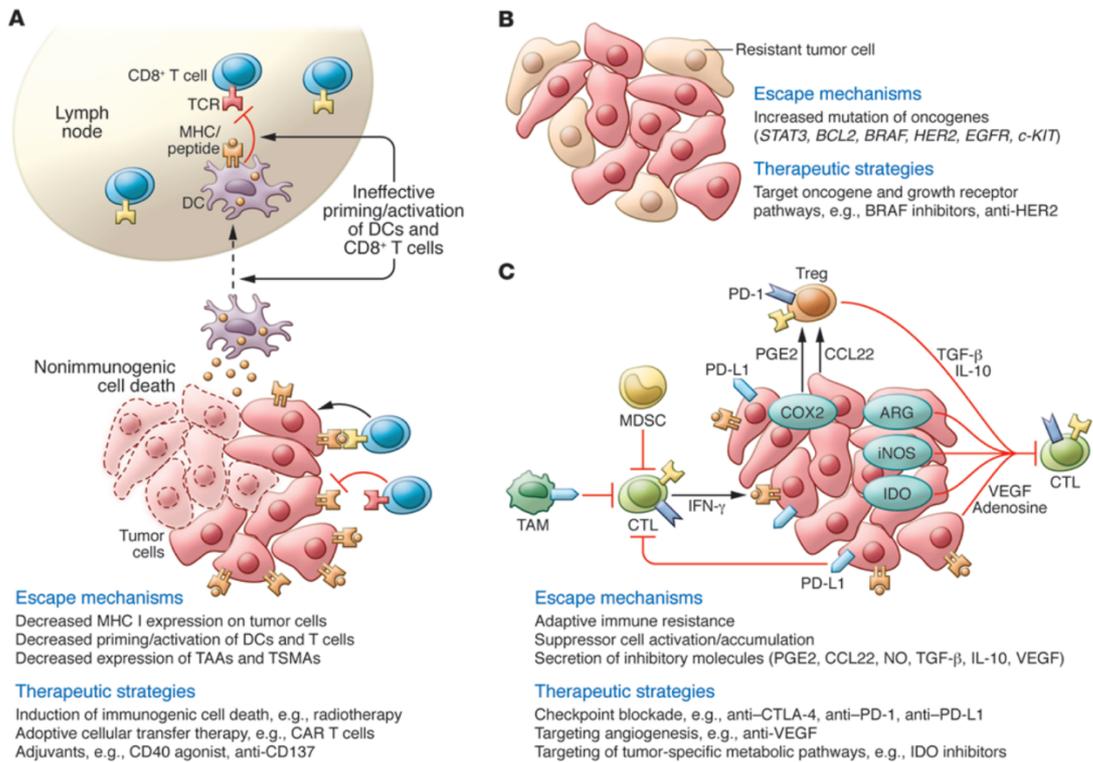


Figure 2. Mécanismes d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire. A. Diminution de l'expression des molécules de CMH de classe I à la surface des cellules tumorales et diminution de l'expression d'antigènes associés aux tumeurs (TAA), entraînant une moindre activation des cellules dendritiques et des lymphocytes T, et donc une moindre réponse immune. **B.** Développement par les cellules tumorales de mécanismes de résistance aux effecteurs cytotoxiques et expression de facteurs de croissance favorisant leur survie. **C.** Mise en place d'un micro-environnement tumoral immunosuppresseur par production de cytokines anti-inflammatoires (TGF- β , IL-10), par recrutement de lymphocytes T régulateurs, ou par sécrétion de ligands de récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T effecteurs (CTLA-4, PD-1, ...) (*d'après Teng et al., 2015*).

éliminer les cellules tumorales par mécanisme cytolytique, mais aussi par la sécrétion d'IFN- γ , amplifiant ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale (*Smyth et al., 2006*).

L'immuno-surveillance aboutit ainsi à l'élimination des cellules tumorales mais elle peut malheureusement n'être que partielle. Dans ce cas, la deuxième phase dite d'équilibre apparaît, phase qui peut durer jusqu'à plusieurs années. Les cellules tumorales sont alors contrôlées dans un état de « dormance » par le système immunitaire mais ne sont pas détruites. Du fait de la pression immunitaire appliquée sur ces cellules, des clones tumoraux peuvent être sélectionnés, ces derniers étant alors capables d'échapper au système immunitaire. Il s'agit ainsi de la dernière phase dite d'échappement : les cellules tumorales deviennent d'une part totalement invisibles pour les cellules de l'immunité, et développent d'autre part des mécanismes d'immunosuppression favorisant une tolérance du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur (**Figure 2**) (*Terme et Tanchot, 2017 ; Teng et al., 2015*).

III. L'immunothérapie anti-tumorale : focus sur les stratégies d'immunothérapie cellulaire

L'utilisation des stratégies d'immunothérapie à visée anti-tumorale a révolutionné la prise en charge des patients atteints de cancer au cours de la dernière décennie. Ces stratégies ont pour but de stimuler l'action anti-tumorale du système immunitaire et d'inhiber les mécanismes d'immunosuppression mis en place par la tumeur. Il existe plusieurs classes d'immunothérapie, la plus utilisée actuellement étant la classe des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire avec les anticorps monoclonaux anti-PD-1, anti-PD-L1 ou anti-CTLA4. D'autres classes sont en voie de développement telles que les vaccins, les virus oncolytiques ou les anticorps bispécifiques. Enfin, une dernière classe consiste à injecter directement des cellules immunitaires pour qu'elles détruisent les cellules tumorales, ces cellules immunitaires pouvant être génétiquement

modifiées selon les modèles (*Riley et al., 2019*). Cette classe correspond à la stratégie d'immunothérapie cellulaire, qui consiste donc à injecter des cellules immunitaires saines à un patient afin de suppléer les siennes qui sont défectueuses. Ces cellules peuvent être des cellules provenant du patient lui-même, il s'agit donc de cellules autologues, mais elles peuvent aussi provenir d'un donneur, il s'agira alors de cellules dites allogéniques.

1) L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

L'exemple le plus représentatif du transfert de cellules allogéniques reste l'allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (allo-CSH). Cette stratégie est ancienne puisque la première allogreffe de cellules allogéniques a eu lieu en 1957. Après de nombreux progrès, l'allo-CSH est à ce jour le seul traitement curatif de nombreuses hémopathies malignes, en particulier pour les leucémies aiguës. Cette stratégie consiste schématiquement à remplacer la moelle osseuse malade d'un patient par une moelle osseuse saine issue d'un donneur HLA-compatible. Elle représente une puissante stratégie d'immunothérapie cellulaire, permettant d'obtenir la reconstitution d'un système immunitaire sain mais également d'obtenir un effet anti-tumoral par les lymphocytes T du donneur contre les cellules tumorales résiduelles (effet *Graft-versus-Leukemia* ou GvL). Elle s'accompagne malheureusement très fréquemment de complications telles que la réaction du greffon contre l'hôte (GvH, *Graft versus Host disease*) et les infections qui limitent les indications de stratégies curatives (*Voynova et al., 2021*). La réaction du greffon contre l'hôte se déroule en trois étapes principales. Tout d'abord, les traitements utilisés dans le cadre du conditionnement de la greffe (chimiothérapies à forte dose, radiothérapie, antibiotiques, ...) vont entraîner des dommages tissulaires et le relargage de signaux de danger, en particulier des cytokines pro-inflammatoires. Ce conditionnement est pour autant indispensable puisqu'il permet d'une part d'avoir un effet anti-tumoral, et d'autre part d'avoir un effet immunosuppresseur sur le système immunitaire du receveur pour favoriser

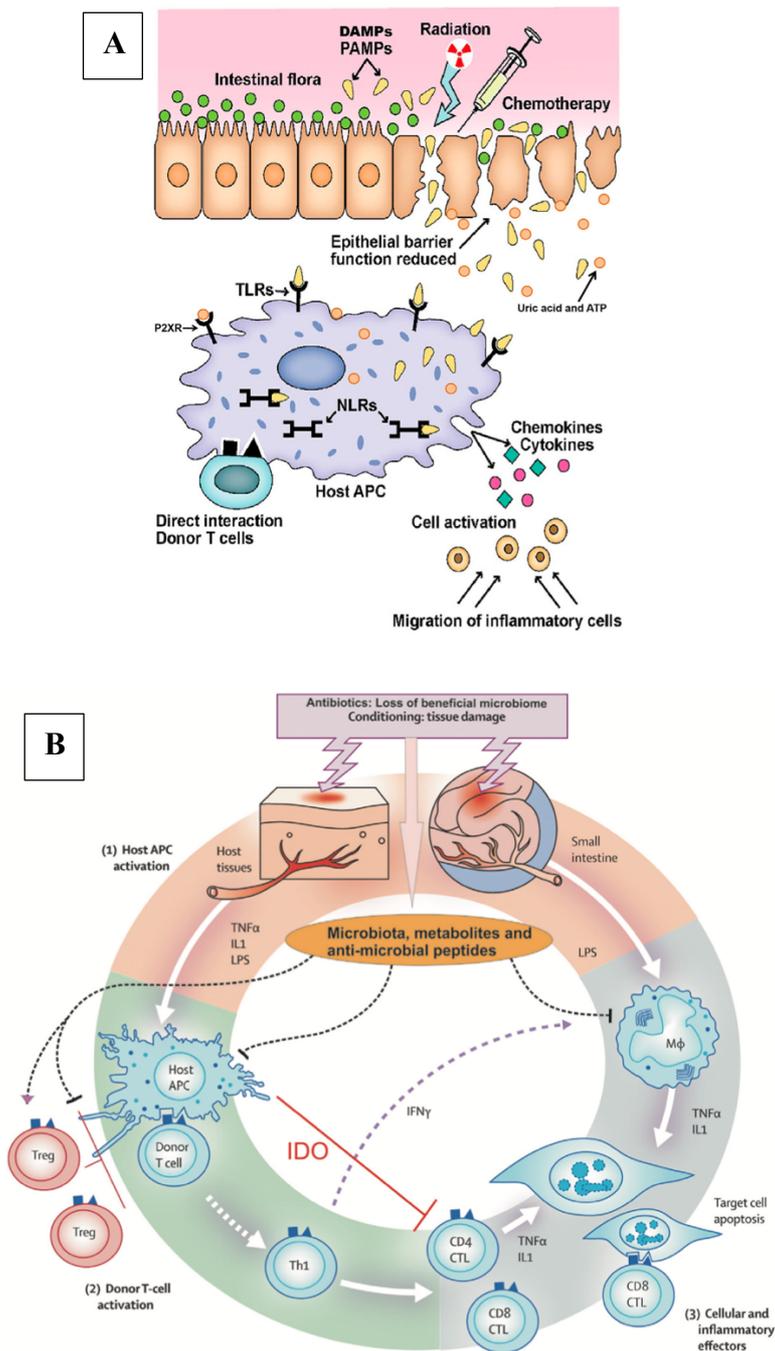


Figure 3. Physiopathologie de la GvH aigüe (*Graft-versus-Host Disease*) digestive. **A.** Rôle du système immunitaire inné : les traitements utilisés lors du conditionnement de la greffe entraînent une rupture de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, libérant ainsi des molécules de danger captées par les récepteurs PRR des cellules présentatrices d'antigène de l'hôte, aboutissant ainsi à la production de cytokines inflammatoires et à l'activation des lymphocytes T du donneur. **B.** Rôle du système immunitaire adaptatif : après activation des cellules présentatrices d'antigène de l'hôte, activation des lymphocytes T matures du donneur, avec prolifération et différenciation préférentielle en phénotype pro-inflammatoire T_H1 , contribuant à l'activation de LT $CD4^+$ effecteurs et de LT $CD8^+$ cytotoxiques qui iront détruire les tissus cibles du receveur. Ce phénomène est amplifié par le LPS (LipoPolySaccharide) libéré suite aux dommages de la muqueuse intestinale, qui recrutera alors des cellules myéloïdes productrices de cytokines inflammatoires (d'après Ghimire et al., 2017).

la prise du greffon. Les cytokines pro-inflammatoires relarguées vont alors stimuler les cellules présentatrices d'antigène du receveur (et de façon moindre celles du donneur), qui iront à leur tour activer les lymphocytes T du donneur, qui vont reconnaître les cellules saines du patient receveur comme étant des cellules étrangères. Enfin, cette réaction inflammatoire va être amplifiée par la participation de l'ensemble des effecteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative pour aboutir à la destruction des tissus du receveur entraînant, selon la localisation de la réaction, des diarrhées sévères, des lésions cutanées, des dysfonctionnements d'organe (foie, poumon, ...) (**Figure 3**) (*Ghimire et al., 2017*).

Le développement de la GvH va notamment dépendre de l'importance d'appariement entre le receveur et le donneur, tant au niveau des complexes majeurs d'histocompatibilité que des antigènes mineurs (*Ghimire et al., 2017*). La GvH représente ainsi une cause majeure de morbi-mortalité, de mauvaise qualité de vie et de surcoût économique, du fait notamment des thérapeutiques onéreuses pour la traiter et de la majoration du temps d'hospitalisation des patients. Certes toxique, la GvH est pourtant nécessaire car associée à l'effet GvL attendu du greffon. Notons également que près de la moitié des patients traités pour une leucémie aiguë myéloïde va rechuter, notamment suite à une perte d'efficacité du greffon (*Rautenberg et al., 2019*).

2) Les cellules CAR-T

Un autre modèle de thérapie cellulaire, celui-ci de développement plus récent, est celui des cellules CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor-T*) considérées comme une révolution en matière d'immunothérapie. Il s'agit de lymphocytes T autologues prélevés chez le patient et modifiés *ex vivo* pour exprimer un récepteur antigénique chimérique (CAR) spécifique d'un antigène tumoral d'intérêt. Un des mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire est celui de la diminution d'expression des molécules de CMH de classe I à la surface des cellules tumorales, les rendant ainsi moins identifiables par les lymphocytes T cytotoxiques.

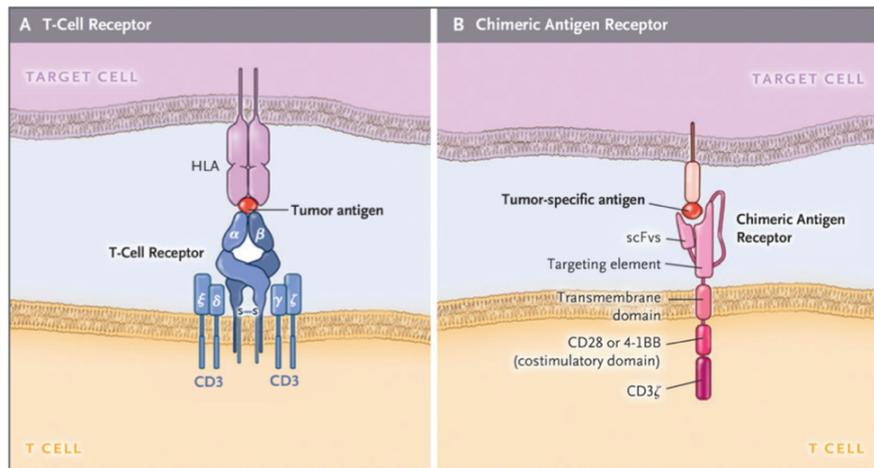


Figure 4. Différences structurales et fonctionnelles entre un TCR classique et un CAR. **A.** TCR classique constitué d'un hétérodimère spécifique de l'antigène avec une chaîne α et une chaîne β , associées aux chaînes invariables ϵ , δ , γ , ζ du complexe CD3. L'antigène tumoral n'est reconnu que s'il est présenté au TCR par une molécule de CMH (ou HLA). **B.** CAR constitué d'un fragment d'anticorps reconnaissant directement l'antigène tumoral sans présentation par le système HLA, entraînant l'activation de la cellule CAR-T grâce aux domaines de signalisation CD3 ζ et de costimulation (CD28 ou 4-1BB) (d'après June et Sadelain, 2018).

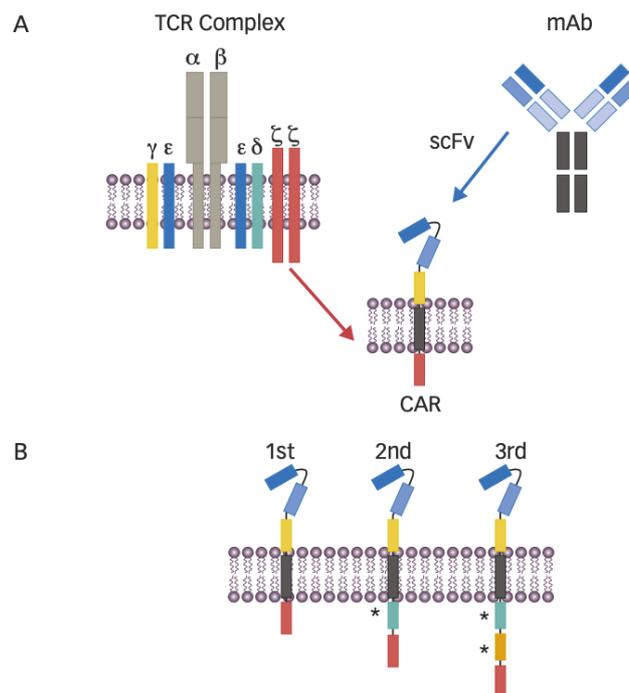


Figure 5. Structure d'un CAR (Chimeric Antigen Receptor). **A.** Le CAR est composé schématiquement d'un domaine extra-cellulaire de fixation de l'antigène correspondant au fragment variable scFv dérivé d'un anticorps spécifique de l'antigène cible, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine de signalisation intra-cellulaire de type CD3 ζ . **B.** Plusieurs générations de CAR se sont succédées ces dernières années, suite à l'ajout d'un ou de plusieurs domaines de co-stimulation (d'après Fesnak et al., 2017).

De ce constat est née l'idée de modifier le récepteur des cellules T (TCR) pour qu'il puisse reconnaître directement sa cible antigénique tumorale sans avoir à passer par une présentation par le CMH (**Figure 4**) (*June et Sadelain, 2018*). Ce récepteur antigénique chimérique est ainsi composé (i) d'un domaine extra-cellulaire de fixation de l'antigène (correspondant au fragment variable scFv dérivé d'un anticorps spécifique de l'antigène cible), (ii) de domaines de signalisation intra-cellulaire propres au TCR, et (iii) de domaines de costimulation (**Figure 5**) (*Fesnak et al., 2017*).

Ce CAR est intégré *ex vivo*, le plus souvent par technique de transduction rétrovirale ou lentivirale, dans les lymphocytes T préalablement activés du patient, qui vont ensuite être cultivés pour obtenir une expansion optimale. Ces lymphocytes sont ensuite réinjectés au patient après que ce dernier ait reçu une chimiothérapie lymphodéplétive afin que son système immunitaire soit tolérant vis-à-vis des lymphocytes T modifiés (**Figure 6**) (*Fesnak et al., 2017*).

Les cellules CAR-T seront alors capables de s'auto-activer lors de la reconnaissance de leur antigène cible, et pourront détruire directement la cellule tumorale portant cet antigène à sa surface. La libération d'antigènes tumoraux suite à la lyse des cellules tumorales, et de divers cytokines pro-inflammatoires par les cellules CAR-T pourront d'une part stimuler la prolifération des cellules CAR-T, et d'autre part stimuler la réponse immunitaire endogène du patient, permettant ainsi d'amplifier la réaction anti-tumorale (**Figure 7**) (*June et Sadelain, 2018*).

La reconnaissance de l'antigène par le CAR-T étant non restreinte à la présentation par le CMH, cette stratégie offre la possibilité de cibler une multitude d'antigènes tumoraux différents, à condition qu'il s'agisse d'antigènes de surface. La principale difficulté reste d'identifier un antigène spécifique de la tumeur, et donc non exprimé par les cellules et tissus sains, pour éviter la toxicité liée aux effets *On-target* mais *Off-tumor*, c'est-à-dire les effets liés au fait que la

Figure 6. Procédure de production des cellules CAR-T et de réinjection au patient. Les lymphocytes T du patient sont prélevés par cytophérèse puis activés par un système de billes magnétiques couplées à des anticorps. La construction génétique du CAR est ensuite intégrée *in vitro* dans les LT du patient, le plus souvent par technique de transduction rétrovirale ou lentivirale. Les cellules T modifiées sont ensuite mises en culture pour expansion, puis sont réinjectées au patient après que ce dernier ait reçu une chimiothérapie lymphodéplétive afin que son système immunitaire soit tolérant vis-à-vis des lymphocytes T modifiés (d'après Fesnak et al., 2017).

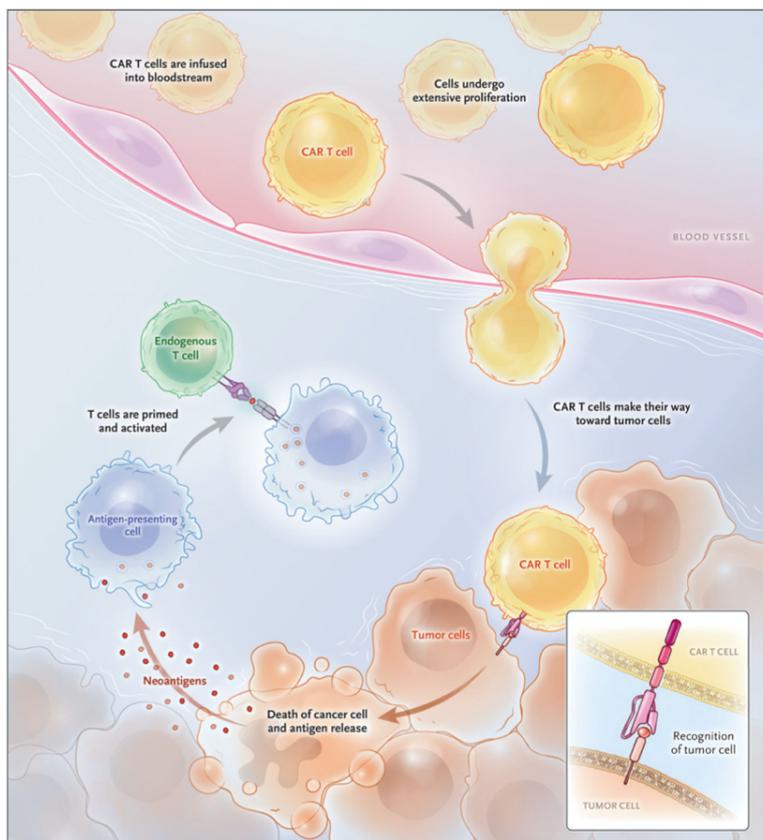
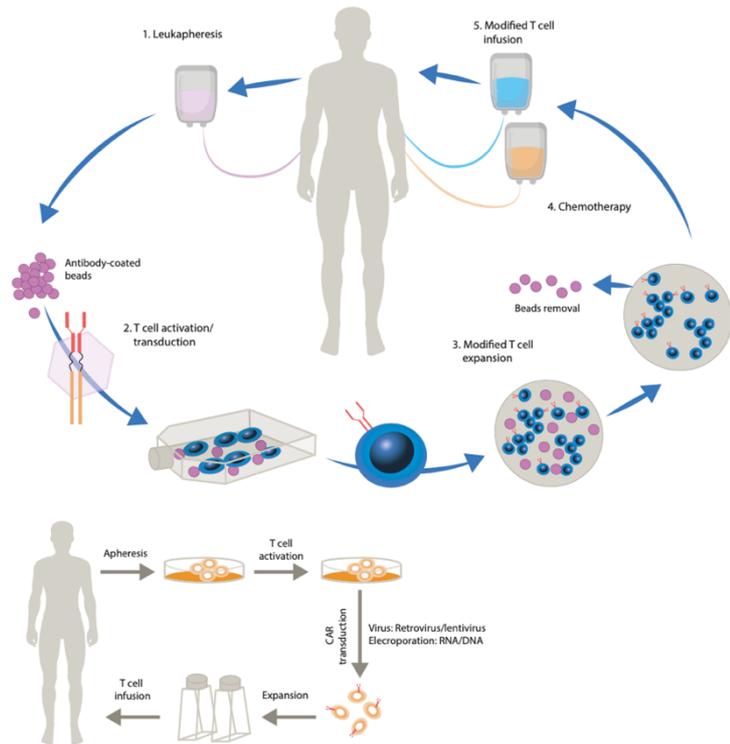


Figure 7. Mécanisme d'action de la cellule CAR-T après injection au patient. Suite à la reconnaissance de leur antigène cible porté par les cellules tumorales, les cellules CAR-T sont capables de s'auto-activer, et détruisent directement la cellule tumorale portant cet antigène. Cette lyse tumorale aboutit à la libération d'antigènes tumoraux et de divers cytokines pro-inflammatoires, entraînant une stimulation de la prolifération des cellules CAR-T, mais aussi de la réponse immunitaire endogène du patient, permettant ainsi d'amplifier la réaction anti-tumorale (d'après June et Sadelain, 2018).

cellule CAR-T reconnaît bien son antigène cible (*On-target*) mais que cet antigène soit porté par un autre tissu ou une autre cellule que la cellule tumorale (*Off-tumor*). Les toxicités les plus fréquentes, liées à des effets *On-target/On* ou *Off-tumor* sont la neurotoxicité, le syndrome de lyse tumorale, ou encore le syndrome de relargage cytokinique (CRS *Cytokine Release Syndrom*), pouvant parfois engager le pronostic vital du patient (*Fesnak et al., 2017*). Les CAR-T anti-CD19 sont les premiers à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché depuis quelques années dans le cadre du traitement de leucémies aiguës lymphoblastiques B ou de lymphomes B diffus à grandes cellules, en rechute ou réfractaires aux traitements classiques de chimiothérapie, avec des taux de réponse qui n'avaient encore jamais été atteints chez ce type de patients (*Voynova et al., 2021*). Le développement global des cellules CAR-T est en plein essor, y compris pour le traitement des tumeurs solides (*Ma et al., 2019*). Cependant, cette solution thérapeutique novatrice présente des points d'amélioration, notamment en termes d'efficacité. En effet, des rechutes sont fréquemment constatées du fait entre autres de la perte d'expression de l'antigène cible par la tumeur, ou encore suite au développement d'un micro-environnement tumoral immunosuppresseur pour les CAR-T (*Sterner et Sterner, 2021*). Un autre phénomène responsable de rechute est celui de l'exhaustion de la cellule CAR-T, qui devient alors hypo réactive et donc incompétente face aux cellules tumorales (*Delgoffe et al., 2021*).

Le lymphocyte T étant l'acteur clé de l'efficacité, de l'échec ou encore de la toxicité des modèles d'immunothérapie cellulaire précédemment décrit, le paragraphe suivant traitera plus en détail de ce type cellulaire.

IV. Le lymphocyte T, acteur clé dans les stratégies d'immunothérapie cellulaire

1) Généralités

Les lymphocytes T (LT) sont des cellules de l'immunité adaptative, avec deux principaux types cellulaires définis selon l'expression des marqueurs de surface CD4 et CD8. Les LT CD4⁺ sont dits auxiliaires ou helpers (T_H) car ils sont capables de produire des cytokines qui modulent la réponse immunitaire. Les LT CD8⁺ sont dits cytotoxiques car ils sont capables de tuer directement les cellules infectées ou malignes suite à la production de cytokines inflammatoires ou de molécules lytiques telles que les granzymes ou la perforine.

La maturation des LT a lieu dans le thymus. Ils sont tout d'abord qualifiés de « double négatifs » car n'expriment ni le CD4 ni le CD8, puis ils expriment les deux marqueurs et deviennent ainsi « double positifs ». Une phase de sélection positive permet ensuite de différencier les LT CD8⁺, dont le TCR reconnaît les molécules de CMH de classe I, des LT CD4⁺ dont le TCR reconnaît les molécules de CMH de classe II. Les LT qui ne reconnaissent pas de molécules de CMH sont éliminés. Une seconde étape de sélection, dite « négative » permet l'apoptose des cellules ayant trop d'affinité pour les antigènes du soi.

Une fois matures, les LT rejoignent les organes lymphoïdes secondaires où ils restent à l'état naïf dans l'attente d'être en contact avec leur antigène cible. Ils circulent en permanence au sein de ces organes lymphoïdes afin d'interagir avec des cellules présentatrices d'antigène (CPA) (principalement des cellules dendritiques) qui ont capté des peptides antigéniques dans les tissus périphériques. Ces CPA présentent alors ces peptides, à la surface de leur CMH de classe I aux LT CD8⁺, ou à la surface de leur CMH de classe II aux LT CD4⁺. Une fois activés, les LT pourront alors rejoindre le site infecté ou tumoral (*Galaine et al., 2016*).

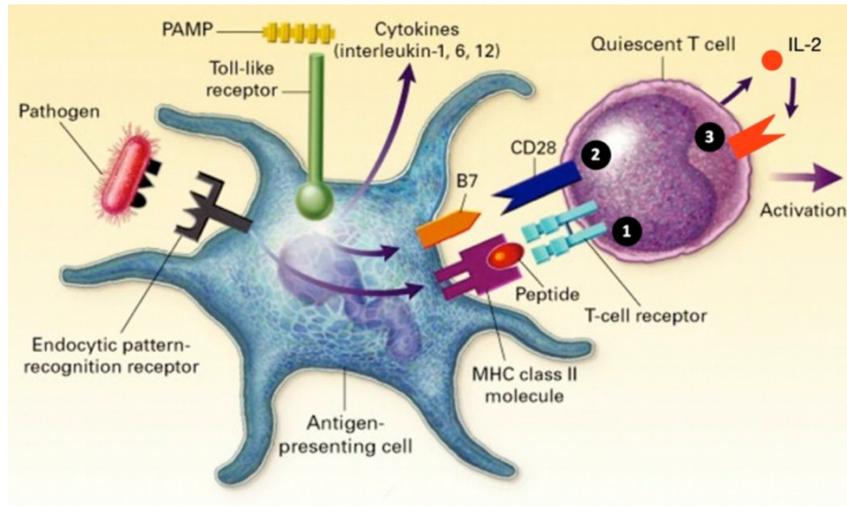


Figure 8. Signaux d'activation du lymphocyte T par une cellule présentatrice d'antigène. Le signal 1 correspond à l'interaction entre le complexe CMH/peptide et le TCR. Le signal 2 implique l'interaction de molécules de costimulation situées à la surface des CPA activées avec le récepteur CD28 exprimé par le LT. Le signal 3 correspond au signal des cytokines permettant ainsi une activation optimale du LT (d'après une présentation de Frederic Vely).

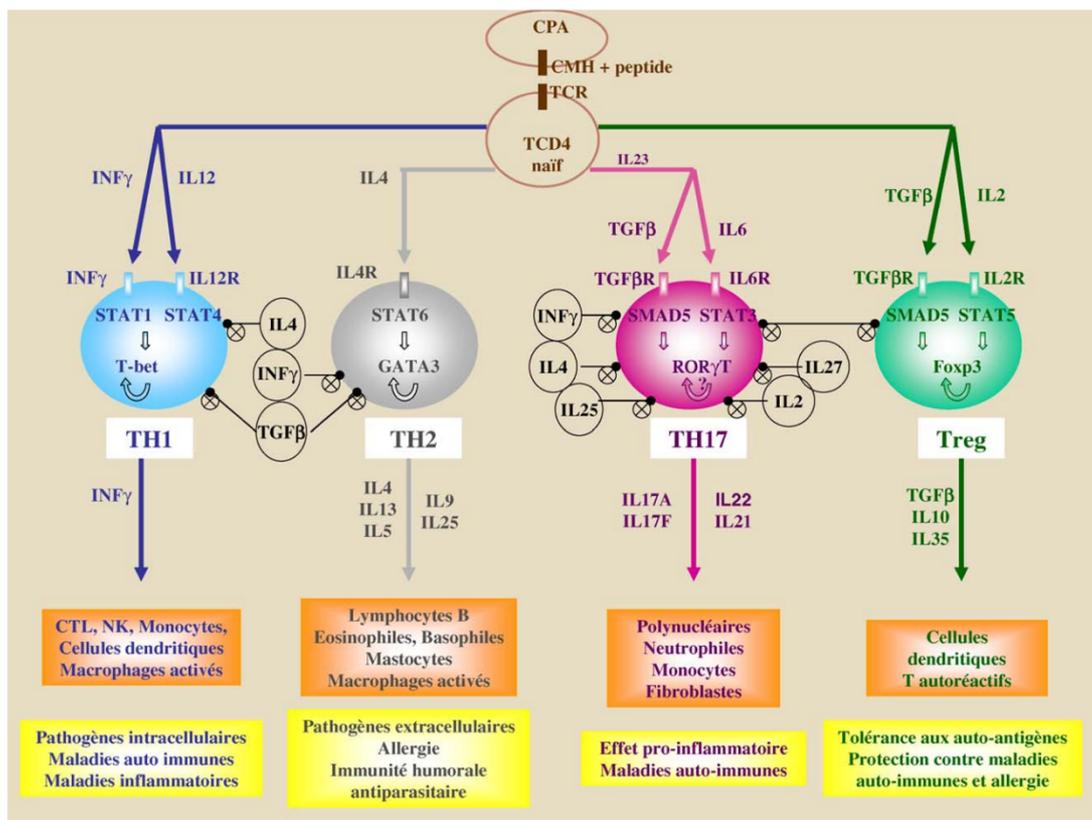


Figure 9. Les différents sous-types de lymphocytes T CD4+. Après avoir reçu les signaux 1 et 2 d'activation, le lymphocyte T CD4+ naïf va, sous l'influence de différentes cytokines, se différencier en l'une des quatre sous-populations de lymphocytes T CD4+ : TH1, TH2, TH17 ou Treg. Une fois différencié, il sécrètera des cytokines spécifiques visant à stimuler d'autres cellules immunes, dans l'objectif d'avoir une réponse immunitaire la plus adaptée possible à la situation. Les Tregs eux sécrèteront plutôt des cytokines anti-inflammatoires visant à induire une tolérance immunitaire (d'après Essakalli et al., 2010).

2) Activités des lymphocytes T

Les signaux indispensables à l'activation du lymphocyte T

L'activation des LT nécessite impérativement trois signaux. Le premier signal correspond à l'interaction entre le complexe CMH/peptide et le TCR. Le deuxième signal implique l'interaction de molécules de costimulation situées à la surface des CPA activées (notamment CD80 ou CD86) avec le récepteur CD28 exprimé par le LT. Le dernier signal correspond à la production de cytokines permettant ainsi une activation optimale du LT (**Figure 8**).

Activités des lymphocytes T CD4+

Une fois activés, les LT CD4+ vont proliférer, produire des cytokines et se différencier afin d'amplifier la réponse immunitaire la plus adaptée à la situation. Cette différenciation va dépendre du type de cytokines présentes au moment de l'activation du LT par son antigène (**Figure 9**) (*Essakalli et al., 2010*).

- Différenciation T_{H1} : la présence d'interféron- γ ou d'IL-12 orientera plutôt le CD4 vers une différenciation de type T_{H1}, suite à l'activation des voies STAT1 et STAT4 et du facteur de transcription T-bet. Les lymphocytes T_{H1} sécrètent principalement de l'IFN- γ , stimulant ainsi les LT CD8+, les cellules NK, ou les cellules phagocytaires, afin de lutter contre les pathogènes intra-cellulaires. Ils jouent un rôle notable dans les maladies auto-immunes et inflammatoires. Ils sont régulés négativement par l'IL-4 et le TGF- β .
- Différenciation T_{H2} : la présence d'IL-4 orientera plutôt le CD4 vers une différenciation de type T_{H2}, suite à l'activation de la voie STAT6 et du facteur de transcription GATA3. Les lymphocytes T_{H2} sécrètent entre autres de l'IL-4 et de l'IL-5, stimulant ainsi les lymphocytes B, les éosinophiles, les basophiles, les mastocytes et les macrophages activés. Ils jouent un rôle notable dans la lutte contre les pathogènes extracellulaires, dans l'allergie et dans l'immunité humorale antiparasitaire.

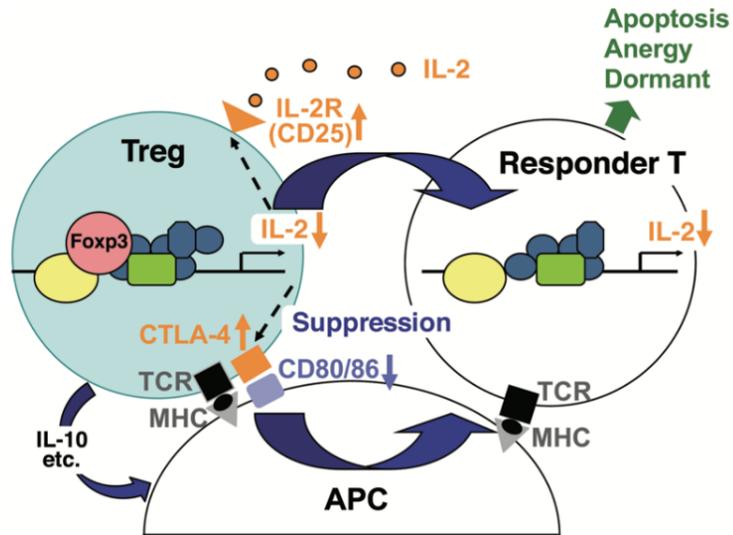


Figure 10. Mécanismes d'action des Tregs. Les Tregs expriment fortement le récepteur à l'IL-2, privant ainsi les autres lymphocytes T de cette cytokine indispensable pour leur activation. Ils expriment également du CTLA-4 qui inhibe l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 par les cellules présentatrices d'antigène. Ils sécrètent également des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10. Les lymphocytes T environnant vont ainsi par absence des molécules de costimulation et d'IL-2, entrer en apoptose, devenir anergique ou devenir dormant (*d'après Tanaka et Sakaguchi, 2017*).

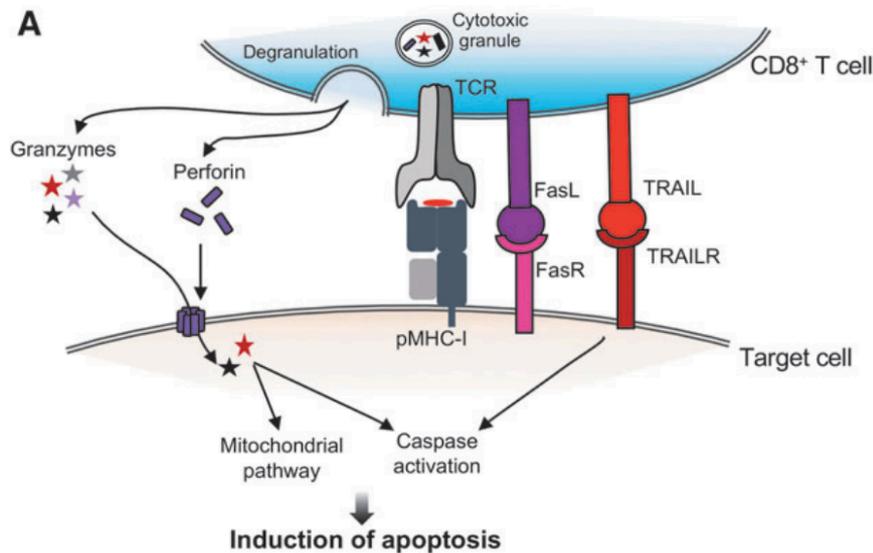


Figure 11. Mécanismes d'action des lymphocytes T CD8+. Le LT CD8+ activé sécrète des granules cytotoxiques de types perforine et granzymes. La perforine forme des pores dans la membrane des cellules cibles, permettant ainsi aux granzymes d'entrer dans le cytosol où ils induisent une apoptose par voie mitochondriale ou par la voie des caspases, qui peut être également induite par interaction du ligand FasL ou de TRAIL avec leur récepteur spécifique présent à la surface des cellules cibles (*d'après Kedzierska et Koutsakov, 2020*).

- Différenciation T_H17 : la présence d'IL-6 et de TGF- β orientera plutôt le CD4 vers une différenciation de type T_H17 , suite à l'activation des voie STAT3 et SMAD5, et du facteur de transcription ROR- γ t. Les lymphocytes T_H17 sécrètent de l'IL-17, de l'IL-21 et de l'IL-22, stimulant ainsi les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les fibroblastes. Ils jouent un rôle pro-inflammatoire dans les maladies auto-immunes. Ils sont régulés négativement par l'INF- γ , l'IL-4, l'IL-25, l'IL-2, l'IL-27 et par les lymphocytes T régulateurs (Treg).
- Différenciation Treg: la présence de TGF- β et d'IL-2 orientera plutôt le CD4 vers une différenciation de type Treg, suite à l'activation des voie STAT5 et SMAD5, et du facteur de transcription FoxP3. Les lymphocytes Treg sécrètent du TGF- β , de l'IL-10, et de l'IL-35, freinant ainsi les cellules dendritiques et les LT auto-réactifs. Ils interviennent dans la tolérance aux auto-antigènes, mais aussi dans la protection des maladies inflammatoires, des maladies auto-immunes et dans l'allergie. Ils représentent cependant également un mécanisme d'échappement supplémentaire de la tumeur au système immunitaire qui va donc favoriser leur expansion au détriment des autres sous types de LT CD4+. Ils sont régulés négativement par les lymphocytes T_H17 (**Figure 10**) (Zhu *et al.*, 2010 ; Essakalli *et al.*, 2010 ; Tanaka *et Sakaguchi*, 2017).

Activités des lymphocytes T CD8+

Le LT CD8+ activé va lui avoir comme rôle principal de tuer les cellules infectées ou malignes. Pour cela, il va sécréter des cytokines inflammatoires de types TNF- α et IFN- γ , mais aussi des granules cytotoxiques de types perforine et granzymes (**Figure 11**). La perforine formera des pores dans la membrane des cellules cibles, permettant ainsi aux granzymes d'entrer dans la cellule et d'entraîner une apoptose cellulaire. Le LT CD8+ exprime également à sa surface le ligand FasL, qui en interagissant avec le récepteur Fas présent à la surface des cellules cibles

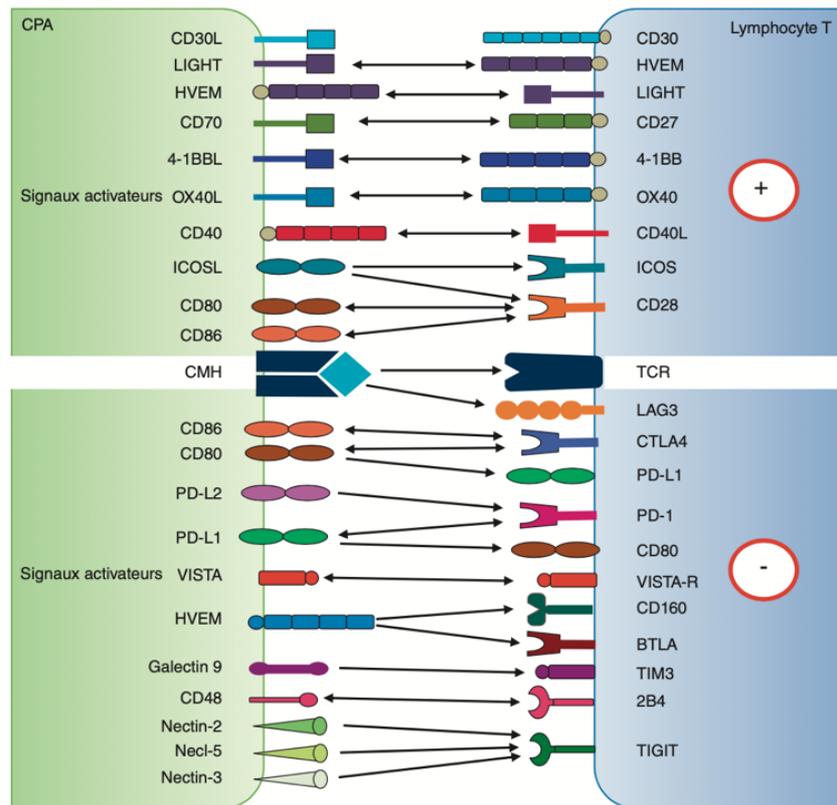


Figure 12. « Immune checkpoint » pour la régulation du lymphocyte T. L'activation des LT est finement régulée par des signaux activateurs (+) et inhibiteurs (-). La liaison des récepteurs activateurs à leur(s) ligand(s) stimule les LT (capacité de sécrétion cytokinique, différenciation, capacité cytotoxique, mise en place d'une mémoire immunitaire et survie). La liaison des récepteurs inhibiteurs à leur(s) ligand(s) inhibe le cycle cellulaire et les fonctions effectrices des LT, induit des LT tolérogènes et entraîne l'exhaustion des LT et leur apoptose (d'après Galaine et al., 2016).

entraîne l'activation de la voie des caspases et donc l'induction de l'apoptose de la cellule (Kedzierska et Koutsakov, 2020).

Régulation du lymphocyte T

L'activité du LT est finement régulée afin d'éviter tout emballement du système immunitaire. Ainsi, des récepteurs inhibiteurs sont exprimés par le LT, et la fixation de leur ligand spécifique entraîne un frein immunologique. De nombreux points de contrôle immunitaire existe, les plus connus étant le récepteur PD-1 et ses ligands PD-L1 et PD-L2, ou bien le CTLA-4 et ses ligands CD80 et CD86. La sécrétion de ces ligands inhibiteurs fait d'ailleurs partie des stratégies mises en place par les cellules tumorales pour échapper au système immunitaire, d'où le développement pharmaceutique d'inhibiteurs de ces points de contrôle immunitaire (**Figure 12**) (Galaine et al., 2016).

3) Métabolisme des lymphocytes T

Impact de l'activation du lymphocyte T sur son métabolisme général

Alors que l'activité métabolique du LT naïf est relativement faible, celle du LT activé par son antigène augmente considérablement. Les modifications métaboliques du lymphocyte T activé sont d'ailleurs parfois comparées à celles observées dans les cellules tumorales, puisque leurs besoins sont identiques, à savoir grandir et proliférer rapidement. Les cellules T activées vont ainsi passer d'un métabolisme de phosphorylation oxydative à un métabolisme de glycolyse aérobie. Elles vont également majorer l'oxydation de la glutamine et réduire l'oxydation des lipides, afin de favoriser la biosynthèse de précurseurs nécessaires à leur croissance et à leur prolifération (membranes lipidiques, acides nucléiques, protéines, ...) au détriment de leur production d'énergie. L'oxydation des lipides visant à produire de l'ATP est ainsi réduite pour privilégier la synthèse de lipides destinés aux membranes, suite à une réduction de l'activité des récepteurs nucléaires LXRs (*Liver X Receptors*) qui régulent l'homéostasie du cholestérol et

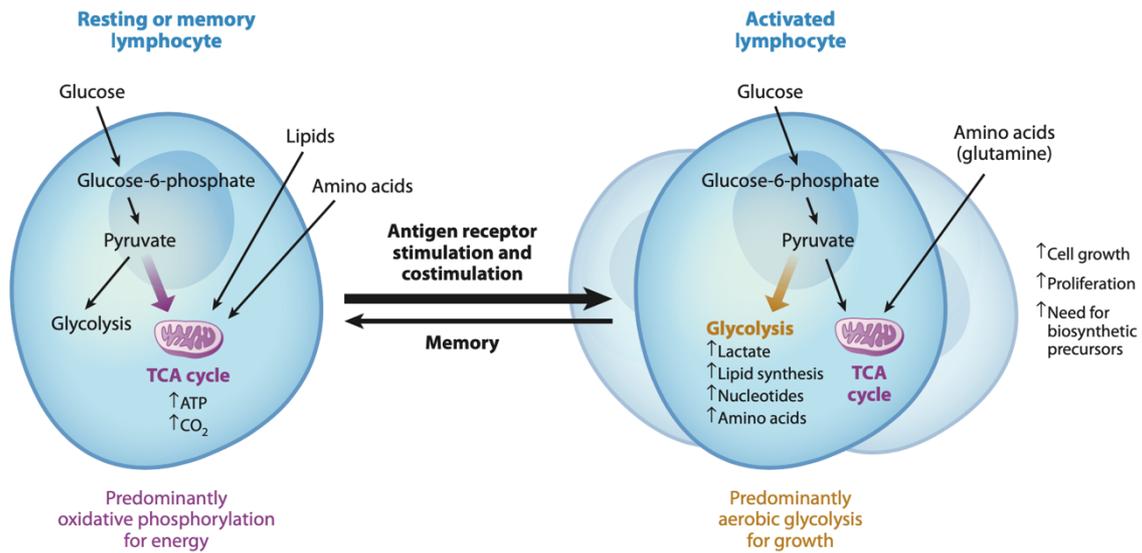


Figure 13. Métabolisme des lymphocytes T naïfs et activés. Les LT naïfs ou mémoires présente une activité métabolique faible, et oxydent le pyruvate dérivé du glucose ainsi que les lipides et les acides aminés dans le but de produire l'énergie nécessaire pour la surveillance immune. Les LT activés changent radicalement de métabolisme en privilégiant la glycolyse aérobie et l'oxydation de la glutamine dans le but de synthétiser les précurseurs nécessaires à leur croissance et à leur prolifération (d'après McIver et al., 2013).

des lipides, et d'une augmentation d'activité de la voie SREBP-2 (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2*) (Bensinger et al., 2008).

De nombreuses voies de signalisation anaboliques voient leur activité augmenter en cas de réponse immune afin de supporter la croissance cellulaire et la prolifération nécessaires à la réponse immune. Parmi ces voies, celle de PI3K/Akt/mTOR joue un rôle majeur dans la reprogrammation métabolique du lymphocyte T. Elle est activée suite à la liaison des molécules de costimulation au récepteur CD28 du LT, ce qui aboutit *in fine* à l'activation du complexe mTORC1 qui, avec Akt, favorise la glycolyse aérobie. Akt stimule le transfert du transporteur du glucose GLUT1 à la surface de la cellule et prévient son internalisation, et phosphoryle par ailleurs certaines enzymes de la glycolyse. Les principaux effets sur la glycolyse de mTORC1 sont médiés par une de ses cibles, la kinase p70S6K. mTORC1 est indispensable pour la reprogrammation métabolique du LT activé puisque son inhibiteur pharmacologique, la rapamycine, bloque la glycolyse du LT, le rendant ainsi anergique. Le complexe mTORC1 stimule par ailleurs la synthèse des lipides par activation de SREBP-2 (McIver et al., 2013).

Chaque sous-type de LT possède un profil métabolique spécifique lorsqu'il est activé. Par exemple, les LT inflammatoires (T_H1, T_H2 et T_H17) ont plutôt une activité glycolytique, alors que les Treg utilisent plutôt un métabolisme oxydatif mitochondrial. Une fois la réponse immune achevée, la mémoire immunitaire se met en place avec des LT mémoire qui ont un profil métabolique proche de celui des LT naïfs, à savoir un métabolisme plutôt dépendant de l'activité mitochondriale et de l'oxydation des lipides (**Figure 13**) (Kishton et al., 2017, McIver et al., 2013).

Les transporteurs membranaires

En cas de réponse immune, la captation du glucose et son métabolisme augmentent fortement, entraînant ainsi une augmentation rapide de l'expression de son transporteur GLUT1. La disponibilité en glucose conditionne d'ailleurs la production optimale de cytokines (McIver et

al., 2013 ; *Cham et Gajewski*, 2005). Cette induction d'expression de GLUT1 est en partie régulée au niveau transcriptionnel par c-Myc, facteur de transcription oncogénique induit lors de l'activation du lymphocyte T. c-Myc apparaît comme indispensable pour la reprogrammation métabolique de la cellule T activée, en particulier pour la glutaminolyse, puisqu'il contrôle également l'expression de plusieurs transporteurs de la glutamine (*Slc3a2*, *Slc5a1* et *Slc7a1*) et des glutaminases 1 et 2 (*Gls1* et *Gls2*) (*Wang et al.*, 2011).

La mise en place d'une réponse immune implique l'activation, la prolifération, la différenciation des lymphocytes T, ainsi que la sécrétion de quantité importante de cytokines, engendrant une consommation accrue en acides aminés. L'activation de la cellule T s'accompagne par exemple d'une augmentation de l'expression de LAT1 (*Slc7a5*), transporteur majeur des acides aminés essentiels et en particulier de la leucine, en association avec une augmentation d'expression d'AP-1 (*Activator Protein-1*) et de NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*), suggérant que LAT1 est nécessaire pour l'activation complète du LT. L'inhibition de ce transporteur, entraînant un déficit d'import en AA, est d'ailleurs responsable d'une diminution de la réponse cytokinique suite à une réduction de l'activité de NF- κ B et de NFAT (*Hayashi et al.*, 2013). Les cellules T invalidées pour *Slc7a5* ne répondent par ailleurs pas à leur antigène et ne peuvent proliférer du fait d'une incapacité à activer mTORC1 et à induire l'expression de c-Myc, inhibant ainsi leur capacité à induire la glycolyse et la glutaminolyse indispensables pour la réponse immune. L'activation du LT s'accompagne également d'une surexpression des transporteurs de la glutamine SNAT1 (*Slc38a1*) et SNAT2 (*Slc38a1*), permettant une captation rapide de la glutamine, qui pourra persister dans le temps grâce à l'expression d'ASCT2. LAT1 et ASCT2 jouent également un rôle majeur dans la régulation de la différenciation des LT CD4⁺ de type T_H1 et T_H17 (*Ren et al.*, 2017). De manière générale, la disponibilité en AA conditionne le bon fonctionnement des LT en cas de réponse immune, notamment parce que le complexe

mTORC1, acteur clé, est inhibé en cas de carence en AA, en particulier en cas de carence en leucine ou en glutamine (*Walls et al., 2016*).

L'autophagie

La macroautophagie est un mécanisme indispensable pour préserver l'homéostasie cellulaire en maintenant l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines. Ce mécanisme est essentiel pour limiter l'accumulation de protéines endommagées dans la cellule, qui peuvent altérer les processus cellulaires potentiellement nécessaires en cas de stress, mais aussi pour maintenir l'homéostasie des acides aminés et l'homéostasie énergétique de la cellule. Les lymphocytes T utilisent la macroautophagie au cours de leur développement pour réguler le *turnover* mitochondrial, mais ce mécanisme est également induit précocement en cas d'activation par un antigène. La macroautophagie apparaît d'ailleurs indispensable à l'activation du LT puisque son blocage inhibe la production d'énergie ATP, ainsi que la prolifération cellulaire T et la production de cytokines (*Hubbard et al., 2010*).

4) Lymphocytes T et immunothérapie cellulaire

Les lymphocytes T jouent donc un rôle majeur dans les stratégies d'immunothérapie cellulaire. Ils sont responsables de l'effet GvL attendu dans le cadre de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, mais sont à la fois responsables de l'effet toxique de GvH. Ils sont également l'acteur central dans le modèle des cellules CAR-T, dans lequel l'intégration génétique d'un récepteur modifié leur confère un rôle anti-tumoral amplifié, mais également une capacité de toxicité parfois létale, avec une persistance de l'efficacité parfois très restreinte. Il existe à ce jour de nombreuses difficultés à contrôler ces cellules T une fois réinjectées au malade. Pourtant, pouvoir contrôler ces cellules dans un but de majoration de leur action thérapeutique, ou bien de limitation de leur toxicité serait particulièrement intéressant, d'autant qu'il s'agit de

thérapeutiques très coûteuses et logistiquement complexes à organiser. L'idée de pouvoir apporter un système de régulation intégré en amont dans les lymphocytes T avant injection au patient, qui soit facilement inductible et modulable, afin de maîtriser le plus simplement possible les effets de ces cellules, paraît donc très séduisante.

Cette régulation pourrait être apportée par la technologie NUTRIREG, qui a justement été développée dans le but d'offrir une régulation de l'expression d'un gène, de manière souple et réversible. Cette technologie utilise les propriétés de la voie de signalisation GCN2-ATF4, qui est une voie de réponse au stress induit par une carence en un acide aminé indispensable, et que nous allons décrire dans le chapitre suivant.

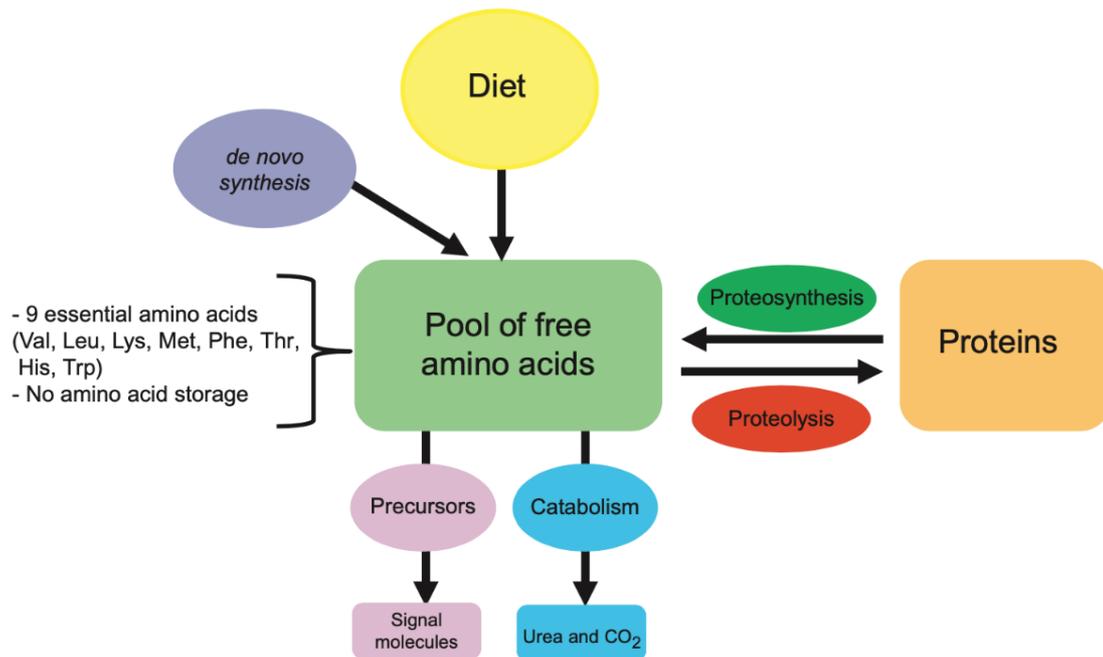


Figure 14. Régulation de l'homéostasie des acides aminés et des protéines chez l'Homme. Le pool d'acides aminés libres dépend de l'apport en protéines alimentaires et de la synthèse d'acides aminés *de novo*, de la synthèse et de la dégradation des protéines, et de l'oxydation des acides aminés ou de leur utilisation pour la synthèse de molécules signal (*d'après Averous et al., 2016*).

CHAPITRE III. LA VOIE DE SIGNALISATION GCN2-ATF4

I. L'homéostasie des acides aminés

Il existe dans la nature plusieurs centaines d'acides aminés (AA), mais seulement 20 sont capables de se fixer sur les ARN de transfert (ARNt) et donc de participer à la synthèse des protéines. Parmi ces 20 AA, neuf sont dits indispensables (AAI) pour l'Homme, car ils ne peuvent être synthétisés *de novo* par l'organisme, et doivent obligatoirement être apportés par l'alimentation. Il s'agit de la valine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, l'histidine et le tryptophane. D'autres acides aminés sont dits conditionnellement indispensables car ils peuvent être synthétisés dans certaines conditions physiologiques ou physiopathologiques, mais en quantité insuffisante pour couvrir l'ensemble des besoins.

Après un repas, les acides aminés passent dans la circulation mésentérique avant d'être déversés dans la veine porte pour rejoindre le foie puis la circulation périphérique. Les concentrations sanguines en acides aminés peuvent ainsi varier selon la composition en acides aminés du repas (Fafournoux *et al.*, 1990). Le pool d'acides aminés libres d'un organisme dépend de la balance entre les apports en AA (par l'alimentation, la synthèse *de novo* pour les AA non indispensables, et la dégradation protéique) et leur utilisation pour la protéosynthèse ou en tant que précurseurs, et leur dégradation (**Figure 14**) (Averous *et al.*, 2016). Lorsque la proportion de l'un de ces mécanismes varie, l'organisme module les autres flux afin de répondre à ses besoins. Or, contrairement aux autres nutriments comme les lipides et les glucides, il n'existe pas de système de stockage propre pour les acides aminés. Ainsi, si l'un des acides aminés indispensables vient à manquer dans l'alimentation, il sera alors fourni par dégradation des protéines, au niveau par exemple du foie, des muscles ou de l'intestin. Cette situation ne peut donc être permanente.

II. Situations de déséquilibre en acides aminés

Un déséquilibre du pool d'acides aminés libres peut avoir des conséquences néfastes et peut se rencontrer dans de nombreuses situations, en particulier dans les situations de malnutrition ou d'agressions diverses.

1) En cas de sous-nutrition protéique

Chez l'Homme, la sous-nutrition protéino-énergétique correspond à un état prolongé d'apport alimentaire insuffisant en protéine. Cette situation est principalement retrouvée dans les pays pauvres, avec des formes parfois graves de marasme ou de kwashiorkor, responsables d'un retard de croissance, d'une perte musculaire, de troubles digestifs et psychomoteurs, et d'immunodéficience (*Jahoor et al., 2008*). On observe alors une forte diminution de la concentration plasmatique de la plupart des acides aminés indispensables. Par exemple, la concentration plasmatique en leucine chez un sujet sain est de l'ordre de 100 à 200 μM et peut descendre jusqu'à 17 μM chez les enfants dénutris (*Baertl et al., 1974*). Cette baisse de concentration en acides aminés circulants entraîne en particulier une surexpression de la protéine IGFBP1, capable d'inhiber certains facteurs de croissance tels que IGF-I et IGF-II (*Insulin Growth Factor 1/2*), inhibant ainsi leurs effets trophiques et métaboliques et contribuant au retard de croissance observé chez ces jeunes enfants (*Jousse et al., 1998*).

2) En cas de consommation d'un régime carencé en acides aminés

A la différence de la sous-nutrition protéino-énergétique, le régime déséquilibré en acides aminés n'impacte pas l'apport calorique, et la déplétion plasmatique ne concerne alors qu'un seul acide aminé ou une seule famille d'acides aminées. A titre d'exemple, les omnivores vivant en milieu naturel sont souvent confrontés à des situations où ils n'ont accès qu'à une seule source de protéines, qui peut très souvent être carencée en un AAI. Certaines céréales comme

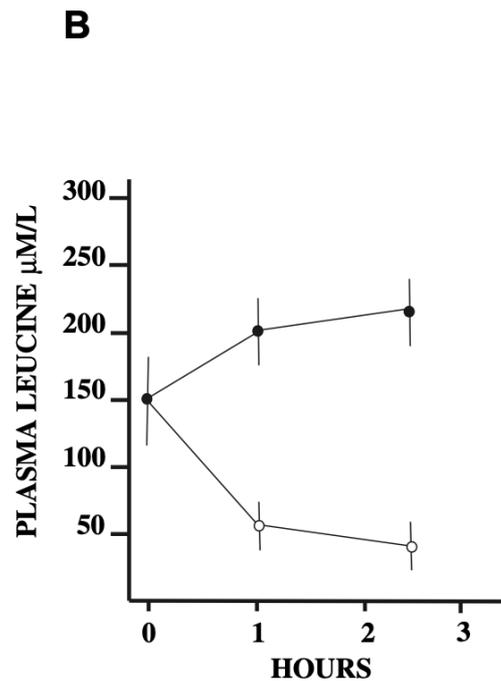
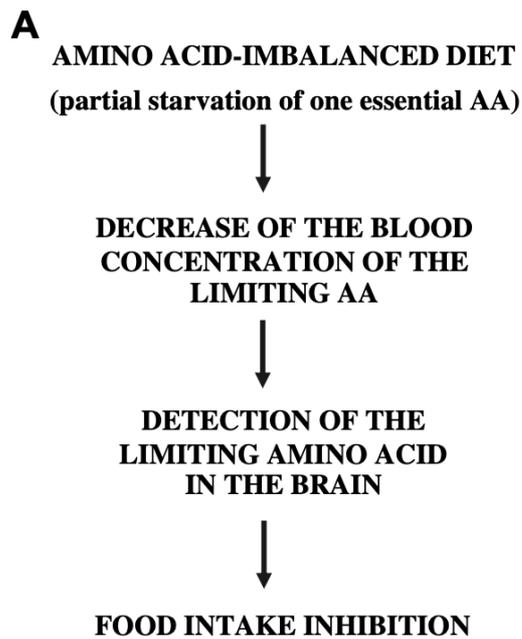


Figure 15. Conséquence de la consommation d'un régime déséquilibré en acide aminé chez la souris. **A.** La consommation d'un régime déséquilibré en acide aminé entraîne une diminution rapide et drastique de la concentration plasmatique en leucine, ce qui est rapidement détecté au niveau cérébral, entraînant ainsi une inhibition de la prise alimentaire. **B.** Évolution de la concentration plasmatique en leucine chez une souris consommant un régime carencé en leucine (6g de leucine / kg de nourriture - cercles blancs) versus une souris consommant un régime complet (19g de leucine / kg de nourriture - cercles noirs) (*d'après Chaveroux et al., 2010*).

le blé, le maïs ou le riz sont partiellement dépourvus en lysine, alors que les légumineuses présentent une quantité insuffisante de méthionine (lentilles, haricots secs, pois chiches) (Ferreira et al., 2005 ; Shekib, 1994). Les besoins nutritionnels ne peuvent ainsi pas être couverts par ces seuls aliments. De plus, les acides aminés circulants vont stimuler la protéosynthèse après un repas, notamment au niveau du muscle, augmentant le captage des acides aminés sanguins et aggravant ainsi la carence induite par la consommation du régime déséquilibré. La consommation d'un régime carencé en un AAI va donc entraîner une diminution rapide et drastique de la concentration plasmatique de cet AAI, ce qui va être rapidement détecté au niveau cellulaire, et notamment au niveau hypothalamique. Ceci conduira à une inhibition de la prise alimentaire et la mise en place d'une aversion de l'animal pour ce régime afin qu'il cherche à consommer une autre source de protéine (**Figure 15**) (Maurin et al., 2005 ; Chaveroux et al., 2010).

3) Dans des situations d'agressions

Un déséquilibre du pool d'acides aminés libres peut également se rencontrer dans des situations de stress catabolique telles que les traumatismes, le sepsis, les cancers, ... dans lesquelles les besoins en synthèse protéique vont être considérablement augmentés. En réponse à l'agression, l'organisme peut hydrolyser des protéines musculaires afin de produire des acides aminés libres, qui seront alors redistribués vers d'autres organes privilégiés, en particulier le foie. Ces acides aminés seront alors utilisés pour la synthèse des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire ou la néoglucogénèse (Biolo et al., 1997). Toutefois, ces processus complexes varient selon la nature et la durée du stimulus et leurs conséquences sur le métabolisme des acides aminés sont transitoires.

Ainsi, ces situations de déséquilibre en acides aminés nécessitent l'existence de mécanismes cellulaires permettant de détecter les carences, afin que celles-ci n'aient pas d'effet délétère à

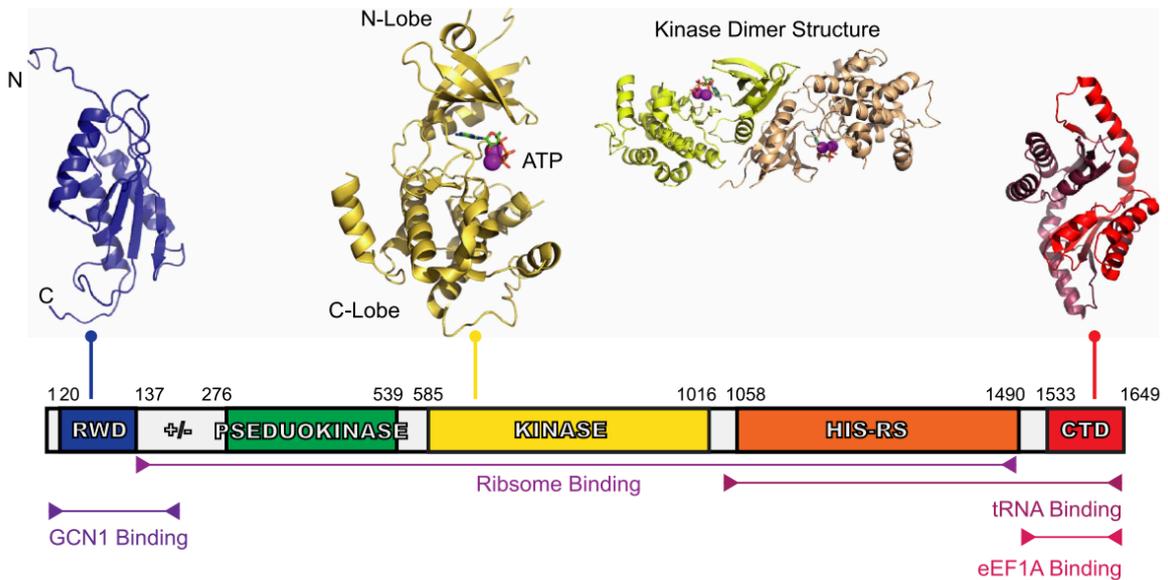


Figure 16. Structure de la kinase GCN2. GCN2 est composée d'un domaine d'interaction avec GCN1 nécessaire pour son activation (GCN1), d'un domaine pseudokinase (Pseudokinase) dont la fonction n'est pas connue, d'un domaine protéine kinase (Kinase), et un domaine de liaison aux ARNt non chargés (HIS-RS) (d'après Masson, 2019).

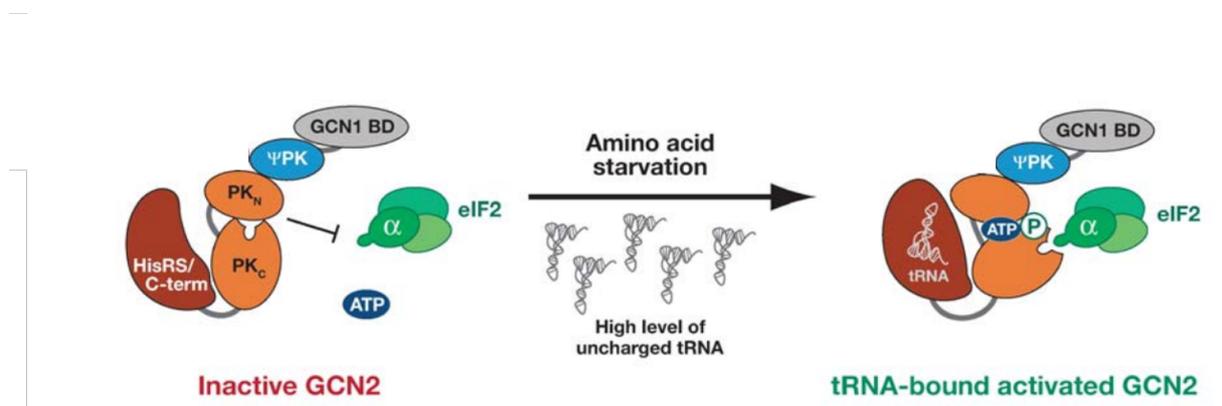


Figure 17. Mécanisme d'action de la kinase GCN2 par une carence en acides aminés. Lors d'une carence en acides aminés, l'accumulation d'ARNt non chargés est détectée par le domaine HIS-RS, ce qui induit l'auto-phosphorylation de la kinase GCN2 par son domaine PK sur les résidus thréonine thr-882-887. GCN2 phosphorylera alors la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2 (d'après Hinnebusch, 2005).

plus ou moins long terme sur l'organisme. Cette adaptation de l'organisme à la diminution de la concentration plasmatique en acide aminé est principalement liée à l'activation de la kinase GCN2 et de la voie eIF2 α -ATF4.

III. La voie GCN2-eIF2 α -ATF4

1) La kinase GCN2

Dans le cadre d'un stress engendré par la consommation d'un régime carencé en un AAI, la protéine kinase responsable de la détection de ce stress au niveau cellulaire est la kinase GCN2 (*General Control Nonrepressed 2*). Cette kinase, d'abord identifiée chez la levure, est conservée chez tous les eucaryotes. Il s'agit d'une protéine composée de plusieurs domaines : un domaine N-terminal, un domaine pseudo-kinase sans activité enzymatique, un domaine kinase à activité catalytique, un domaine homologue à l'histidyl-tRNA synthétase, et un domaine C-terminal impliqué dans la dimérisation et dans la liaison au ribosome (**Figure 16**) (*Masson, 2019*).

La fonction principale de GCN2 est d'adapter la quantité de protéines à la quantité d'acides aminés disponible, en régulant l'expression de gènes spécifiques impliqués dans la réponse à la carence en acide aminé. Lors d'une carence en AAI, le taux d'ARN de transfert non chargés augmente à l'intérieur de la cellule. Ces ARNt libres se lient alors au domaine homologue à l'histidyl-tRNA synthétase de GCN2, aboutissant à sa modification conformationnelle et à son auto-phosphorylation par son domaine kinase au niveau des résidus thréonine thr882-887. Une fois activée, GCN2 ira phosphoryler sa cible, la seule connue, qui n'est autre que le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (*eukaryotic Initiation Factor 2*), au niveau de la sérine 51 (**Figure 17**) (*Hinnebusch, 2005*). Notons que GCN2 peut être également activée après une exposition aux UV ou à la suite d'un stress oxydatif (*Anda et al., 2017*).

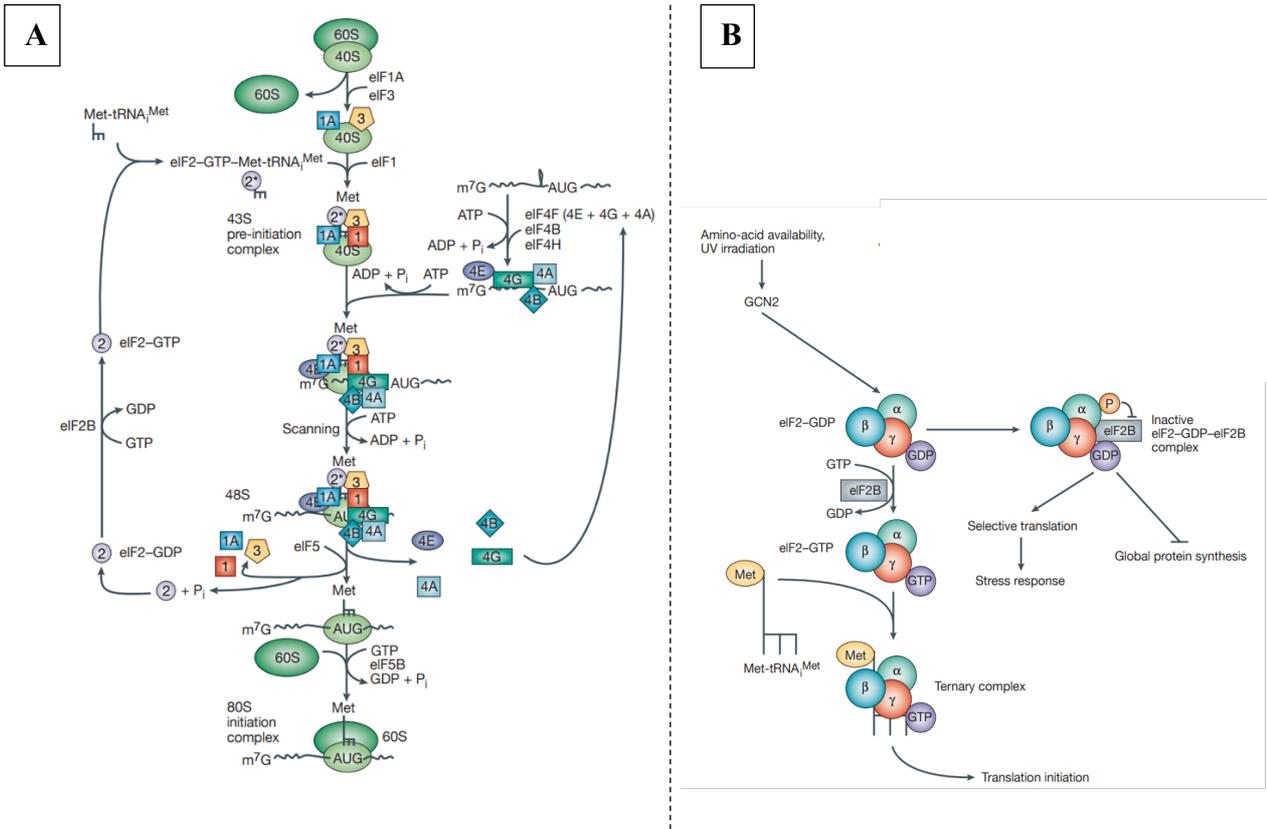


Figure 18. Impact de la phosphorylation d'eIF2 α sur l'initiation de la traduction. **A.** Schéma général de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes. eIF2 fait partie du complexe ternaire, et doit être rechargé en GTP par eIF2B pour pouvoir initier la traduction. **B.** La phosphorylation d'eIF2 α par la kinase GCN2 (en réponse à une carence en acide aminé ou à une exposition aux UV) inhibe le rechargement d'eIF2-GDP en eIF2-GTP, provoquant une diminution de l'initiation de la traduction et donc la synthèse protéique (*d'après Holcik et Sonenberg, 2005*).

2) Le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α

Phosphorylation d'eIF2 α et inhibition de la synthèse protéique

eIF2 α joue un rôle clé au cours de l'initiation de la traduction puisqu'il fait partie intégrante du complexe d'initiation ternaire : eIF2-GTP-Met-ARNt^{met}. Ce complexe est lié au complexe de pré-initiation 40S pour former le complexe 43S et permet l'incorporation de l'ARNt initiateur (Met-ARNt^{met}) au sein du ribosome. La liaison du complexe 43S à l'extrémité 5' du messager forme ainsi le complexe 48S. La reconnaissance du codon d'initiation AUG par l'ARNt^{met} provoque la dissociation des facteurs d'initiation et le relargage d'eIF2-GDP (forme inactive), qui sera recyclé en eIF2-GTP (forme active) par le facteur eIF2B, dans l'objectif de pouvoir reformer le complexe ternaire nécessaire à l'initiation de la traduction.

En condition de carence en acide aminé, la phosphorylation d'eIF2 α par GCN2 entraîne l'inhibition de l'échange de GDP en GTP par eIF2B, entraînant une inhibition de la formation des complexes ternaires, et donc la synthèse protéique (**Figure 18**) (Holcik et Sonenberg, 2005).

Phosphorylation d'eIF2 α et traduction sélective de certains ARNm

En plus de l'inhibition de synthèse protéique, la phosphorylation d'eIF2 α entraîne la dépression de la traduction des ARN messagers de certains facteurs de transcription, principalement ceux d'ATF4, ATF5, CHOP, IBTK α et GADD34 (Averous et al., 2016). Le mécanisme de dépression de la traduction est bien décrit pour ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*). Ce facteur de transcription est en condition physiologique peu traduit, du fait de la présence de deux cadres de lecture ouverts (*upstream Open Reading Frame : uORF*) dans sa région 5'UTR. L'uORF1 facilite le scannage de l'ARNm d'ATF4 par les ribosomes et leur réinitiation au niveau de l'uORF2, qui chevauche la séquence codante d'ATF4. Lors de la phosphorylation d'eIF2 α , la diminution de la quantité d'eIF2-GTP entraîne un ralentissement du scannage de l'ARNm par les ribosomes et donc un retard à leur réinitiation au niveau de

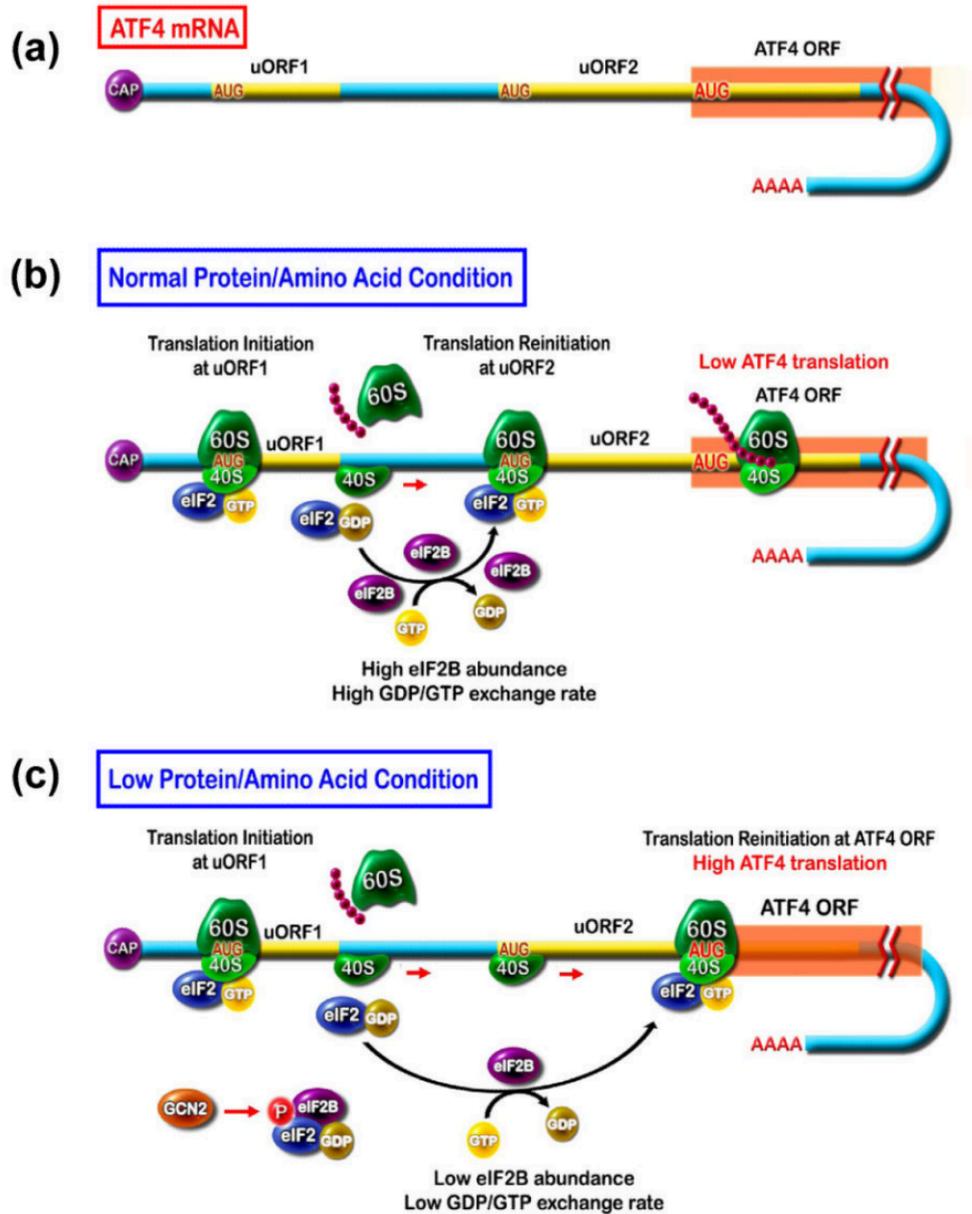


Figure 19. Régulation de la traduction d'ATF4 en réponse à la carence en acides aminés. a. La structure de l'ARNm d'ATF4 chez l'homme contient 2 uORFs. L'uORF2 chevauche la partie codante d'ATF4. b. En condition normale, le scan de l'ARNm d'ATF4 par les ribosomes provoque l'initiation de la traduction au niveau de l'uORF1. Après avoir traduit cet uORF1, la ré-initiation de la traduction, possible par un haut niveau d'eIF2-GTP, va se faire au niveau de l'uORF2, entraînant une faible synthèse d'ATF4. c. Lors d'une faible concentration en acides aminés ou en protéines, la phosphorylation d'eIF2 α diminue fortement la ré-initiation de la traduction après l'uORF1. La sous-unité 40S du ribosome va ainsi continuer à balayer l'ARNm, avec ainsi une faible probabilité de réinitier la traduction avant d'atteindre l'uORF2. La sous-unité 40S passera alors cet uORF et parvenir à l'ORF codant pour ATF4, qui pourra alors être traduit (*d'après Kilberg et al., 2009*).

l'uORF2, augmentant ainsi la probabilité que les régions codantes d'ATF4 soient traduites (**Figure 19**) (Vattem et Wek., 2004 ; Kilberg et al., 2009).

Il est à noter que d'autres types de stress cellulaire peuvent activer la voie eIF2 α -ATF4, aussi appelée ISR (*Integrated Stress Response*), via d'autres kinases : stress du réticulum endoplasmique via PERK, infection virale via PKR, ou déficit en hème via HRI (**Figure 20**) (Kilberg et al., 2009).

3) Les gènes cibles de la voie GCN2-ATF4

ATF4 et séquences promotrices cibles CARE

L'activation de la voie GCN2-eIF2 α -ATF4 aboutira *in fine* à la régulation de l'expression de tout un programme transcriptionnel dans le but d'adapter l'organisme au stress induit par la carence en un AAI. ATF4 joue le rôle clé dit de « *Master Regulator* » de la transcription de ces différents gènes cibles. Il appartient à la famille ATF/CREB des facteurs de transcription avec un domaine basique/leucine Zipper (bZIP), et se fixe au niveau de séquences promotrices spécifiques dénommées CARE (*C/EBP-ATF-Responsive Elements*), aussi appelées AARE (*Amino Acid Response Elements*) dans le cadre d'une carence en acide aminé.

La partie centrale de cette séquence AARE est composée de 9pb, avec une variation possible d'un ou deux nucléotides selon les gènes. Cette variation concerne en général plutôt la zone de fixation des facteurs C/EBP plutôt que celle des facteurs de type ATF. Les séquences AARE peuvent être organisées en une seule copie (ex : *CHOP* ou *ATF3*), ou bien en répétition de trois copies comme pour le gène *TRB3* (**Figure 21**) (Averous et al., 2016 ; Kilberg et al., 2009).

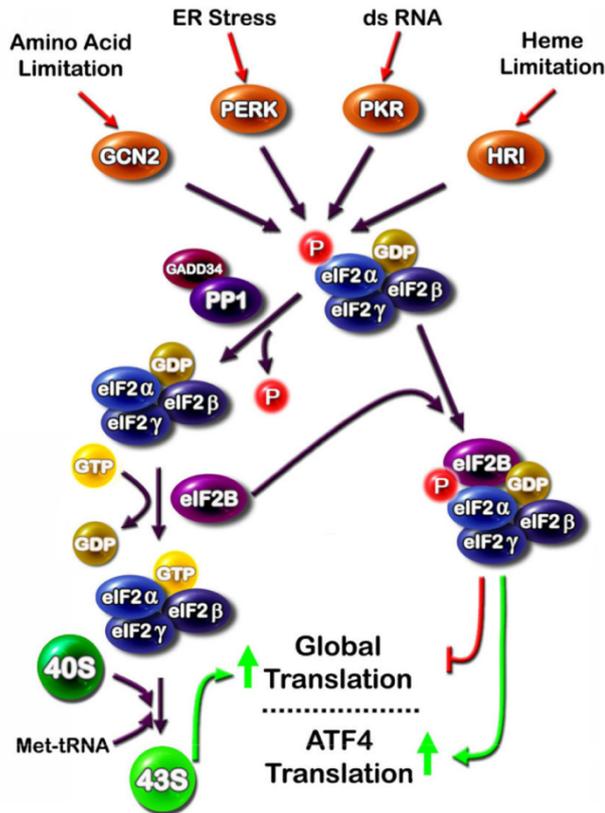


Figure 20. Conditions de stress pouvant induire la phosphorylation d'eIF2 α . Chez les mammifères, quatre kinases sont capables de phosphoryler eIF2 α en réponse à divers stress. Cette phosphorylation induit la liaison de phospho-eIF2 α à eIF2B aboutissant à un complexe non fonctionnel et à un arrêt global de la traduction en phase d'initiation, ainsi qu'une traduction sélective de certains ARNm comme celui d'ATF4 (d'après Kilberg et al., 2009).

Figure 21. Séquences CARE de différents gènes cibles de la voie eIF2 α -ATF4. Gènes possédant dans leurs séquences promotrices des séquences CARE (C/EBP-ATF Response Element) sur lesquelles se fixent les facteurs de transcription ATF4 et C/EBP (d'après Kilberg et al., 2009).

CARE elements are C/EBP-ATF composite sites

		ATF	C/EBP	
ASNS	-68	T G A T G	A A A C	-60
Cat-1	+45	T G A T G	A A A C	+53
xCT	-94	T G A T G	C A A A	-86
xCT	-68	T G A T G	C A A A	-76
CHOP	-302	T G A T G	C A A T	-310
SNAT2	+717	T G A T G	C A A T	+709
TRB3	+228	T G A T G	C A A A	+236
TRB3	+261	T G A T G	C A A A	+269
TRB3	+294	T G A T G	C A A A	+302
HERP	-173	T G A T G	C A A C	-181
ATF3	-23	T G A T G	C A A C	-15
VEGF	+1775	T G A T G	T A A T	+1767
4E-BP1	+873	T G A T G	A A A C	+881
4E-BP1	+899	T G A T G	A A A T	+907
Consensus		T G A T G	X A A X	
			C T	
			A C	
			T A	

Programme transcriptionnel contrôlé par ATF4

ATF4, en se fixant sur les séquences AARE, très souvent sous la forme d'hétérodimère avec un membre de la famille C/EBP, va induire l'expression de nombreux gènes cibles tels que *CHOP*, *ASNS*, *TRB3*, *ATF3*, *SNAT2*, *VEGF*, *4E-BP1*, *xCT*, *HERP*, *CAT-1* (liste non exhaustive). La surexpression de ces gènes cibles a pour objectif, en cas de carence courte en AA, d'adapter la cellule au stress et de favoriser sa survie, par exemple en stimulant l'autophagie, la protéolyse, la biosynthèse ou le transport d'acides aminés, afin de reformer un pool d'acides aminés libres, et sur le long terme d'entraîner l'apoptose de la cellule si les dommages ne sont pas réparés ou sont trop intenses. Notons que certains gènes cibles d'ATF4 jouent également un rôle de rétrocontrôle négatif sur l'activité d'ATF4, soit de manière directe comme *TRB3*, soit de manière indirecte en inhibant la phosphorylation d'eIF2 α comme *GADD34* (Chaveroux et al., 2010 ; Averous et al., 2016).

Parmi les autres gènes cibles d'ATF4, nous retrouvons par exemple celui codant le facteur de transcription ***CHOP (C/EBP Homology Protein)***, aussi connu sous le nom de *DDIT3*, dont l'expression est induite en cas de carence prolongée en AA (Averous et al., 2004 ; Bruhat et al., 2000). Il est connu pour être impliqué dans la différenciation cellulaire, l'apoptose, ou encore la cancérogenèse. Son implication dans les processus apoptotiques est liée à sa capacité à réguler négativement le facteur anti-apoptotique BCL2, et à réguler positivement des protéines pro-apoptotiques comme Bim et PUMA (Altman et al., 2009 ; Ishihara et al., 2007). Par ses propriétés, CHOP est capable de s'hétérodimériser avec les autres membres de la famille C/EBP ou de la famille des ATF. Il est donc probablement impliqué dans de nombreux processus de régulation et de phénomènes biologiques.

Un autre gène cible d'ATF4, *ASNS (Asparagine Synthétase)*, code pour une enzyme impliquée dans la synthèse d'asparagine et de glutamate à partir d'aspartate et de glutamine. Son expression est régulée par la carence en glucides et en acides aminés, ainsi que par le stress

du reticulum endoplasmique (*Barbosa-Tessmann et al., 2000*). Son rôle est particulièrement étudié dans la résistance des leucémies aigues au traitement par asparaginase, enzyme qui hydrolyse l'asparagine en aspartate et la glutamine en glutamate. Une surexpression d'*ASNS* par les cellules tumorales est associée à une moins bonne réponse au traitement, du fait d'une capacité acquise des cellules à resynthétiser de l'asparagine, et donc à survivre (*Chand et al., 2020*).

IV. Principaux rôles de la voie GCN2-ATF4

1) Contrôle de la prise alimentaire

Parmi les rôles physiologiques clés de la voie GCN2-ATF4, nous retrouvons le contrôle au niveau hypothalamique de la prise alimentaire cité plus haut. En effet, la consommation d'un régime carencé en un AAI chez l'animal va entraîner une diminution rapide et drastique de la concentration plasmatique de cet AAI, ce qui va être rapidement détecté par la kinase GCN2 au niveau de l'hypothalamus médiobasal. Ceci conduira à la phosphorylation d'eIF2 α au niveau hypothalamique et ainsi à l'inhibition de la prise alimentaire et la mise en place d'une aversion de l'animal pour le régime (*Maurin et al., 2005*). Il est par ailleurs suggéré que la voie eIF2 α -ATF4 puisse être impliquée dans l'anorexie associée à des pathologies comme le cancer. En effet, deux cytokines pro-inflammatoires, GDF15 et IL-6, sont décrites comme favorisant l'anorexie et la cachexie associées aux cancers, cytokines toutes deux régulées par ATF4 (*Bindels et al., 2018 ; Lerner et al., 2016 ; Zhang et al., 2013*).

2) Contrôle de l'autophagie et interaction avec la voie mTOR

L'autophagie correspond au processus visant à dégrader des composants cytoplasmiques par le lysosome, permettant entre autres de reconstituer le pool d'acides aminés libres. La régulation de l'autophagie en fonction de la disponibilité en acides aminés implique deux voies principales

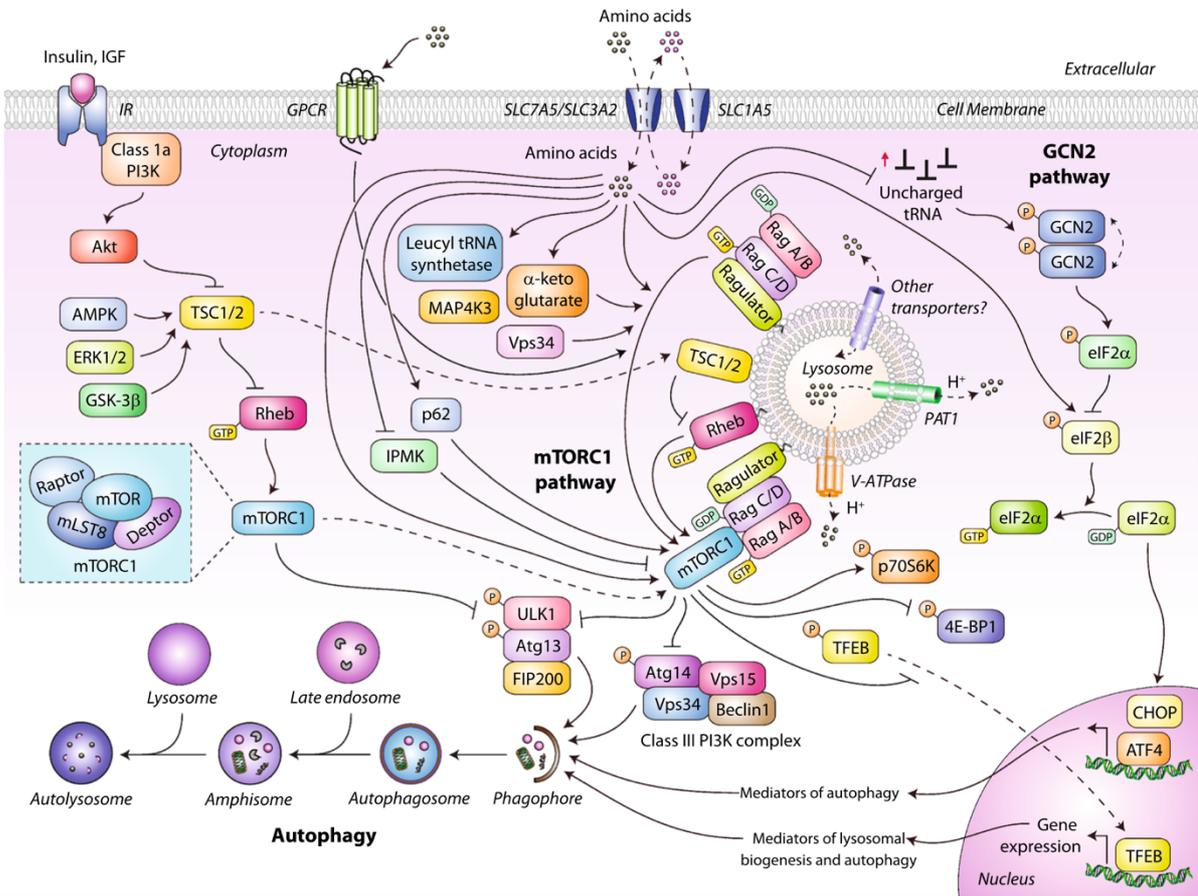


Figure 22. Mécanismes d'action des voies mTORC1 et GCN2 dans la régulation de l'autophagie en réponse à une carence en acide aminé. La carence en acides aminés induit (i) une inhibition de mTORC1 et ainsi une levée d'inhibition du complexe pro-autophagique ULK1/ATG13 ; (ii) une activation de la voie GCN2-ATF4 avec augmentation de l'expression d'ATF4 et de CHOP qui vont induire l'expression de divers gènes médiateurs de l'autophagie ; et (iii) une déphosphorylation de TFEB qui sera alors relocalisé dans le noyau et induira l'expression de gènes médiateurs de la biogenèse des lysosomes et dans les processus d'autophagie (*d'après Carroll et al., 2015*).

de signalisation : la voie GCN2-ATF4 et la voie mTORC1 (*mammalian Target Of Rapamycine Complex 1*).

Le complexe mTORC1 joue un rôle majeur dans les processus de croissance cellulaire, de métabolisme, de synthèse protéique et de biogenèse des lipides. Son activité est régulée au niveau cellulaire (i) par TSC2/Rheb (*Tuberous Sclerosis Complex 2/Ras homolog enriched in brain*) en réponse à divers facteurs de croissance suite à l'activation de la voie PI3K/Akt ; et (ii) par les GTPases RAG en réponse à une variation de la quantité en acide aminé dans la cellule. Lorsque la quantité intra-cellulaire d'acides aminés est normale, mTORC1 est recruté et séquestré par les GTPases RAG au niveau de la surface des lysosomes, où il réprime l'autophagie par phosphorylation du complexe ULK1-ATG13. Le déficit en acide aminé entraîne l'inhibition de mTORC1 et ainsi la levée d'inhibition du complexe pro-autophagique ULK1-ATG13, aboutissant ainsi à la formation, à l'élongation, à la maturation puis à la dégradation des autophagosomes (*Jung et al., 2009*). Par ailleurs, le facteur de transcription TFEB joue également un rôle majeur dans le contrôle de l'autophagie en réponse à une carence en acides aminés, en régulant l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse des lysosomes et dans l'autophagie. Lorsque les GTPases RAG sont activées et que mTORC1 est séquestré dans le lysosome, ce dernier phosphoryle et inactive TFEB (*Settembre et al., 2012*). L'inactivation de mTORC1 en cas de carence en acides aminés entraîne ainsi une déphosphorylation de TFEB et son transfert dans le noyau, aboutissant ainsi à l'expression d'*ATGs* (*Autophagy-related genes*) tels que SQSTM1 et LC3B (*Carroll et al., 2015*).

Il a été démontré qu'en réponse à une carence en acides aminés, **la voie GCN2-ATF4** participe, *via* ATF4 et *via* CHOP, à la transcription d'un certains nombres de gènes impliqués dans la formation et le fonctionnement des autophagosomes tels que *SQSTM1*, *ATG5*, *ATG12* ou encore *LC3* (**Figure 22**) (*B'Chir et al., 2013 ; B'Chir et al., 2014 ; Carroll et al., 2015*).

Ainsi, GCN2 et mTORC1 jouent un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie des acides aminés, avec une coopération entre les deux voies de signalisation qui n'est pas encore clairement élucidée. Il semblerait qu'en cas de carence en leucine, ATF4 joue un rôle dans l'inhibition de mTORC1 par surexpression de deux inhibiteurs de mTORC1 : REDD1 et Sestrin2 (*Xu et al., 2020*).

3) GCN2 et cancers

GCN2 semble également jouer un rôle important dans le contexte des pathologies cancéreuses. En effet, la prolifération rapide des cellules tumorales entraîne un besoin accru en nutriments et oxygène, entraînant ainsi une compétition entre cellules malignes et cellules saines, et épuisant rapidement les réserves de ces métabolites dans le micro-environnement. Les cellules tumorales peuvent ainsi utiliser la voie eIF2 α -ATF4 comme voie de survie, afin de maintenir leur capacité de prolifération et de dissémination. A titre d'exemple, le VEGF, facteur de croissance clé pour la néovascularisation tumorale nécessite l'activation de la kinase GCN2 pour être exprimé (*Wang et al., 2013*). *ASNS*, gène cible d'ATF4, présente également un rôle important dans la survie tumorale du fait de son implication dans la synthèse d'acide aminé (asparagine) (*Nakamura et al., 2018*).

Il a été démontré que le taux de GCN2 (sous sa forme activée et sa forme non activée) augmente dans de nombreux tissus tumoraux en comparaison aux tissus sains, ce qui est classiquement associé à un pronostic péjoratif ou à une agressivité plus importante de la maladie. Il a d'ailleurs été décrit que près de 13% des lignées cellulaires cancéreuses semblent dépendantes de la kinase GCN2, avec pour point commun un enrichissement important en expression de gènes de la voie du TGF- β (*Saavedra-Garcia et al., 2021*). Une des hypothèses pour expliquer cette accumulation de GCN2 est celle d'une protection contre sa dégradation par le protéasome, mais ce mécanisme n'est pas complètement élucidé à ce jour (*Wei et al., 2015*). Il a par ailleurs été

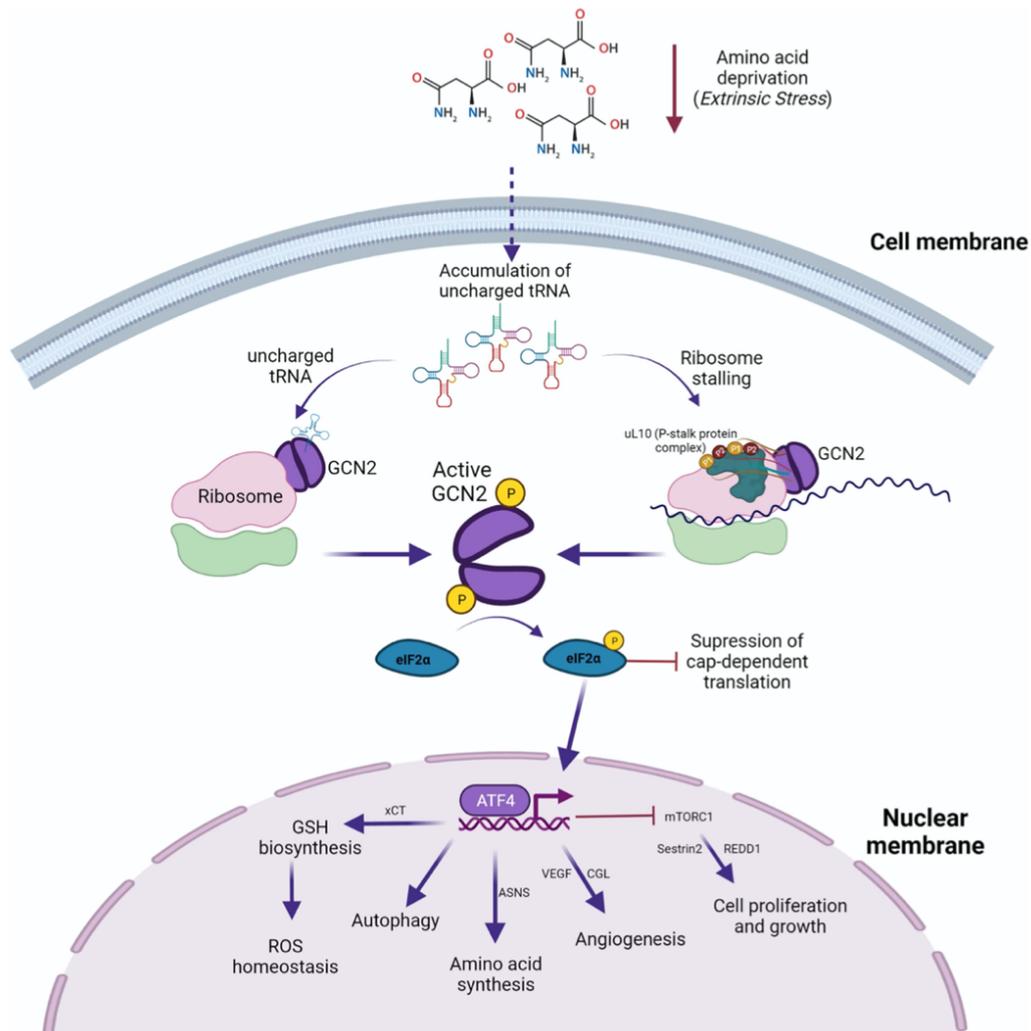


Figure 23. Implications potentielles de la voie GCN2-ATF4 dans les pathologies tumorales. L'activation de la kinase GCN2 entraîne une phosphorylation de eIF2 α et ainsi une inhibition globale de la traduction mais aussi la traduction sélective du facteur de transcription ATF4. Parmi les gènes cibles d'ATF4 pouvant jouer un rôle clé dans la survie tumorale, on retrouve *xCT* pour son implication dans l'homéostasie des ROS (*Reactive Oxygen Species*), des gènes de l'autophagie, des gènes impliqués dans la synthèse d'acides aminés comme *ASNS*, des gènes impliqués dans la néovascularisation comme *VEGF* (d'après Gold et Masson, 2022).

démontré que la phosphorylation d'eIF2 α et l'activation de la voie eIF2 α -ATF4 sont associés à des phénomènes de résistance aux drogues de chimiothérapie par certains types de tumeur, puisque l'utilisation d'un inhibiteur de la phosphorylation d'eIF2 α (ISRIB *Integrated Stress Response Inhibitor*) permet de lever ce phénomène de résistance. La phosphorylation d'eIF2 α entraîne également une protection des cellules tumorales contre le stress oxydant induit par les traitements anti-cancéreux, en induisant l'expression du gène *xCT* (sous-unité du transporteur cystéine/glutamate) qui permet de maintenir les taux de glutathion dans la cellule, puissante molécule anti-oxydante (**Figure 23**) (*Gold et Masson, 2022 ; Averous et al., 2016*).

V. La voie de signalisation GCN2-ATF4 dans les lymphocytes T

1) GCN2 et cellules de l'immunité innée

Les données de la littérature décrivent une implication de la kinase GCN2 dans la régulation de la réponse immunitaire. Il a été démontré que certaines infections bactériennes, en particulier celles à *Shigella* et *Salmonella*, entraînent des dommages membranaires importants au niveau des cellules de l'hôte, et donc un état de carence en AA au niveau intra-cellulaire. Ce stress induit alors la voie GCN2-ATF4, ce qui aboutit d'une part à une augmentation de l'autophagie, et d'autre part à une stimulation de la production de cytokines (*via* ATF3 et ATF4), contribuant ainsi à la réponse immunitaire anti-bactérienne (*Tsalikis et al., 2013*).

La voie GCN2-ATF4 est également impliquée dans la régulation de la réponse des cellules T par les cellules dendritiques. L'équipe de Ravindran *et al.* a en effet démontré que le virus de la fièvre jaune peut activer la kinase GCN2 au niveau des cellules dendritiques du fait de l'induction par le virus d'une déplétion intra-cellulaire en plusieurs acides aminés (principalement l'arginine), entraînant ainsi une stimulation de l'autophagie et une présentation antigénique virale accrue aux LT CD4⁺ et CD8⁺ (*Ravindran et al., 2014*). Ils ont également

démontré que la kinase GCN2 des cellules dendritiques joue un rôle majeur dans le contrôle de la réponse immunitaire inflammatoire de type T_H17. En effet, l'exposition de souris porteuses de cellules dendritiques CD11c⁺ GCN2^{-/-} à du Dextran Sodium Sulfate (DSS) 2%, entraîne une colite inflammatoire et une réponse T_H17 plus sévères que pour des souris avec des CD11c⁺ GCN2^{+/+}. Cet effet est expliqué par les auteurs par une altération de l'autophagie dans les cellules GCN2^{-/-}, entraînant ainsi un stress oxydatif plus important par une production accrue de ROS (*Reactive Oxygen Species*). De plus, l'exposition de souris à du DSS associée à la consommation d'un régime carencé en leucine, entraîne une diminution de l'inflammation intestinale et une diminution de la réponse T_H17 en comparaison à des souris exposées à du DSS et à un régime non carencé. Cet effet n'est pas retrouvé chez les souris GCN2^{-/-}, montrant ainsi le rôle clé de GCN2 dans le contrôle de la réponse inflammatoire T_H17 (*Ravindran et al., 2016*).

2) GCN2 et réponse à l'Indoléamine-2,3-Dioxygénase (IDO)

La modulation de la réponse immune par les cellules dendritiques se fait également par le biais de l'Indoléamine-2,3-Dioxygénase (IDO). L'IDO est une enzyme intracellulaire exprimée notamment par les macrophages et les cellules dendritiques, mais également par certaines cellules tumorales. Elle catabolise le tryptophane, créant ainsi une déplétion en cet AAI pour le lymphocyte T adjacent, et activant alors la kinase GCN2 lymphocytaire. Elle entraîne également la production de métabolites du tryptophane, appelés kynurénines (KYN), qui sont des ligands immunologiquement actifs du récepteur Aryl hydrocarbure (AhR), facteur de transcription capable d'induire dans ce contexte un effet immunosuppresseur en réduisant l'immunogénicité des cellules dendritiques (*Munn et Melor, 2013*). L'expression d'IDO par les cellules présentatrices de l'antigène en réponse à un stimulus inflammatoire va, par ces deux voies (carence en tryptophane et production de KYN), induire une anergie et un arrêt de prolifération des lymphocytes T CD8⁺. Les cellules T CD8⁺ dans lesquelles GCN2 a été

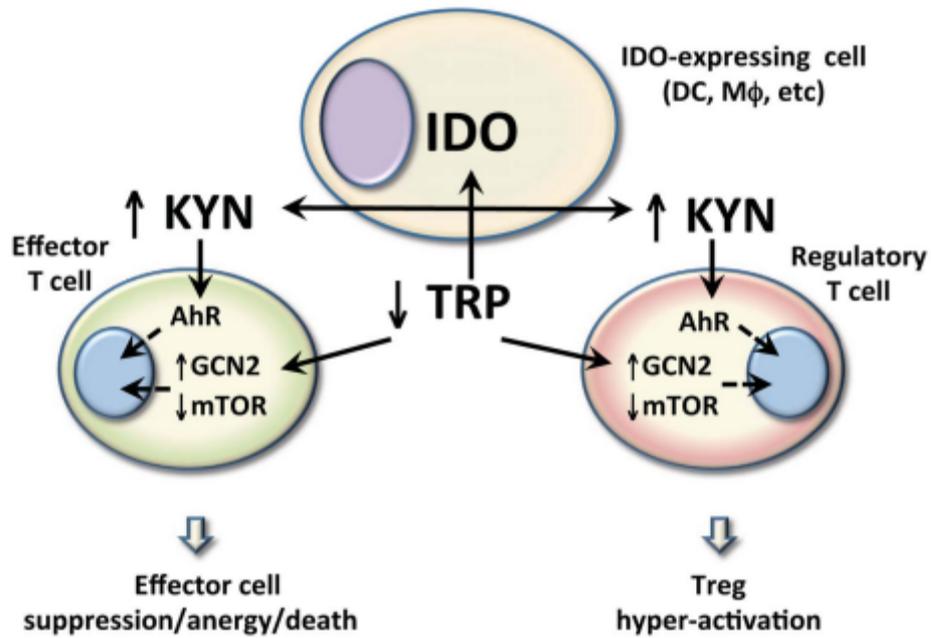


Figure 24. Mécanisme d'action de l'Indoléamine-2,3-Dioxygénase (IDO) sur les lymphocytes T. L'IDO exprimée par les macrophages et les cellules dendritiques (i) catabolise le tryptophane (TRP), créant ainsi une déplétion, ce qui active la kinase GCN2 des lymphocytes T adjacents et (ii) entraîne la production de métabolites du tryptophane, les kynurénines (KYN), qui sont des ligands immunologiquement actifs du récepteur Aryl hydrocarbure (AhR), facteur de transcription réduisant l'immunogénicité des cellules dendritiques. L'expression d'IDO induit une anergie et un arrêt de prolifération des lymphocytes T CD8⁺, un blocage de la polarisation T_H17 et une différenciation préférentielle des CD4⁺ en phénotype Treg (*d'après Munn et Melor 2013*).

invalidée sont résistantes à l'anergie induite par l'IDO, *in vitro* comme *in vivo*, montrant bien l'implication de la voie GCN2-ATF4 dans ce phénomène (Munn *et al.*, 2005). Concernant les lymphocytes T CD4+, l'IDO semble également avoir un effet tolérogène et anti-inflammatoire, en bloquant la polarisation T_H17 et en favorisant la différenciation en un phénotype Treg FoxP3+ avec stimulation de l'expression du TGF-β (**Figure 24**) (Munn *et Mellor*, 2013 ; Yan *et al.*, 2010).

Il semblerait que les LT CD8+ soient plus sensibles à l'effet anti-prolifératif de l'IDO que les LT CD4+ (Forouzandeh *et al.*, 2008), et que cet effet soit principalement lié à l'action des kynurénines et de leurs métabolites, et que la carence en tryptophane amplifierait le phénomène sans être suffisante à elle seule pour obtenir l'effet immunosuppresseur (Frumento *et al.*, 2002). Ce blocage de prolifération paraît également lié à une inhibition, *via* GCN2, d'enzymes clés impliquées dans la synthèse d'acides gras mais aussi de la consommation de glucose, de la glycolyse aérobie et de la glutaminolyse, qui sont indispensables pour la prolifération et la différenciation des LT (Eleftheriadis *et al.*, 2013, 2014, 2015). On note aussi une augmentation du nombre de cellules immunes entrant en apoptose sous l'effet d'IDO, du fait notamment d'une augmentation de l'expression de CHOP, gène pro-apoptotique et dépendant d'ATF4 (Habibi *et al.*, 2010). Notons que seules les cellules T activées (*in vitro* comme *in vivo*) vont répondre à l'action immunorégulatrice d'IDO (Munn *et al.*, 2005 ; Frumento *et al.*, 2002). L'ensemble de ces actions fait de l'expression d'IDO un mécanisme de rétrocontrôle endogène permettant de contrôler une réponse immune excessive, mais qui représente également un mécanisme d'échappement tumoral au système immunitaire, en faisant ainsi une cible thérapeutique potentielle (Platten *et al.*, 2014).

3) GCN2 et réponse à l'Halofuginone (HF)

L'implication de la voie GCN2-ATF4 dans la régulation de la réponse immunitaire T est également bien décrite avec l'Halofuginone (HF). L'HF est une molécule synthétique dérivée

de la febrifugine, classiquement utilisée comme traitement anti-parasitaire en médecine vétérinaire. Elle est également connue pour ses effets anti-fibrotiques et d'inhibition de la synthèse du collagène de type I. Elle présente des effets immuno-régulateurs du fait de sa capacité à inhiber spécifiquement la différenciation des LT en sous-type T_H17. Cette inhibition est liée à l'activation de la voie GCN2-ATF4 qui induit une répression de la réponse pro-inflammatoire IL-23 associée à une diminution de la phosphorylation de STAT3 et ainsi de la production de cytokines pro-inflammatoires (*Sundrud et al., 2009, Carlson et al., 2014*). L'activation de la kinase GCN2 est liée au blocage de la captation de proline par l'HF par inhibition de l'activité enzymatique de la prolyl-tRNA synthétase, entraînant ainsi un déficit intra-cellulaire en cet AA (*Chu et al., 2013*). Elle inhibe aussi la production de certaines cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-13 et TGF- β) dans les LT activés, par inhibition de l'activation de NF- κ B et de la phosphorylation de la MAPK p38 (*Leiba et al., 2006*), et est capable d'inhiber la prolifération des cellules T par induction de leur apoptose (*Chu et al., 2013*). Il a par ailleurs été démontré qu'elle permet, *via* l'inhibition de la différenciation des LT T_H17, de réduire la sévérité de l'état inflammatoire dans des modèles *in vivo* d'encéphalomyélite auto-immune ou de GvH (*Sundrud et al., 2009 ; Cheng et al., 2012*).

4) GCN2 et réponse à l'Asparaginase (ASNase)

Une autre molécule est également connue pour activer la kinase GCN2 dans les lymphocytes T. Il s'agit de l'Asparaginase (ASNase), classiquement utilisée pour le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques. L'ASNase intervient dans l'hydrolyse de l'asparagine en acide aspartique et ammonium, et possède également une activité glutaminase intrinsèque, diminuant ainsi la présence de glutamine, substrat essentiel pour la synthèse intra-cellulaire d'asparagine par l'asparagine synthétase (ASNS). Les cellules non tumorales peuvent ainsi produire de l'asparagine (et du glutamate) à partir d'acide aspartique et de glutamine grâce à l'asparagine synthétase, assurant ainsi leur survie, même en l'absence d'asparagine exogène. En revanche,

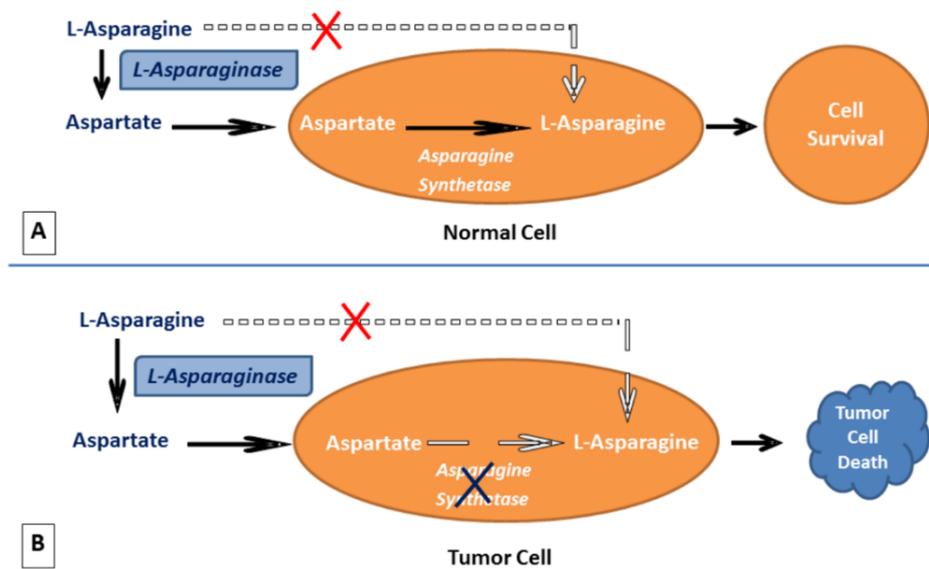


Figure 25. Mécanisme d'action de l'asparaginase sur les cellules tumorales. **A.** Dans les cellules saines, l'ASNase hydrolyse l'asparagine en aspartate, qui sera utilisé par la cellule pour resynthétiser de l'asparagine grâce à l'asparagine synthétase (ASNS), assurant ainsi leur survie, même en l'absence d'asparagine exogène. **B.** Les cellules leucémiques présentent classiquement un faible niveau d'ASNS, ce qui les rend dépendantes de l'apport exogène d'asparagine pour leur survie, et donc très sensibles à l'ASNase (*d'après Chand et al., 2020*).

les cellules leucémiques présentent classiquement un faible niveau d'ASNS, ce qui les rend dépendantes de l'apport exogène d'asparagine pour leur survie, et donc très sensibles à l'ASNase. Le niveau d'expression d'ASNS dans les cellules tumorales est d'ailleurs corrélé aux taux de réponse à l'ASNase (**Figure 25**) (*Chand et al., 2020, Nakamura et al., 2018*).

L'implication de la voie GCN2-ATF4 dans le mécanisme d'action de l'asparaginase a tout d'abord été évoqué du fait de la capacité d'ATF4 à réguler l'expression d'ASNS. Il a ensuite été démontré que les effets de l'ASNase sur les cellules immunitaires sont dépendants de la kinase GCN2. En effet, l'administration d'un traitement par ASNase à des souris GCN2^{-/-} entraîne un effet immunosuppresseur plus important que chez des souris GCN2^{+/+}, avec une réduction des populations cellulaires immunes au niveau de la rate, du thymus et de la moelle osseuse, par impossibilité d'adaptation au stress induit par la carence en AA. La kinase GCN2 apparaît donc essentielle pour la survie des lymphocytes T (*Bunpo et al., 2010*). Notons par ailleurs que l'inhibition pharmacologique de GCN2 en association à un traitement par ASNase augmente ses effets anti-prolifératifs et anti-tumoraux par effet répressif de l'expression d'ASNS (*Nakamura et al., 2018*). Enfin, certains gènes cibles d'ATF4 sont maintenant reconnus comme étant corrélés à la résistance des cellules leucémiques au traitement par ASNase (tels que *Slc7A11*), montrant bien le rôle notable de la voie GCN2-ATF4 dans la survie cellulaire en cas de carence en AA (*Ferguson et al., 2022*).

5) GCN2 et réponse à une carence en acide aminé

Une première publication en 1994 décrit les effets *in vitro* de la carence en AA (indispensable ou non) sur l'activation des lymphocytes humains. Une carence en arginine de 48 heures entraîne une diminution significative de l'expression des marqueurs d'activation de surface des lymphocytes (en particulier IL-2R). Cet effet est également retrouvé avec des cultures en milieux carencés en phénylalanine, leucine, méthionine et thréonine, probablement du fait de la diminution de synthèse protéique entraînée par la carence (*Rossi Fanelli et al., 1994*).

Plus tard, cet impact sur la réponse immune d'une carence en AA a pu être relié à l'activation de la voie GCN2-ATF4. Par exemple, la carence en arginine, en plus d'entraîner une moindre activation des LT (Rossi Fanelli *et al.*, 1994), entraîne également une moindre prolifération cellulaire du fait d'un blocage du cycle cellulaire en phase G0-G1 par échec d'augmentation de la cycline D3 et de cdk4. En revanche, les mêmes expériences de carence en arginine réalisées dans des cellules T GCN2-KO montrent une prolifération normale des cellules avec activation conservée des taux de cycline D3 et de cdk4, montrant bien le rôle clé de GCN2 dans la réponse immune en cas de carence en AA (Rodriguez *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'équipe de Yang *et al.* a démontré qu'une carence en cystéine, en glutamine ou en leucine entraîne une induction de l'expression du gène *ASNS* dans des LT CD4⁺ murins stimulés en condition T_H1 pendant 24 heures, et ce de façon dépendante de GCN2 pour la leucine et la glutamine, et partiellement dépendante de GCN2 pour la cystéine. Ils ont également démontré, par des invalidations d'ATF4 ou de GCN2, qu'ATF4 joue un rôle dans la croissance du LT CD4⁺ après activation, et qu'ATF4 et GCN2 jouent un rôle dans la prolifération cellulaire T, en particulier en cas de réponse T_H1. L'analyse du profil d'expression génique de LT CD4⁺ WT versus ATF4^{-/-} leur a également permis de montrer qu'ATF4 induit l'expression d'une cascade de gènes impliqués dans l'import d'AA, la reprogrammation métabolique des flux d'AA via le cycle du TCA, ainsi que la synthèse et l'import de cystéine (Yang *et al.*, 2018). GCN2 semble jouer un rôle fondamental pour le maintien de l'activité des LT CD8⁺ en cas de carence en AA. En effet, l'application d'une carence en tryptophane *in vitro* et *in vivo* sur des LT CD8⁺ GCN2-KO issus d'un modèle de gliome malin murin, montre que ces LT GCN2-KO ne sont pas capables de répondre au stress induit par une carence en tryptophane, entraînant alors une mort cellulaire accrue par apoptose et nécrose, du fait notamment d'une réduction drastique de l'expression de PKC-theta, impliquée dans la signalisation du TCR (Rashidi *et al.*, 2020). Il a par ailleurs été démontré que le tryptophanol (qui mime une carence en tryptophane) active la kinase GCN2

dans des LT humains CD4+, et que cette activation est associée à des effets immunosuppresseurs par inhibition de la prolifération cellulaire, l'induction d'apoptose, ainsi qu'une réduction de la différenciation TH2 (*Eleftheriadis et al., 2016*). Ces effets anti-inflammatoires de la carence en tryptophane ont aussi été décrits par l'équipe de Brenk *et al.* Elle entraîne en effet une différenciation préférentielle des cellules dendritiques en phénotype tolérogène (liée à l'activation de la kinase GCN2), avec une moindre capacité de stimulation lymphocytaire T, et une tendance à induire majoritairement des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+Foxp3+ (*Brenk et al., 2009*).

6) Impact de l'activation du lymphocyte T sur la réponse à une carence en AA

La plupart des analyses de carence en AA sur les LT concernent le tryptophane, bien souvent dans l'optique de comprendre les effets immuno-régulateurs de l'IDO. Ainsi, l'équipe de Munn *et al.* a montré que la culture de splénocytes de souris en condition carencée en tryptophane permet d'induire *in vitro* l'expression de *CHOP*, de façon dépendante de GCN2 mais également dépendante de l'activation du lymphocyte T. En effet, en l'absence de stimulation des cellules T par du PMA/ionomycine, la carence en tryptophane ne permettait pas d'induire l'expression de *CHOP* dans leurs expériences (*Munn et al., 2005*). Ces résultats ont également été retrouvés par l'équipe de Van de Velde *et al.*, qui ont démontré qu'une carence de 24 à 72h en tryptophane, permet d'induire l'expression de *CHOP* et la phosphorylation de eIF2 α , dans des LT CD4+ ou CD8+ murins, suite à l'activation de GCN2, mais uniquement si le TCR est stimulé (*Van de Velde et al., 2016*). De même, l'équipe de Hayashi *et al.* a démontré que l'induction de l'expression de *HOXB9*, gène cible d'ATF4, dans des LT humains CD4+ cultivés en milieu carencé en acides aminés indispensables durant 3 jours n'était possible qu'en cas d'activation du LT, étayant ainsi les résultats de Munn *et al.* avec la carence en tryptophane

	Données connues de l'impact sur les lymphocytes T	Références bibliographiques
IDO = carence en tryptophane	Anergie et arrêt de prolifération des LT CD8+, de manière dépendante de GCN2	Munn et al 2005
	Blocage de prolifération plus important sur les LT CD8+ que sur les LT CD4+	Forouzandeh et al, 2007
	Inhibition, <i>via</i> GCN2, d'enzymes clés impliquées dans la synthèse d'acides gras, de la consommation de glucose, de la glycolyse aérobie et de la glutaminolyse	Eleftheriadis 2013, 2015 et 2014
	Stimulation de l'apoptose <i>via</i> CHOP	Habibi et al, 2010
	Blocage de la réponse inflammatoire CD4+ TH17 et stimulation de Treg FoxP3+ Effet immuno-régulateur uniquement sur des LT activés	Munn and Mellor, 2013 - Yan et al., 2010 Munn et al, 2005 ; Frumento et al, 2002
Halofuginone = carence en proline	Inhibition de la réponse TH17 suite à l'activation de la voie GCN2-ATF4 qui induit une répression de la réponse pro-inflammatoire IL-23 et d'autres cytokines pro-inflammatoires	Sundrud et al, 2009, Carlson et al 2014
	Inhibition de la production de cytokines dans les LT activés par inhibition de l'activation de NF-κB et de la phosphorylation de MAPK p38	Leiba et al 2006
	Induction apoptose des LT	Chu et al 2013
Asparaginase = carence en asparagine	Réduction de la sévérité de l'inflammation dans des modèles d'encéphalomyélite auto-immune et de GvH	Sundrud et al, 2009 ; Cheng et al 2012
	Effet anti-tumoral par induction d'une carence totale en asparagine, la cellule tumorale ne pouvant synthétiser de l'asparagine par déficit en asparagine synthétase (ASNS)	Chand et al, 2020, Nakamura et al 2018
	Association à inhibition pharmacologique de GCN2 augmente ses effets anti-prolifératifs et anti-tumoraux par effet répressur de l'expression d'ASNS	Nakamura et al 2018
	Réduction des populations cellulaires immunes au niveau de la rate, du thymus et de la moelle osseuse, surtout chez des souris GCN2-KO	Bunpo et al 2010
Carence en acides aminés	Certains gènes cibles d'ATF4 reconnus comme étant corrélés à la résistance des cellules leucémiques au traitement par ASNase (ex Sle7A11)	Ferguson et al, 2022
	Diminution de l'expression des marqueurs d'activation de surface des lymphocytes suite à une carence en arginine, phénylalanine, leucine, méthionine et thréonine par répression de synthèse protéique	Fanelli et al, 1994
	Moindre prolifération cellulaire suite à carence en arginine du fait d'un blocage du cycle cellulaire en phase G0-G1, de manière dépendante de GCN2	Rodriguez et al., 2006
	Induction de la voie GCN2-ATF4 uniquement si LT activé en cas de carence en tryptophane (modèles murins), ou en cas de carence en tous les AAE (CD4+ humains)	Munn et al. 2005, Van de Velde et al., 2016, Hayashi et al., 2016
	Mort cellulaire de LT CD8+ intra-tumoraux suite à carence en tryptophane si déficience en GCN2, par réduction drastique de l'expression de PKC-theta (signalisation du TCR)	Rashidi et al., 2020
	Effet immunosuppresseur du tryptophanol ou de la carence en tryptophane : inhibition de la prolifération cellulaire T, induction d'apoptose, réduction de la différenciation TH2, différenciation préférentielle des cellules dendritiques en phénotype tolérogène avec induction majoritaire de LT régulateurs CD4+CD25+Foxp3+	Eleftheriadis et al., 2016, Brenk et al, 2009
Induction d'HOXB9 (gène cible d'ATF4) en cas de carence en AAI, qui inhibe la synthèse d'IL-2, IFN-γ, IL-4	Hayashi et al., 2016	

Tableau 1. Synthèse des données de la littérature sur la voie GCN2-ATF4 dans les lymphocytes T.

sur des splénocytes de souris (*Hayashi et al., 2016 ; Munn et al., 2005*). Cette équipe a par ailleurs démontré que HOXB9 régule négativement l'activité du LT activé en cas de carence en AA en inhibant la synthèse d'un certain nombre de cytokines (IL-2, IFN- γ , IL-4) dans l'objectif de réduire le métabolisme cellulaire en réponse au stress (*Hayashi et al., 2016*).

Au total, les données de la littérature démontrent que la voie GCN2-ATF4 présente un rôle clé pour la survie du lymphocyte T et pour son fonctionnement correct en cas d'activation par un pathogène. Globalement, il semblerait que l'activation de GCN2 entraîne le plus souvent un effet immunosuppresseur qui permet d'éviter l'emballement du système immunitaire (voir **Tableau 1**). La plupart des données de la littérature concerne l'impact de l'IDO et de la carence en tryptophane sur l'activité des lymphocytes T, et finalement peu de données sont disponibles sur l'impact de la carence en d'autres AAI que le tryptophane.

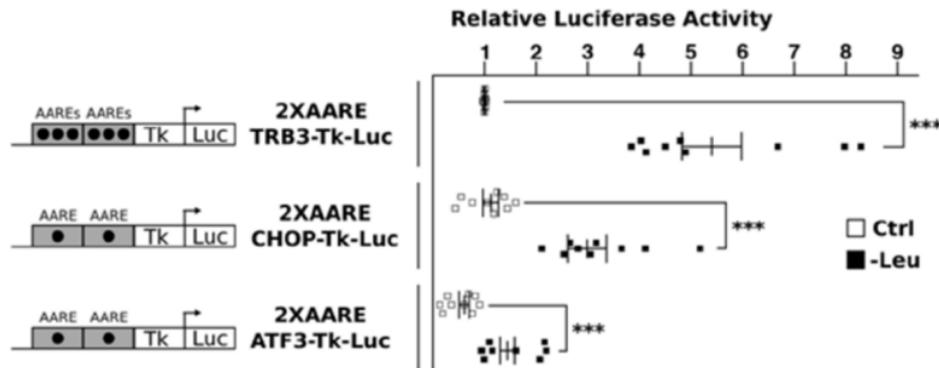
CHAPITRE III. NUTRIREG : UN SYSTÈME DE RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNÉRIQUE QUI IMPLIQUE LA VOIE GCN2-ATF4

La thérapie génique a progressé ces dernières années et des protocoles cliniques sont actuellement testés chez l'homme. Néanmoins, plusieurs obstacles doivent être surmontés avant que ce type de thérapie soit couramment utilisé. Une limitation majeure à l'utilisation de la thérapie génique est la nécessité de moduler l'expression d'un transgène en termes de durée et de niveau d'expression. La voie de signalisation GCN2-ATF4 a ainsi été utilisée par l'équipe PROTEOSTASIS (INRAe Clermont-Ferrand, site de Theix) pour mettre au point un système de régulation de l'expression d'un transgène, appelé NUTRIREG (Chaveroux et al., 2016). Ce système a été mis au point dans l'objectif de pouvoir réguler de manière exogène et réversible l'expression de gènes thérapeutiques dans le cadre de thérapie génique. Il est basé sur l'association (i) d'un promoteur artificiel (sur la base des AARE) fortement inductible par une carence en un acide aminé indispensable (AAI) qui contrôle l'expression d'un transgène (AARE-Gène) avec (ii) une nourriture carencée en un AAI qui entraîne une forte baisse de la concentration sanguine de l'AAI limitant et permet l'induction de la voie de signalisation GCN2/ATF4.

I. La construction génétique délivrant le transgène

Les séquences AARE utilisées dans la construction génétique de NUTRIREG correspondent aux séquences AARE du gène *TRB3*. En effet, plusieurs séquences ont été testées par transfection de fibroblastes embryonnaires murins avec une combinaison de séquences AARE des gènes *TRB3*, *CHOP*, ou *ATF3* (gènes cibles connus d'ATF4) avec deux types de promoteur minimal : thymidine kinase (TK) ou β -globine, en amont du gène rapporteur luciférase.

A



B

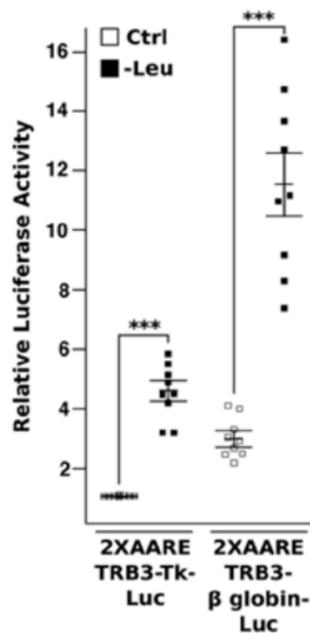


Figure 26. Sélection des séquences AARE et du promoteur pour une construction NUTRIREG optimale. **A.** Comparaison des activités luciférase obtenues en réponse à une carence en leucine avec les séquences AARE de *TRB3*, *CHOP* ou *ATF3*, en association à un promoteur TK contrôlant l'expression de la luciférase. **B.** Comparaison des activités luciférase obtenues en réponse à une carence en leucine avec les séquences AARE de *TRB3*, en association à un promoteur TK ou β -globine, contrôlant l'expression de la luciférase (d'après Chaveroux et al., 2016).



Figure 27. Construction génétique de la technologie NUTRIREG. La construction est composée de 2 séquences AARE du gène *TRB3* (2XAARE-*TRB3*) associée au promoteur Thymidine Kinase, qui contrôle l'expression du transgène étudié (d'après Chaveroux et al., 2016).

La séquence AARE qui permettait d'obtenir le signal luciférase le plus fort suite à une carence en leucine était celle du gène *TRB3* (**Figure 26A**). **Le promoteur β -globine** en association aux séquences AARE de *TRB3* permettait d'obtenir un signal luciférase plus fort qu'avec le promoteur thymidine kinase, mais au prix d'un bruit de fond en milieu contrôle plus fort également, avec un taux d'induction finalement identique entre les deux promoteurs (**Figure 26 B**). La construction utilisée ensuite pour développer NUTRIREG était donc constituée de 2 séquences AARE du gène *TRB3* (2XAARE-*TRB3*) associées au promoteur TK, en amont du transgène d'intérêt (**Figure 27**).

II. L'inducteur : un régime carencé en un AAI

Après avoir délivré le plasmide AARE-Gène à un tissu cible en utilisant un vecteur viral (lentivirus ou AAV le plus souvent), l'expression du transgène peut être ainsi induite après la consommation d'un régime alimentaire déficient en un AAI. En effet, comme décrit précédemment, la consommation d'un tel régime va entraîner une diminution importante et rapide de la concentration plasmatique de l'AA manquant, activant alors la kinase GCN2 et sa voie de signalisation d'aval, jusqu'à l'induction de l'expression du facteur de transcription ATF4, qui *via* sa fixation sur les éléments de réponse aux AA, entraînera l'expression du transgène placé sous la dépendance du promoteur (**Figure 28**).

III. Preuves de concept avec un gène rapporteur

La fonctionnalité du système NUTRIREG a d'abord été testé *in vivo* avec le gène *luciférase* comme gène rapporteur, grâce à un modèle de souris transgénique bioluminescente dans lequel la construction AARE-TK-LUC a été intégré de manière stable (**Figure 29**) (*Chaveroux et al., 2015 ; Bruhat et Fafournoux, 2017*). La consommation d'un régime carencé en leucine par la souris entraîne une augmentation significative de bioluminescence au niveau de la cavité

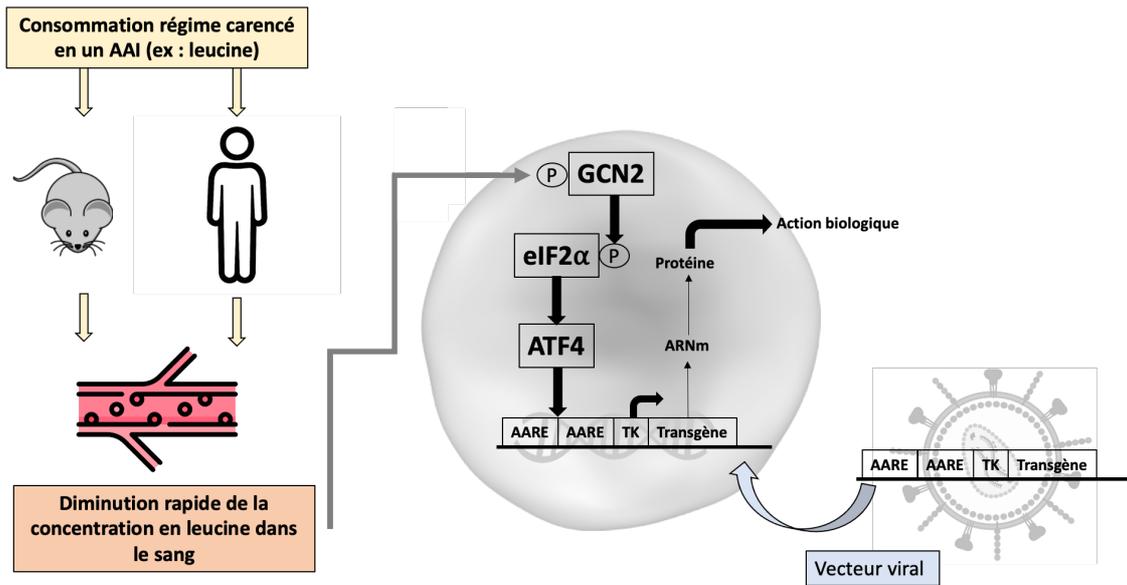


Figure 28. Principe général de la technologie NUTRIREG. La construction AARE-TK-Transgène est transduite dans les cellules ou tissus cibles à l'aide d'un vecteur viral (lentivirus, AAV). La consommation d'un régime carencé en un AAI (ex : leucine) entrainera une diminution rapide de la concentration plasmatique de cet AAI. Cette baisse de concentration activera la voie GCN2-eIF2 α -ATF4 dans les cellules ou tissus transduits en amont. ATF4 se fixera sur les séquences AARE de la construction NUTRIREG, entraînant une expression du transgène, qui sera ensuite traduit afin d'obtenir une action biologique.

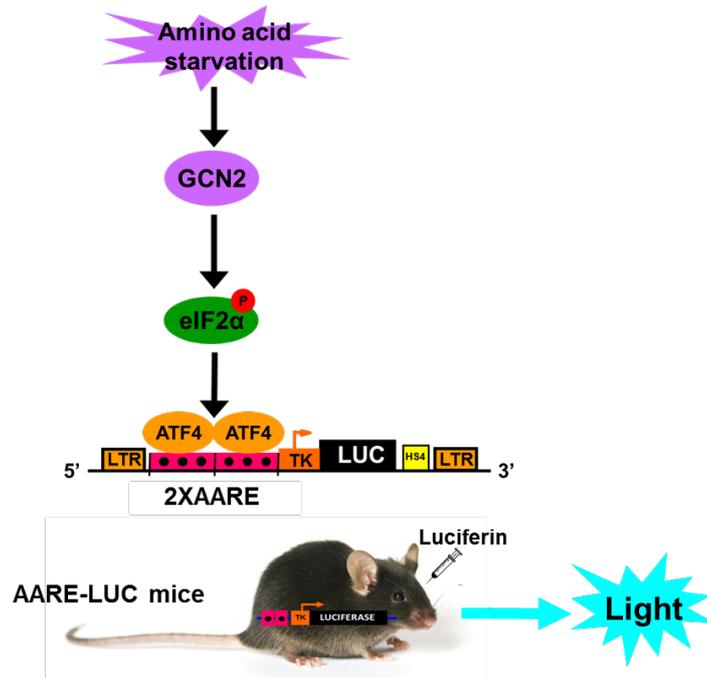


Figure 29. Le modèle de souris transgénique CARE-LUC. Ce modèle exprime de manière constitutive le gène luciférase sous la dépendance des éléments de réponse aux acides aminés et de la voie GCN2-ATF4. Il permet de monitorer facilement l'activité de la voie au niveau tissulaire et cellulaire suite à la consommation d'un régime carencé en un AAI, soit par mesure de l'activité enzymatique luciférase, soit par mesure en bioluminescence, soit par étude immuno-histochimique (d'après Chaveroux et al., 2015).

abdominale, dès 3 heures et ce jusqu'à 12 heures après la consommation du régime (**Figure 30 A**). Notons que le jeun, même sur des temps de 16 à 24 heures, n'induit pas l'expression du transgène (**Figure 30 B**), et qu'une carence de 6 heures en chacun des 9 AAI permet d'induire le gène rapporteur *luciférase* (**Figure 31**). De manière intéressante, la consommation alternée de régimes carencés en différents AAI avec des phases de consommation de régime complet permet de maintenir l'expression du transgène sur le long terme (*Chaveroux et al., 2016*). Le modèle de souris CARE-LUC a ainsi permis de valider la fonctionnalité du transgène AARE-TK-LUC en réponse à une carence en un AAI, mais aussi de visualiser les tissus dans lesquels le transgène et donc la voie GCN2-ATF4 sont induits, comme notamment le foie, le pancréas et le cerveau (**Figure 32**).

Les résultats ont été confirmés sur des souris non transgéniques par injection hydrodynamique dans le foie d'un plasmide portant la construction AARE-TK-LUC, ou par transduction à l'aide d'un lentivirus dans le pancréas ou l'hippocampe. Dans tous les cas, la consommation d'un régime carencé en un AAI permettait d'induire l'expression du transgène, et ce uniquement dans le tissu où la construction transgénique a été introduite (*Chaveroux et al., 2016*).

IV. Preuve de concept avec un gène à orientation thérapeutique

Une autre preuve de concept a été apportée par une expérience menée dans un modèle de souris *nude* xéno greffée avec des cellules de glioblastome humain (tumeur maligne cérébrale) exprimant la luciférase de manière constitutive (Gli36-luciférase), ce qui permet de suivre l'évolution de la tumeur en bioluminescence. Une semaine après la xéno greffe, un lentivirus portant la construction AARE-TK-TRAIL a été injecté dans la tumeur, puis les souris ont été soumises soit à un régime contrôle, soit à un régime alternant différentes carences en AAI, pendant 2 semaines. L'expression du transgène TRAIL (cytokine se liant à des récepteurs de mort cellulaire afin d'induire une apoptose) a permis une diminution significative de la

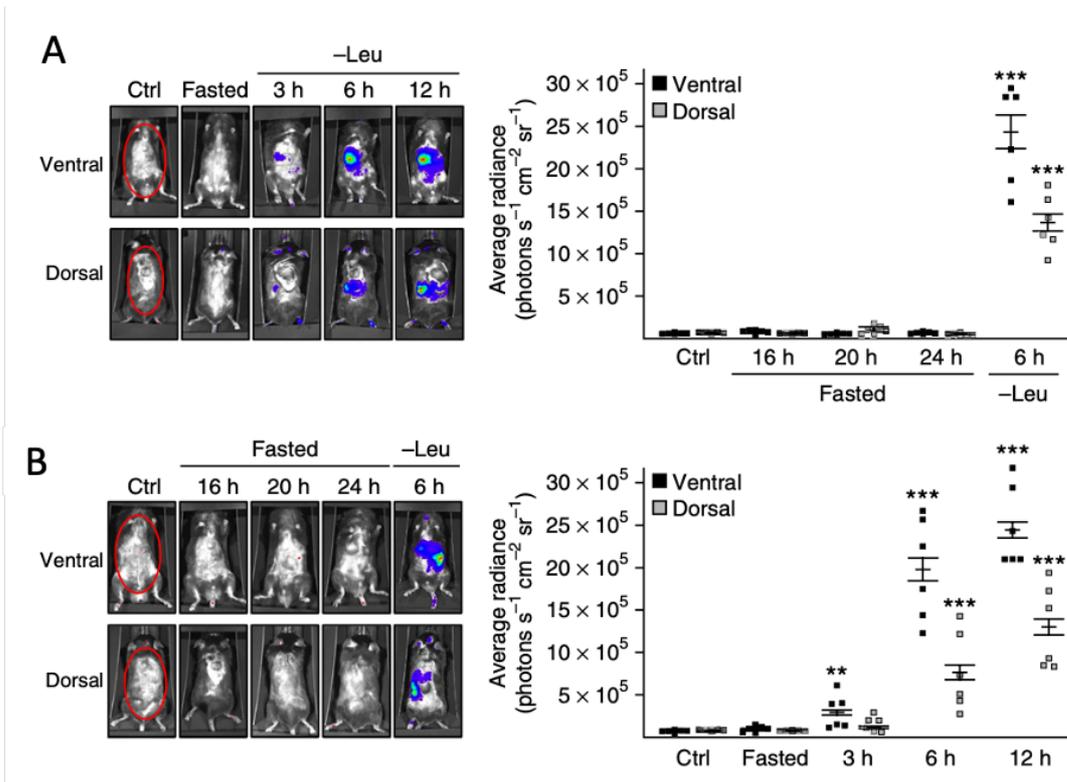


Figure 30. Preuve de la fonctionnalité du transgène AARE-TK-LUC après consommation d'un régime carencé en leucine chez la souris bioluminescente CARE-LUC. A. La consommation d'un régime carencé en leucine entraîne une augmentation de bioluminescence dès 3 heures après la consommation du régime, en comparaison aux souris soumises à un régime contrôle, avec un signal qui augmente avec le temps. **B.** Le jeun d'une durée de 16h à 24h n'induit pas d'expression du transgène luciférase (d'après Chaveroux et al., 2016).

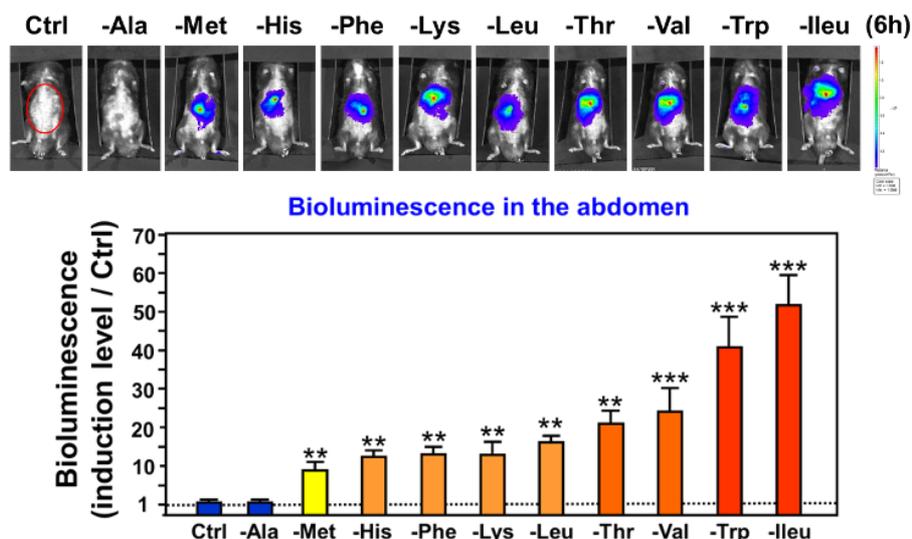


Figure 31. Preuve de la fonctionnalité du transgène AARE-TK-LUC après consommation d'un régime carencé de 6h en chacun des 9 AAI chez la souris bioluminescente CARE-LUC. (d'après Chaveroux et al., 2016)

croissance tumorale dans le groupe de souris traitées par rapport au groupe contrôle, avec une diminution significative de la bioluminescence émise par la tumeur, et de sa taille, sans effet toxique notable (**Figure 33**).

V. Les avantages de la technologie NUTRIREG

Un point essentiel est celui de la réversibilité du système : la consommation de l'AAI manquant dans le régime carencé permet de restaurer rapidement une concentration sanguine normale de cet AAI, et de réprimer rapidement l'expression du transgène. Chaque AAI peut être un inducteur potentiel, avec des capacités d'induction variant d'un AAI à un autre, rendant ce système extrêmement flexible. Pour résumer, le système NUTRIREG a donc de nombreux avantages : (i) utilisation d'un mécanisme moléculaire endogène (ne nécessitant ainsi pas d'inducteur pharmacologique ni d'expression de protéines régulatrices) ; (ii) absence de toxicité suite à l'ingestion sur une période courte d'un régime carencé en un AAI ; (iii) rotation de plusieurs régimes carencés en AAI permettant une expression plus longue du transgène sans effet indésirable ; (iv) possibilité de cibler différents organes; (v) réversibilité du système permettant d'induire l'expression du transgène de manière transitoire (*Chaveroux et al., 2016*).

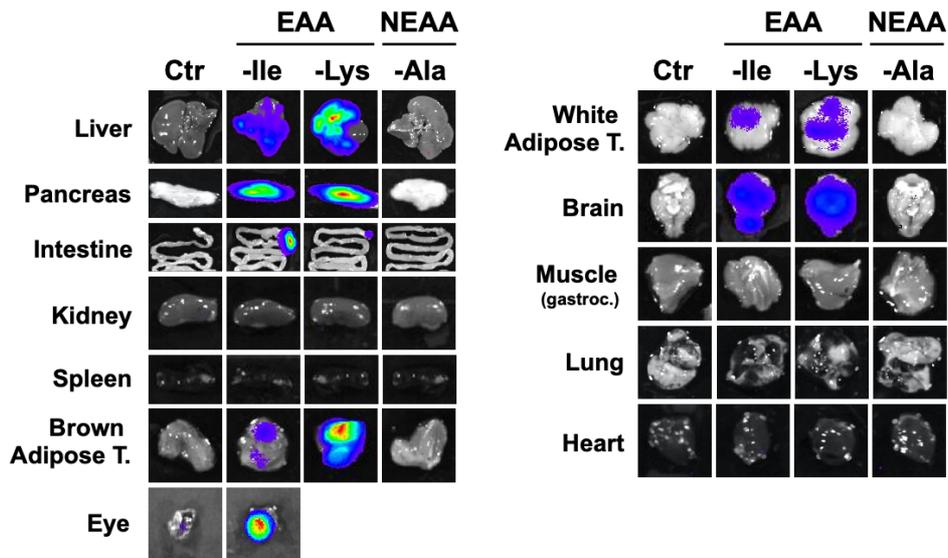


Figure 32. Visualisation des tissus dans lesquels la voie GCN2-ATF4 est induite lors de la consommation d'un régime carencé en un AAI (6h) grâce au modèle de souris bioluminescente CARE-LUC. La consommation d'un régime carencé en un AAI (*Essential Amino Acid* EAA) pendant 6 heures induit une forte expression du transgène AARE-TK-LUC dans le foie, le pancréas, le tissu adipeux brun et blanc, ainsi que dans l'œil et le cerveau. La consommation d'un régime carencé en alanine (*Non Essential Amino Acid* NEAA) n'induit pas d'expression du transgène (*d'après Chaveroux et al., 2015*).

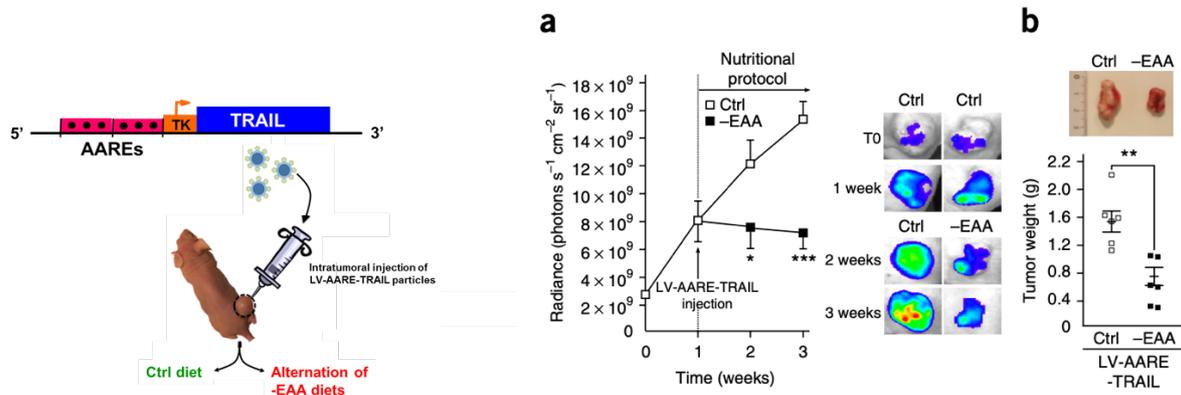


Figure 33. Preuve de la fonctionnalité du transgène AARE-TK-TRAIL dans un modèle murin de glioblastome. Expérience menée dans un modèle de souris *nude* xénotreffée avec des cellules de glioblastome humain exprimant la luciférase de manière constitutive (Gli36-luciférase). Une semaine après la xénotrefe, un lentivirus portant la construction AARE-TK-TRAIL était injecté dans la tumeur, puis les souris étaient soumises à un régime contrôle ou à un régime alternant différentes carences en AAI (-EAA diets), pendant 2 semaines. L'expression du transgène TRAIL entraînait une diminution significative de la croissance tumorale dans le groupe de souris carencées, avec une diminution significative de la bioluminescence émise par la tumeur, et de sa taille (*d'après Chaveroux et al., 2016*).



OBJECTIFS DU

TRAVAIL

Ce travail de thèse s'articulait en trois grands objectifs.

Le **premier objectif** était plutôt descriptif. En effet, afin de pouvoir développer NUTRIREG dans le domaine de l'immunothérapie cellulaire, il fallait tout d'abord vérifier qu'il était possible d'induire la voie GCN2-ATF4 dans les lymphocytes T humains par des carences en acides aminés indispensables. Il fallait également définir dans quelles conditions, et en particulier à quel temps et avec quel AAI, la voie GCN2-ATF4 serait induite de manière optimale dans ce type cellulaire. Enfin, il fallait évaluer l'impact d'une carence en AAI sur la fonctionnalité du lymphocyte T.

Le **second objectif** visait à établir une preuve de concept de la fonctionnalité de NUTRIREG dans les lymphocytes T humains *in vitro*, à l'aide de gènes rapporteurs (luciférase et eGFP), puis à l'aide d'un gène à orientation thérapeutique dans un contexte de GvH.

Le **dernier objectif** visait à valider *in vivo* les résultats obtenus *in vitro*, par injection de lymphocytes T humains transduits avec une construction NUTRIREG à des souris immuno-déficientes, puis soumises ou non à un régime carencé en un AAI.



RESULTATS

EXPERIMENTAUX

Ce travail de thèse a tout d'abord abouti sur un **dépôt de brevet** (EP22306008) en juillet 2022, située en annexe du manuscrit.

Une fois nos résultats protégés, nous avons **soumis un article à la revue *Blood***, inséré en première partie de ce chapitre.

Les **résultats complémentaires de cette publication**, qui seront valorisés ultérieurement, se situent en deuxième partie du chapitre.

PUBLICATION SOUMISE

Objectifs

Les objectifs de ce travail soumis pour publication étaient de décrire les conditions d'activation de la voie GCN2-ATF4 par une carence en un Acide Aminé Indispensable (AAI) dans les lymphocytes T (LT) humains *in vitro*, puis d'établir une preuve de concept de la fonctionnalité du système NUTRIREG dans ce type cellulaire, *in vitro* puis *in vivo*.

Résultats principaux

- La voie GCN2-eIF2 α -ATF4 peut être induite par une carence en un AAI dans les LT humains, y compris sur des temps courts (dès 4 heures), quel que soit l'acide aminé manquant, mais cela nécessite impérativement que le lymphocyte T soit activé.
- Le système NUTRIREG est fonctionnel dans les LT humains *in vitro* avec la possibilité d'induire l'expression d'un transgène rapporteur (eGFP, luciférase) ou d'un transgène à orientation thérapeutique (IL-10).
- L'expression transitoire du transgène IL-10 sous la dépendance de NUTRIREG permet d'orienter le phénotype du LT vers un phénotype régulateur de type Tr1.
- La technologie NUTRIREG permet d'induire *in vivo* une expression contrôlée d'IL-10 suite à la consommation répétée d'un régime carencé en leucine.

Conclusion

La preuve de concept de la fonctionnalité de la technologie NUTRIREG dans les LT humains ouvre la voie vers une utilisation potentielle de ce système dans le traitement ou la prévention de la réaction du greffon contre l'hôte après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques grâce à l'orientation contrôlée et réversible du lymphocyte T vers un phénotype régulateur Tr1.

Title:

New insight in cell therapy management with a nutrition-based regulatory system of IL-10 gene expression in human T cells

Short title:

Nutritional regulation of IL-10 expression in human T cells

Authors:

Aurore Dougé^{1,2}, Cyrielle Vituret¹, Valérie Carraro¹, Laurent Parry¹, Cécile Coudy-Gandilhon¹, Richard Lemal^{3,4}, Lydie Combaret¹, Anne-Catherine Maurin¹, Julien Averous¹, Céline Jousse¹, Jacques-Olivier Bay^{2,3}, Pierre Verrelle⁵, Pierre Fafournoux¹, Paul Rouzairé*^{3,4} & Alain Bruhat*¹

Affiliations

¹ Team Proteostasis, UMR1019, INRAe, 63122 Saint-Genès-Champanelle (France)

² Medical Oncology department, CHU Gabriel Montpied, 63000 Clermont-Ferrand (France)

³ EA Chelater 7453, Université Clermont Auvergne, CHU Estaing 63003 Clermont-Ferrand (France)

⁴Histocompatibility and Immunogenetics department, CHU Gabriel Montpied, 63000 Clermont-Ferrand (France)

⁵Radiation Oncology department, Institut Curie, PSL Research University, 75005 Paris (France)

* Equally contribute to this work

Corresponding authors:

Paul Rouzairé & Alain Bruhat

porouzairé@chu-clermontferrand.fr; alain.bruhat@inrae.fr

ABSTRACT

Hematopoietic stem cell transplantation is the therapy of choice for many hematological malignancies. It thus develops a powerful anti-tumor effect called Graft versus Leukemia (GvL). Unfortunately, this is often accompanied by a toxic effect, called Graft versus Host (GvH), which is a major cause of morbidity and mortality. A flexible and reversible gene regulation system of the reinjected graft would thus allow a better management of the transplanted patients, by preserving the expected GvL effect, and by limiting the GvH effect. To this end, our results demonstrate the use in T cells of a gene expression regulation technology called NUTRIREG that exploits the physiological GCN2-ATF4 pathway, which is activated by a diet deficient in one essential amino acid (EAA). We first demonstrated that the GCN2-ATF4 pathway is inducible by an EAA deprivation in human T cells. We then assessed *in vitro* functionality of NUTRIREG in human T cells by reversibly regulating IL-10 production by T cells *in vitro*. We next demonstrated that transient expression of IL-10 in human T cells using NUTRIREG technology enabled to shape the immune response towards a Tr1 type phenotype. Finally, we validated the proof of concept of *in vivo* nutritional induction of IL-10 in human T cells using immunodeficient mice. Overall, our results represent a solid basis for the promising use of NUTRIREG to prevent or treat GvHD and more generally for numerous preventive or curative therapeutic possibilities in cellular immunotherapy strategies.

INTRODUCTION

Allogenic stem cell transplantation (allo-HSCT) has been the standard treatment of many hematological malignancies for years ¹. Allo-HSCT basically consists in the replacement of a patient's bone marrow with hematopoietic stem cells collected from a healthy donor, allowing hematopoietic and immune systems reconstitution but, above all, anti-tumor effect of donor lymphocytes (Graft-versus-Leukemia or GvL effect) ². Unfortunately, this procedure also has high toxicity such as graft versus host disease (GvHD) and infections, which limits its indications. These complications represent a major cause of morbidity and mortality, poor quality of life and an additional economic cost ³⁻⁴. To date, controlling allo-HSCT remains a challenge. It therefore seems important to provide a flexible and easily reversible gene expression regulation system to control the effects of these cells.

In this context, our results highlight the use in T cells of a gene expression regulatory technology called NUTRIREG that exploits a ubiquitous adaptive process known as the amino acid response pathway ⁵. A diet deficient in one essential amino acid (EAA) leads to a rapid and sharp decrease of the limiting EAA blood concentration, triggering the adaptive GCN2-ATF4 pathway ⁶⁻⁸. Firstly, GCN2 kinase is activated by uncharged tRNAs. Then, activated GCN2 phosphorylates the α -subunit of the eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF2 α), leading to upregulation of the Activating Transcription Factor 4 (ATF4) translation. ATF4 binds to Amino Acid Responsive Element (AARE) sequences in promoter sites to activate transcription of specific target genes involved in cellular stress adaptation ⁹⁻¹¹ (**Figure 1A**).

This GCN2-ATF4 pathway has therefore been harnessed to regulate transgene expression by NUTRIREG ^{5,12}. This technology is based on the association (i) of an artificial promoter (based on AARE sequences) strongly inducible by the lack of one EAA, which controls the expression of a transgene (AARE-Gene) with (ii) a diet deficient in an EAA. This leads to a sharp drop in the limiting EAA blood concentration and allows induction of the GCN2-ATF4 signaling

pathway. After having delivered the AARE-Gene plasmid to the target tissue using a viral vector, the transgene expression can thus be induced by the consumption of a EEA deficient diet. Interestingly, the pathway can be rapidly deactivated by consumption of the missing EAA, providing a gene regulatory system that is easily reversible and free of adverse effects since it involves a physiological nutritional pathway. Proof of the functionality of this system has already been provided in mice, in different organs (liver, pancreas, brain, eye), but also in glioblastoma tumor cells thanks to the use of a pro-apoptotic gene ⁵.

In order to use the NUTRIREG technology in human T cells to have a therapeutic application in cellular immunotherapy, we first validated that the GCN2-ATF4 pathway is inducible by an EAA starvation in this cell type. We then assessed the *in vitro* functionality of NUTRIREG in human T cells and demonstrated that transient expression of IL-10 in human T cells *via* NUTRIREG was able to direct the immune response towards a Tr1 type response. Finally, we validated the proof of concept of *in vivo* nutritional induction of IL-10 in human T cells using immunodeficient mice.

METHODS

Preparation of human primary T cells

PBMCs were purified from buffy coats collected from healthy donors by the French Blood Establishment using Cytiva Ficoll-Paque™ PLUS (Fisher) and used fresh or frozen at -80°C. In a second step, human T cells were isolated from PBMCs using the human Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Germany) according to manufacturer's instructions. Isolated T cells were then resuspended in RPMI 1640 medium (PAN BIOTECH) at a density of $1-2 \times 10^6/\text{ml}$.

T cell activation

Purified human T cells were activated using human T Cell Activation/Expansion Kit (Miltenyi Biotec, Germany). Ratio of MACSiBead™ particles per cell was 1:2. RPMI medium containing 10% heat inactivated FBS was supplemented with human IL-2 IS (Miltenyi Biotec, Germany) at 50 IU/ml.

T cell culture and treatments

Activated human T cells were incubated in 10%FBS-RPMI medium supplemented with IL-2 at 37°C and 5% CO₂ for up to 14 days of expansion. When indicated, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (with 10% of dialyzed calf serum) lacking one essential amino acid was used (GENAXXON bioscience #C4207.0500). A control medium was simultaneously reconstituted by adding all nine EAAs. RPMI cultured human T cells were collected when needed and washed in PBS with centrifugation at room temperature at 300xg for 5 minutes. Cells were then resuspended either in reconstitute DMEM control or in DMEM lacking one EAA, at a density of $1 \times 10^6/\text{mL}$. DMEM was freshly supplemented with IL-2 (50 IU/mL) (or not, in experiments without IL-2). GCN2 inhibitor (GCN2i) was previously described^{13,14} and

generously provided by Merck KGaA. The compound was resuspended in DMSO and, if not mentioned otherwise, used at a final concentration of 2,5 μ M.

Plasmid constructions

2XAARE-TRB3-TK-eGFP, 2XAARE-TRB3-TK-LUC and 2XAARE-TRB3-TK-IL-10 plasmids were obtained by synthesizing cDNA sequences encoding eGFP, luciferase, or the human IL-10 (Interleukin-10) flanked by Nco1 and Xba1 restriction sites. DNA cassettes were then inserted in an HIV-INS vector containing two copies of the AAREs from the *Trib3* gene. 2XAARE TRB3-TK-eGFP, 2XAARE TRB3-TK-LUC and 2XAARE TRB3-TK-IL-10 lentiviruses were produced by VectorBuilder (Chicago, USA).

Lentiviral transduction

Primary human T cells were transduced 24 hours after activation. Cell suspension was centrifuged at 300xg for 5 minutes and cells pellet was resuspended in fresh RPMI supplemented with IL-2 at a density of 1×10^6 cells/mL, in a 48-wells plate (500 μ L per well). Lentiviral supernatant was then added to cell suspension with a multiplicity of infection of 5-10. Forty-eight hours after infection, fresh RPMI supplemented with IL-2 was added to the cell suspension (1 mL per well) and the cell suspensions were transferred to a 12-well plate and maintained for experimental purposes until 8 days after activation.

Immunoblot analysis and antibodies

Western blot analysis was performed as described above¹⁵. ATF4 (# 11815), GCN2 (# 3302), eIF2 α (# 9722) and normal rabbit IgG (# 7074) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology. Antibodies recognizing phosphorylated GCN2 (ab75836), and phosphorylated eIF2 α (ab32157) were from Abcam (Cambridge, UK) and the antibody recognizing actine (sc-47778) was from Santa Cruz. CD4-PerCP-Vio700 (REA623), CD8-VioBlue (REA734), CD45-

APC-Vio770 (REA747), CD69-APC (REA824), CD25-PE (REA570), CD223-APC (REA351), CD49b-FITC (REA188) and IL-10-PE (REA842) antibodies were purchased from Miltenyi Biotec (Germany).

Flow cytometry

For cell surface staining, human T cells were resuspended in 100 μ L of PBS. The antibodies were incubated in the dark at 4°C for 15 minutes. For intracellular analysis of human IL-10, staining was performed with the MACS Inside Stain Kit (Miltenyi Biotec 130-090-477) according to the manufacturer's instructions.

ELISA assay

For *in vitro* studies, IL-10 was measured in the media supernatant using the IL-10 human ELISA kit (ThermoFisher BMS215-2, *in vitro* studies). For *in vivo* studies, IL-10 was measured in plasma using the IL-10 Human ELISA Kit, High Sensitivity (ThermoFisher BMS215HS, *in vivo* studies) according to the manufacturer's instructions.

Gene expression analysis by real-time RT-qPCR

Real-time RT-qPCR was performed as previously described ¹⁵. Primers for the human sequences (**Table S1**) yielded PCR products of approximately 100–150 bp in size. To control RNA quality and complementary DNA synthesis, β -actin mRNA was used.

Luciferase biochemical assay

Luciferase assays were performed as previously described ⁵. Luciferase activities measured in cells extracts were normalized to protein content (relative light units per milligram of protein).

Ethics Statement

Maintenance of the mice and all experiments were conducted according to the guidelines formulated by the European Community for the use of experimental animals (2010/63/EU). Animal facilities were approved by the French veterinary department (IEN D6334515). Animal experiments were approved by the national regulatory committee of the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche, et de l'Innovation (APAFIS#6545).

Animals and experimental diets

Six-week-old NXG males (NOD-*Prkdc^{scid}-IL2rg^{Tml}*/Rj) were purchased from Janvier labs (SM-NXG-M). Animals were individually housed in plastic cages and subjected to a 12-h light/dark cycle at 22 °C, in a pathogen-free environment. For each experiment, five mice per group were used. Animals were excluded from the study if human T cells expansion in the blood failed at week 3 after injection. Experimental diets were manufactured in our institute facilities [Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité de Préparation des Aliments Expérimentaux, Jouy-en-Josas, France]. The animals had *ad libitum* access to food and water at all times, unless otherwise indicated. When indicated, the mice were exposed to a control diet or to a leucine-deficient diet for 16 hours. Examiners were not blinded with respect to diet administration and treatments. Prior to feeding the mice a leucine-deprived meal, a fasting period of 8 hours was required, and newly cleaned cages were provided for the mice during this period. Food intake was monitored in each experiment. Mice were weighed each week.

Preparation of human cells and injection in mice

Eight days prior to cell injection in mice, primary human TK-AARE-IL-10 T cells were prepared according to “Lentiviral transduction” section. The day of injection in mice, human PBMCs were irradiated at 30 Gy at Pavirma irradiation platform (LPC, Université Clermont Auvergne). The cells were then pooled and injected into the tail vein of the mice. Every mouse

received $10 \cdot 10^6$ of AARE-TK-IL-10 T cells and $5 \cdot 10^6$ of irradiated PBMCs in 250 μ L of sterile PBS.

Mice blood collection and analysis

Seven days after cell injection, and then once per week until week 3, 100 μ L of blood were collected by submandibular way in the mice after the 16 hour-exposition of control diet or leucine deficient diet. PBMCs were purified using Cytiva Ficoll-Paque™ PLUS (Fisher) and used freshly for flow cytometry analysis. Plasma (50 μ L) was immediately frozen at -20 °C.

Statistics

All statistical analyses were generated using GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) and all data are expressed as means \pm s.e.m. For the comparison between two or more experimental groups, statistical significance was assessed via Student's *t*-test or two-way ANOVA with an alpha level of 0,05. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

RESULTS

Essential amino acid deprivation induces the GCN2-ATF4 pathway in human T cells.

To subsequently be able to use the nutrition-based regulatory system NUTRIREG in human T cells, we first analysed the induction of the GCN2-ATF4 pathway in response to an EAA (leucine) starvation in this cell type (**Figure 1A**). Primary human T cells were incubated in leucine-free or control medium and the mRNA level for TRB3, a known target gene of the GCN2-ATF4 pathway¹¹, was measured. Kinetic analysis revealed that TRB3 mRNA levels increased after 4 h of leucine deprivation and reached a maximum after 8 h (**Figure 1B**). Similar results were obtained with CHOP and ASNS mRNA levels, two other known ATF4-target genes^{16,17} (**Supplementary figure 1A**). As expected, the induction of TRB3 mRNA level by leucine deprivation in T cells was completely lost after the addition of leucine in the culture medium demonstrating that the amino acid induction of the GCN2-ATF4 pathway can be rapidly and fully reversible in T cells (**Figure 1C**). We used a pharmacological inhibitor of GCN2 to demonstrate that the upregulation of TRB3 expression following 4-24h leucine starvation was fully dependent on this kinase (**Figure 1D**). Immunoblot analysis of protein expression in human T cells confirmed the role of GCN2 in the increase in eIF2 α phosphorylation and ATF4 protein abundance in response to leucine starvation (**Figure 1E**). Starvation of other EAAs was tested for their abilities to influence the activation of GCN2-ATF4 pathway in T cells. Upregulation of TRB3, ASNS and CHOP mRNA expression was possible with deprivation of each of the nine EAAs, with different levels of expression depending on starved EAA (**Figure 1F, Supplementary figure 1B**). Taken together, these data demonstrate that the GCN2-ATF4 pathway can be upregulated in primary human T cell following EAA starvation.

T cell activation is mandatory for the induction of the GCN2-ATF4 pathway in response to EAA starvation.

Primary human T cells were incubated either in control or leucine-free medium in the absence or in the presence of anti-CD3 and -CD28 antibodies. Absence of T cells activation resulted in a loss of TRB3 mRNA inducibility following a 6-24h leucine starvation (**Figure 2A**). These results were confirmed by an immunoblot analysis of GCN2, eIF2 α and ATF4 in human T cells. The absence of T cell activation led to a loss of GCN2 and eIF2 α phosphorylation and of the increase of ATF4 protein content in response to leucine starvation (**Figure 2B**). The supplementation of IL-2 in the starved culture medium also seemed to be important to obtain an optimal induction of GCN2-ATF4 pathway in CD3/CD28 activated T cells, since TRB3 mRNA expression level was lower in case of absence of IL-2 supplementation (**Figure 2C**). Thus, we demonstrate that activation of T cells is essential for the induction of the GCN2-ATF4 pathway in response to leucine starvation.

Impact of EAA deprivation on T cells state.

We next assessed the impact of EAA starvation on T cell activation state, by flow cytometry analysis of early activation marker CD69 and late activation marker CD25. Leucine starvation (6h or 16h) had no impact on CD25 expression since CD25 expression was ever very high in control T cells (**Figure 3A**). Six hours of leucine starvation had no significant impact on CD69 expression while 16h of leucine starvation led to a significant increase in CD69 expression on CD4⁺ T cells and to a non-significant increase in CD69 expression on CD8⁺ T cells (**Figure 3B**). This increase of CD69 expression following 16h leucine starvation seemed to be dependent on IL-2 supplementation in culture medium (**Supplementary figure 2A**). Interestingly, the impact of 16h starvation of each of EAA on CD69 expression was not the same between EAA (**Supplementary figure 2B**). For example, tryptophan deprivation led to the lowest increase of

CD69 expression, concordant with the lowest induction of TRB3 mRNA expression as shown in Figure 1F. These results support the fundamental role of T cell activation in GCN2-ATF4 pathway induction. We finally assessed whether leucine starvation could impact the functionality of T cells through analysis of mRNA expression profile of transcription factors or cytokines implicated in polarization of CD4⁺ T cells or in cytotoxicity. Leucine deprivation for 6 hours had little impact, as only FoxP3 mRNA expression increased significantly (**Figure 3C**). A longer period of leucine deprivation (16h) had more impact as the mRNA expression of many transcription factors or cytokines increased significantly. However, it appears that no CD4⁺ polarisation subtype was favoured.

NUTRIREG technology is functional in human T cells.

We then assessed the functionality of NUTRIREG in human T cells using the eGFP reporter gene. The eGFP coding sequence was inserted downstream of two copies of the *TRB3* AARE sequences associated with the TK minimal promoter in a lentiviral vector (**Figure 4A**). The transduction of the human T cells was performed 24 hours after their activation. The cells were incubated either in control or leucine-free medium 8 days after their activation. Measurement of fluorescence by flow cytometry demonstrated that a 16h leucine deprivation induced the expression of the eGFP transgene in T cells significantly (**Figure 4B**). Our experiments also showed that the induction of eGFP expression was highest in CD8⁺ T cells than in CD4⁺ T cells (**Figure 4C**). The induction of eGFP expression *via* NUTRIREG was possible in case of deprivation of each of the nine EAA, with different levels of expression according to starved EAA, leucine deprivation being one of the most effective inducers (**Figure 4D**). We used a pharmacological inhibitor of GCN2, to demonstrate that the induction of eGFP expression in response to leucine starvation was fully dependent on the GCN2 kinase (**Figure 4E**). In addition, analyses of co-expression of T cells CD69 and CD25 activation markers and of the

eGFP protein by flow cytometry enabled us to confirm the key necessity of T cells activation to induce the expression of the transgene under the control of NUTRIREG. Indeed, the non-activated cells (CD25⁻ CD69⁻) did not express eGFP, those moderately activated (CD69⁻ CD25⁺ or CD69⁺ CD25⁻) expressed it weakly, and the strongly activated cells (CD69⁺ CD25⁺) were those which expressed the highest level of eGFP protein (**Figure 4F**). We confirmed the functionality of NUTRIREG in human T cells by using the luciferase reporter gene (**Supplementary figure 3A**). The luciferase activity induction in response to leucine starvation was detectable earlier than eGFP, from 3 hours of leucine deficiency and reached a maximum after 9h (**Supplementary figure 3B**). Collectively, these results demonstrate the functionality of the NUTRIREG technology in human activated T cells.

Transient expression of IL-10 in human T cells via NUTRIREG enables to direct the immune response towards a Tr1 type response.

Data from the literature highlight that the transduction of T cells with an IL-10 lentivirus allows to direct the immune response towards a T regulatory type 1 (Tr1) type anti-inflammatory response^{18,19}. To transiently express IL-10 through the NUTRIREG technology, we inserted the IL-10 cDNA downstream of the Thymidine-Kinase (TK) promoter and two copies of the AARE sequences (2xAARE) in a lentiviral vector (**Figure 5A**). Transduction with the lentivirus carrying the 2xAARE-TK-IL-10 construct was carried out 24 hours after activation of the T cells which were then deprived of leucine 8 days later. We demonstrated that a 16h-leucine deprivation significantly induced the mRNA and protein expression of the IL-10 transgene, in comparison to the transduced T cells cultured in control medium and the non-transduced T cells starved for leucine (**Figure 5B**). The induction of IL-10 mRNA was completely lost 24h after the addition of leucine to the culture medium and IL-10 protein level decreased from 48h after the addition of leucine, demonstrating that the induction of IL-10 transgene via NUTRIREG

can be deactivated in T cells (**Figure 5C**). The delay between the disappearance of the mRNA and the protein is due to the stability of the IL-10 protein. As shown above with the eGFP reporter gene, IL-10 expression was higher in CD8⁺ T cells than in CD4⁺ T cells (**Figure 5D**). Type 1 regulatory T cells (Tr1) have a specific cytokine profile since they strongly express IL-10, and to a lesser extent TGF- β , GZMb, IFN- γ and IL-22 while they do not express IL-2, IL-4 and IL-17, nor the FoxP3 transcription factor²⁰. Our mRNA expression analysis showed that transient expression of the IL-10 transgene via NUTRIREG led to a Tr1 type transcription profile as shown by the cytokine and transcription factors profile IL-10⁺⁺ GZMb⁺ IL22⁺ IFN γ ⁺ FoxP3⁻ and IL4⁻ (**Figure 5E**). We also analysed surface co-expression of two markers CD49b and LAG-3 considered as specific to Tr1 cells²¹. To maximize the induction of marker expression without having the adverse effects of a long-term leucine deficiency, T cells were cultured in a leucine-deficient medium, and then returned for 24 hours to a medium containing this amino acid. Under these conditions, in which IL-10 is still detected (see above), we showed that CD49b/LAG-3 co-expression was significantly induced following leucine starvation (**Figure 5F**). Altogether, these results demonstrate that transient expression of the IL-10 via NUTRIREG in human T cells allowed to direct the immune response towards a Tr1 type response.

***In vivo* nutritional induction of Interleukin-10 expression in human T cells**

We then investigated the capacity of a diet deficient in one EAA to upregulate the AARE-driven IL-10 expression in human T cells injected into mice. Indeed, the lack of any of the EAAs in the diet of mammals represents a potential inducer of AARE-Gene transgene¹². As activation of T cells is mandatory for the EAA-induction of the GCN2-ATF4 pathway, we set up a mouse model in which we injected transduced human T cells in association with autologous irradiated human PBMCs. We assumed that transduced human T cells would be transiently activated by

irradiated PBMCs and that this activation would be sufficient for the GCN2-ATF4 pathway to be inducible by an EAA deficiency. Briefly, immunodeficient NXG mice were injected into the tail vein with human T cells transduced with lentivirus carrying the 2xAARE-TK-IL-10 construct and with human irradiated PBMCs and were then fed once a week until week 3 with either a control diet or a leucine-deficient diet for 16 hours (**Figure 6A**). Weekly flow cytometry analysis of PBMCs enabled us to follow the correct expansion of human CD45⁺ cells, with no significant impact of leucine deficient diet on expansion or in CD4⁺/CD8⁺ phenotype (**Figure 6B**). Human IL-10 was detected in plasma from week 1 in leucine-deficient diet group and was increasing over time with higher level in leucine-deficient group than in control group (**Figure 6C**). Collectively, these results demonstrate that the NUTRIREG technology is able to regulate *in vivo* IL-10 expression in activated human T cells.

DISCUSSION

Since the NUTRIREG technology uses GCN2-ATF4 pathway to induce a transgene expression, the first essential step was to validate that this pathway is inducible by an EAA deprivation in human T cells. Data from the literature previously highlighted the activation of this signalling pathway mainly in mice T cells in response to IDO (Indoleamine 2.3-Dioxygenase), halofuginone, or asparaginase ²²⁻²⁵, but only few data were available on GCN2-ATF4 pathway activation in response to AA deficiency in human T cells. Our experiments revealed that each individual EAA can act as a potential inducer of the GCN2-ATF4 pathway in T cells with different levels of inducibility between the 9 starved EAA. We also confirmed that leucine-deprivation-dependent transcription of ATF4 is entirely dependent on GCN2 and therefore independent of the other three kinases that can phosphorylate eIF2 (PERK, PKR and HRI) ²⁶. As already showed in other issues, GCN2-ATF4 pathway induction by EAA deprivation is fully reversible after supplementation of the starved EAA, which is a real safety point for NUTRIREG use ⁵. The need of T cell activation to enable the activation of GCN2 kinase had been described in mice T cells following culture in a tryptophan-deficient medium or with IDO exposition ^{22,23}, or in human T cells but starved with all of the 9 EAA during few days ²⁷, but no information was available for human T lymphocytes after short starvation of one EAA. Again, this data is a major advantage for NUTRIREG use in the field of cellular immunotherapy since transgene will be expressed only in activated T cells because the GCN2-ATF4 pathway cannot be induced in quiescent T cells, which represents an essential, physiological, safety control. Importantly, short-time leucine starvation appears to have no impact on T cell activation or function, which is important since NUTRIREG will mainly be used with short time EAA starvation in human.

These results allow thus to consider an application of NUTRIREG in the modulation of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). Allogeneic donor T cells

restore tumor immunomonitoring in transplanted patients, resulting in elimination of residual leukaemic cells, a phenomenon called the Graft *versus* Leukaemia (GvL) effect. Unfortunately, the GvL effect is often accompanied by the destruction of patient's normal tissues, the graft *versus* host disease (GvHD), which is a major side-effect of allo-HSCT. We propose here a preventive or curative control of GvHD with a NUTRIREG-T cells system comprising an IL-10 expression transgene promoting the expansion of human Tr1 lymphocytes, to slow down the cytotoxic response responsible for GvHD. T cell transduction with a IL-10 lentivirus has indeed been described as able to prevent GvHD in mouse models^{18,19}. We demonstrated *in vitro*, in human T cells with the AARE-driven IL-10 expression system, that leucine deprivation led to IL-10 mRNA transcription, then to IL-10 protein production and an orientation of T cells towards a Tr1 profile. Importantly, induction of IL-10 production is fully reversible after leucine supplementation. We also validated the proof of concept of *in vivo* nutritional induction of IL-10 in a mouse model in which human T cells were activated by autologous PBMCs. Hence, donor T cells (present in allo-stem cells in the graft, or in secondary Donor Lymphocytes Injection) could genetically be modified *ex vivo* with a lentiviral vector including a Tr1-inducing transgene before reinjection into the patient. This could allow, by simple consumption for a few hours of a diet deficient in an EAA, (i) to express this Tr1-inducing transgene in activated T cells (which are responsible of GvHD), and (ii) to promote the polarisation of the T cells response towards a Tr1 regulatory phenotype. The On/Off modulation enabled by the NUTRIREG technology in T cells is furthermore a key asset since the consumption of the missing EAA will stop the expression of the transgene that promotes human T cell differentiation into Tr1 in due time, preserving thus anti-tumoral effect of the graft, which is not possible with traditionally transduced T cells or immunosuppressive drugs used in standard care.

To conclude, our results represent a solid basis for the promising use of NUTRIREG to prevent or treat GvHD. It opens up also numerous preventive or curative therapeutic possibilities in cellular immunotherapy strategies, whether to curb their toxicity or, on the contrary, to stimulate their effectiveness.

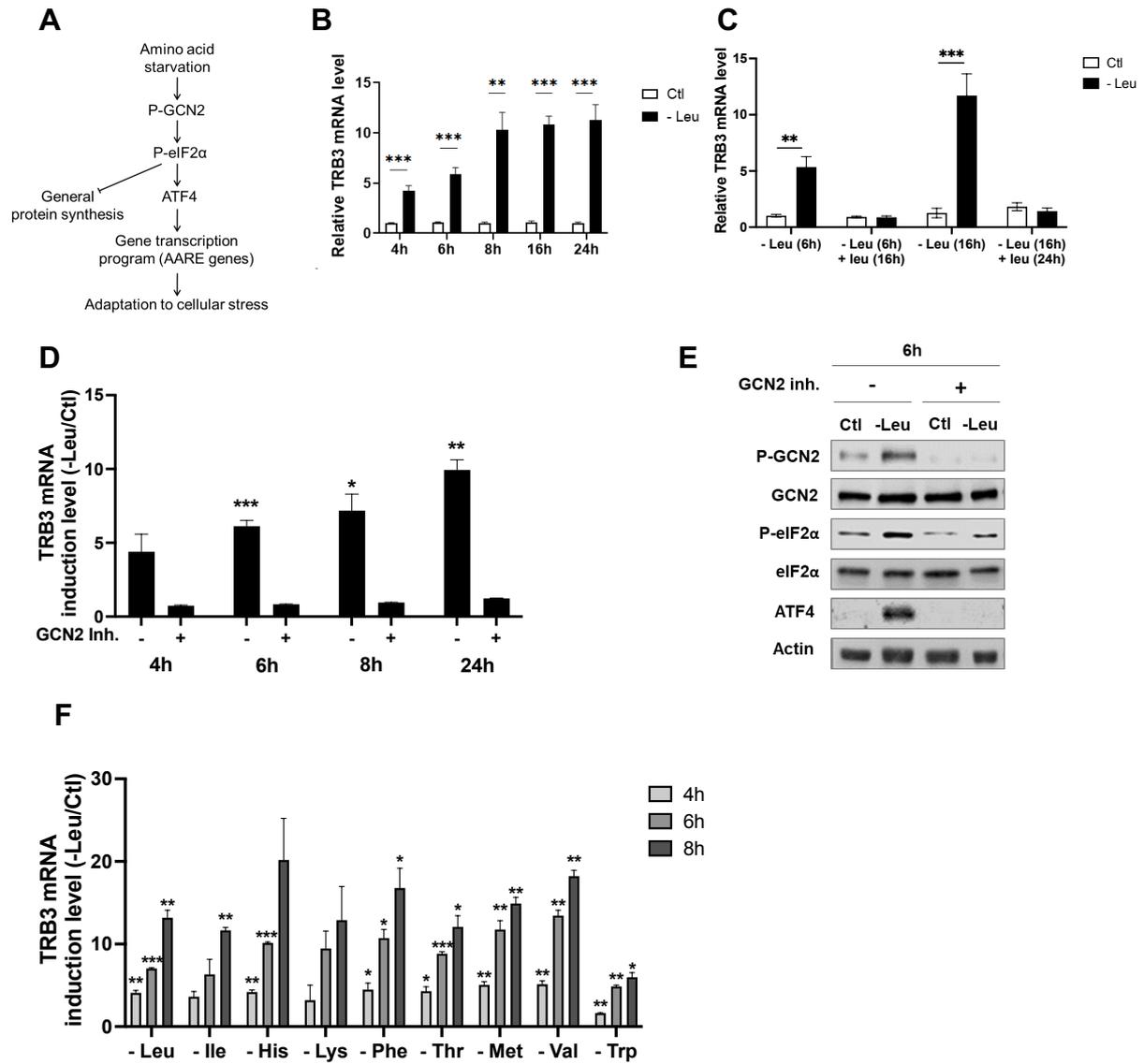


Figure 1. EAA deprivation induces the GCN2-ATF4 pathway in human primary T cells.

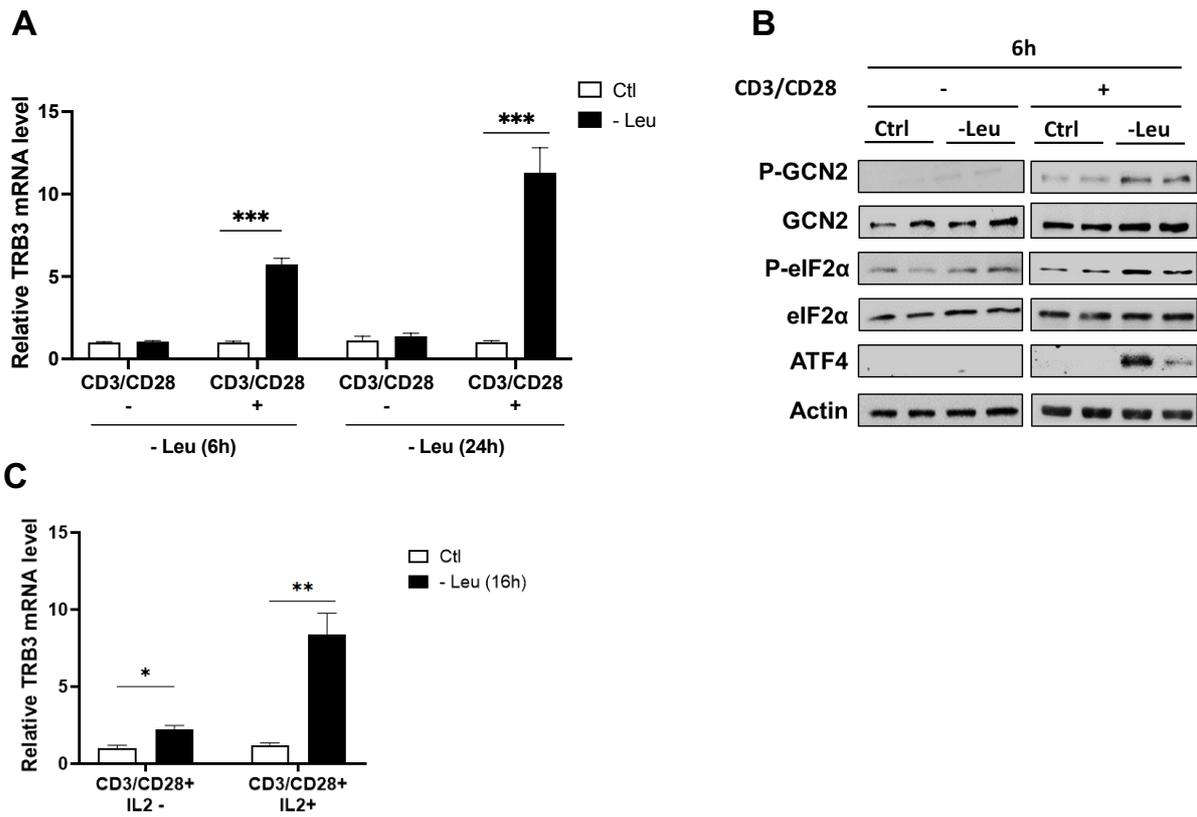


Figure 2. T cell activation is mandatory for GCN2-ATF4 pathway induction by an EAA deprivation.

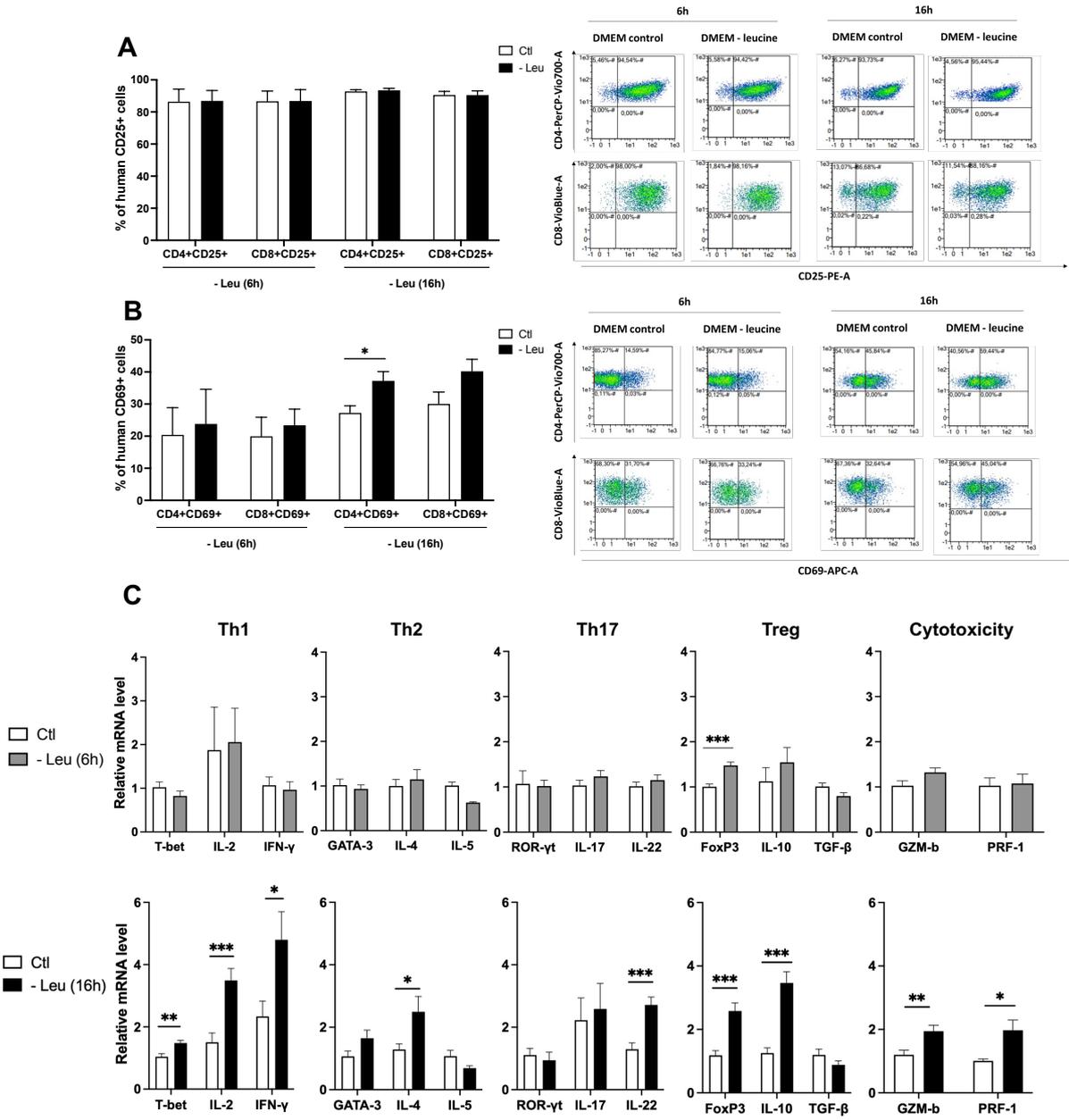


Figure 3. EAA deprivation does not alter the state of T cells.

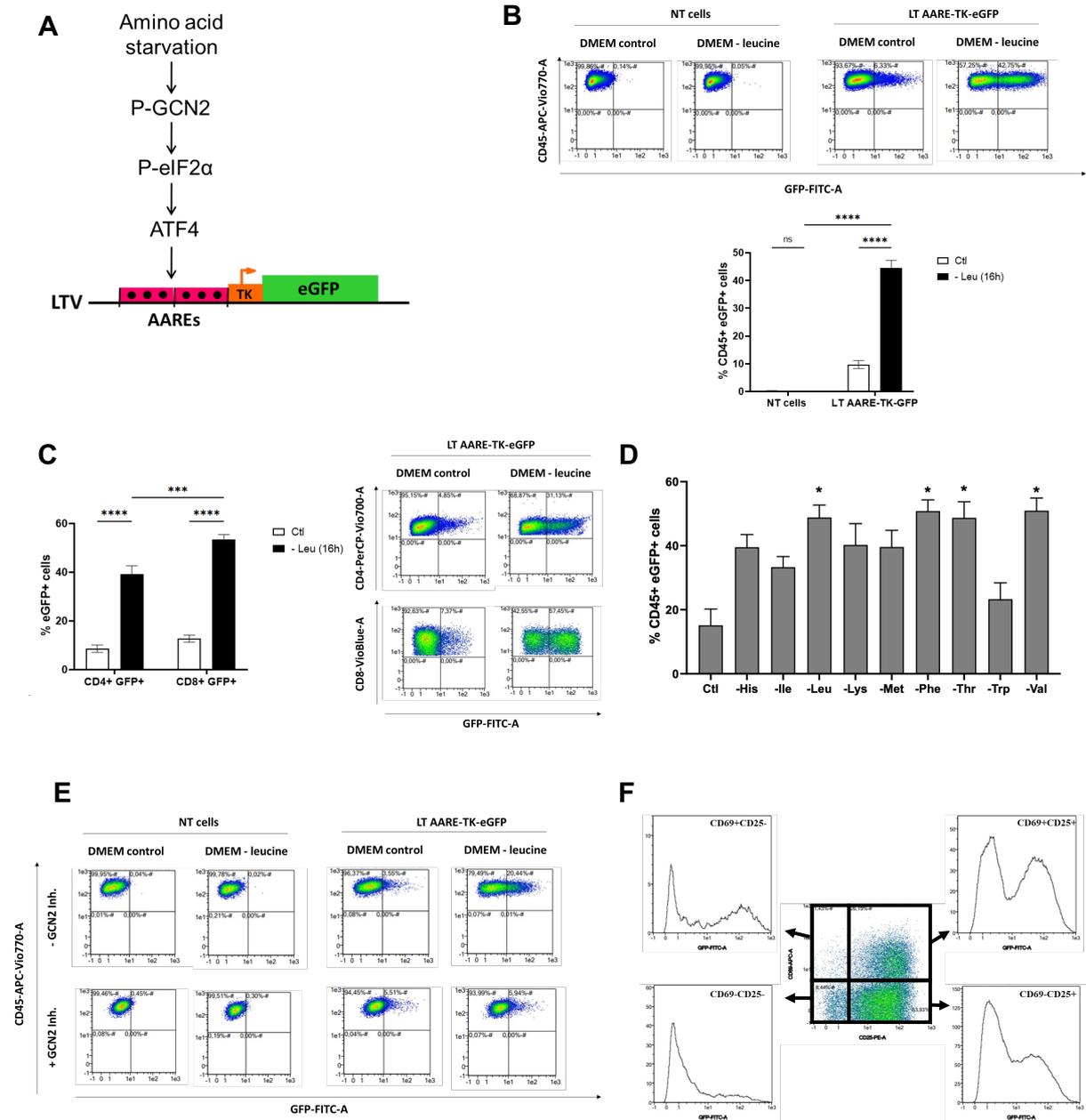


Figure 4. NUTRIREG allows conditional expression of the eGFP reporter gene in human T cells.

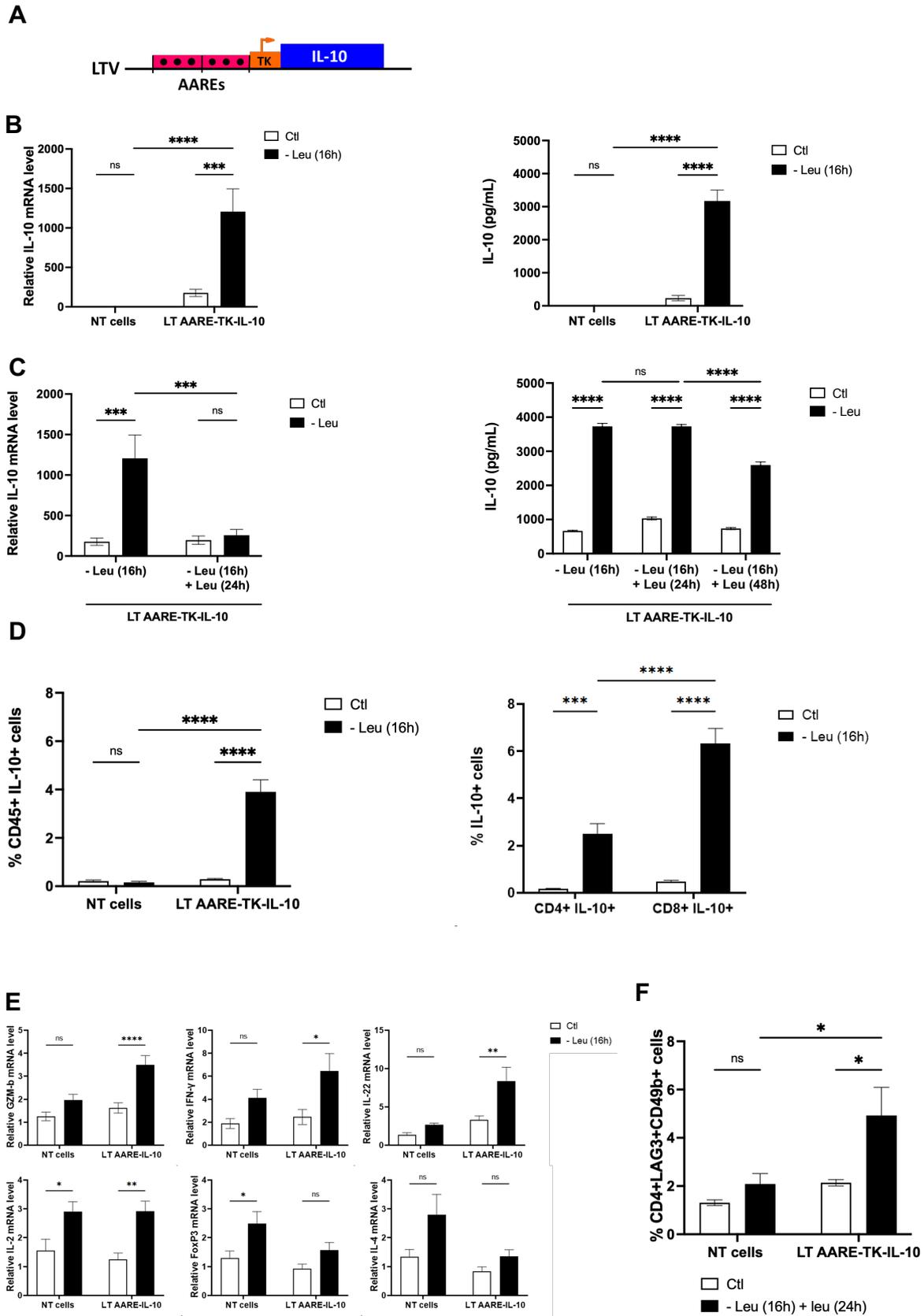
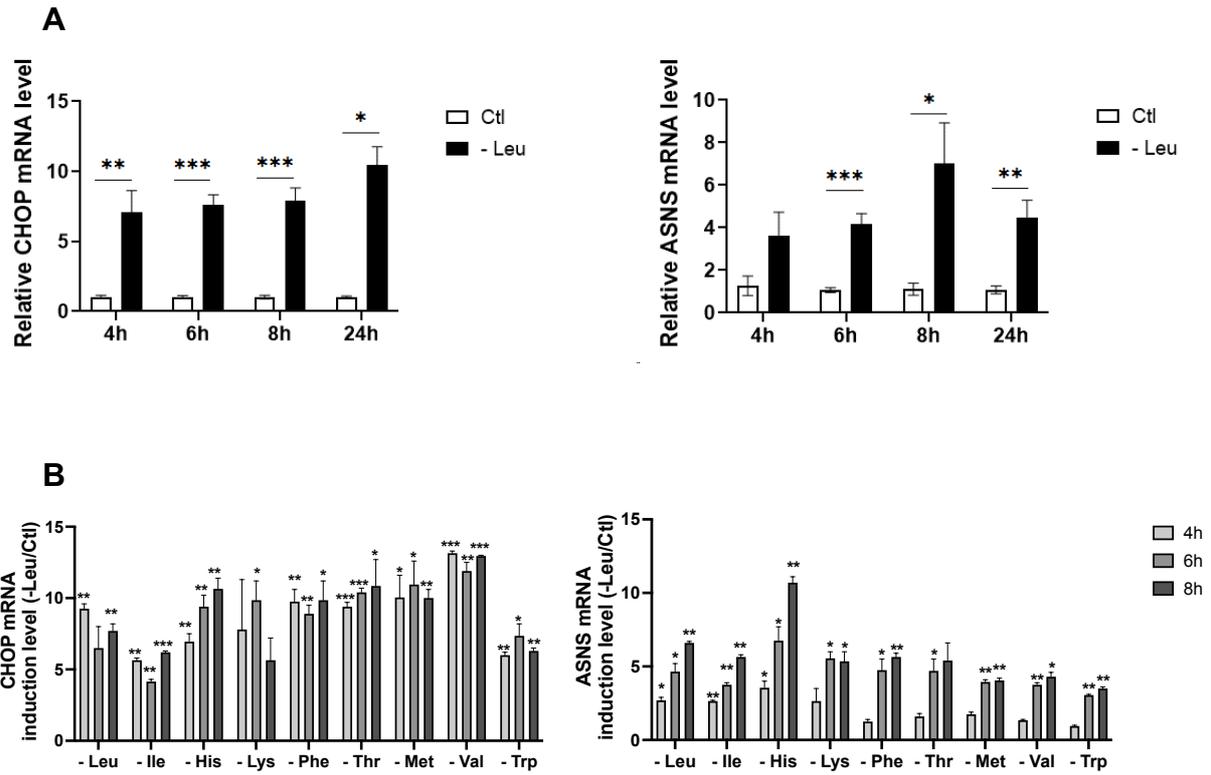
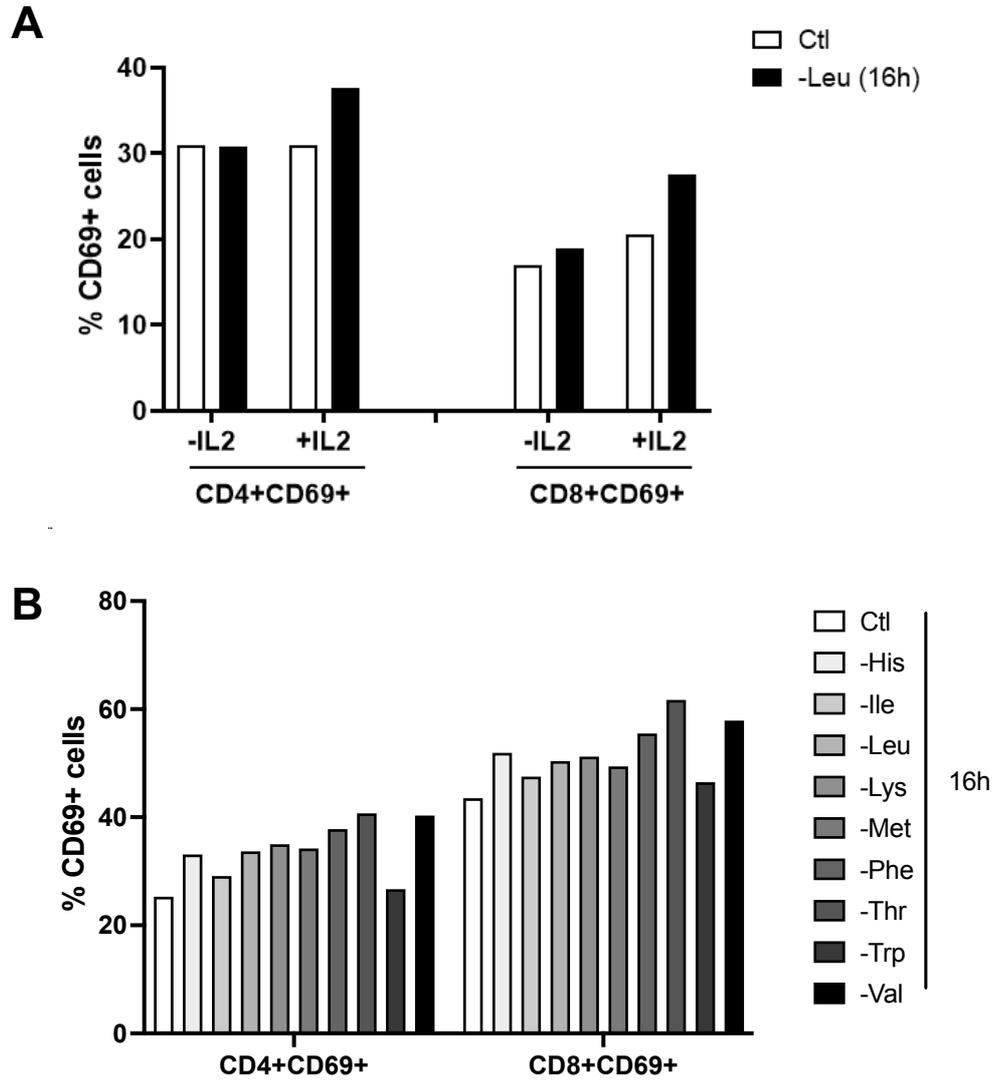


Figure 5. Transient expression of IL-10 in human T cells enables to direct the immune response towards a Tr1 type response.

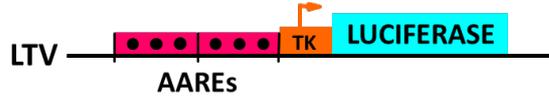


Supplementary figure 1. Validation of GCN2-ATF4 pathway inducibility by EAA starvation in human primary T cells.

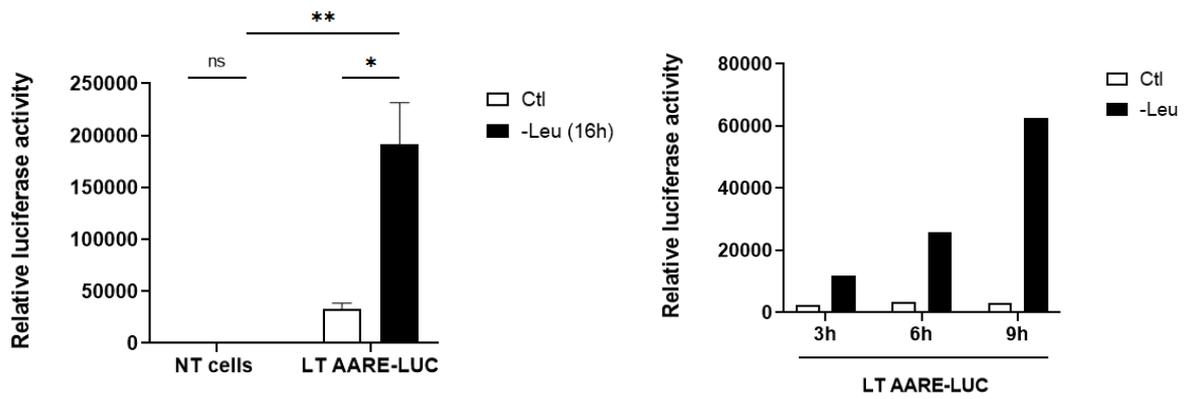


Supplementary figure 2. Impact of EAA starvation on T cells state.

A



B



Supplementary figure 3. Validation of NUTRIREG functionality in human T cells with the luciferase (LUC) reporter gene.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. EAA deprivation induces the GCN2-ATF4 pathway in human primary T cells.

(A) Scheme of the eIF2 α -ATF4 pathway. GCN2 is induced by essential amino acid starvation. This kinase is active in its phosphorylated form (P-GCN2). The phosphorylation of eIF2 α upregulates the translation of ATF4 mRNA. The transcription factor ATF4 enhances the transcription of many AARE-dependent genes that play a critical role in the adaptation to cellular stress. **(B)** Kinetics of GCN2-ATF4 pathway induction by leucine deprivation. Primary activated human T cells were incubated for 4-24h either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) and harvested after the indicated incubation times. TRB3 mRNA expression level was assayed by RT-qPCR and normalized on β -actin mRNA level (Student's t-test -Leu versus Ctl : ** P < 0.01 *** P < 0.001; n= 6 per condition; error bars, s.e.m.). **(C)** Reversibility of the GCN2-ATF4 pathway induction following leucine deprivation. Primary activated human T cells were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) for 6h or 16h, then leucine-starved T cells were supplemented with leucine and harvested after 16h or 24h of incubation. TRB3 mRNA expression level was assayed by RT-qPCR and normalized on β -actin mRNA level (Student's t-test -Leu versus Ctl : ** P < 0.01 *** P < 0.001; n= 6 per condition ; error bars, s.e.m.). **(D)** GCN2-dependency for TRB3 mRNA expression after leucine deprivation. Primary activated human T cells were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) supplemented with either DMSO (2,5uM) (GCN2 Inh. -) or pharmacological GCN2-inhibitor (2,5uM) (GCN2 Inh. +) and harvested after 4-24h of incubation. TRB3 mRNA expression level was assayed by RT-qPCR and normalized on β -actin mRNA level (Student's t-test -Leu versus Ctl : * P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001; n= 6 per condition ; error bars, s.e.m.). **(E)** GCN2 kinase dependency for eIF2 α -ATF4 pathway induction after leucine deprivation. Primary activated human T cells were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) supplemented with either DMSO (2,5uM) (GCN2

Inh. -) or pharmacological GCN2-inhibitor (2,5uM) (GCN2 Inh. +) and harvested after 6h of incubation. Western blot analysis of phospho-GCN2, total GCN2, phospho-eIF2 α , total eIF2 α , ATF4 and β -actin was performed as described in the « Material and Methods » section. **(F)** GCN2-ATF4 pathway induction by deprivation of one of the nine EAA. Primary activated human T cells were incubated either in control (Ctl) or one EAA-free medium and harvested after 4-8h of incubation. TRB3 mRNA expression level was assayed by RT-qPCR and normalized on β -actin mRNA level (Student's t-test –EAA versus Ctl : * P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001 ; n= 2 per condition ; error bars, s.e.m.).

Figure 2. T cell activation is mandatory for GCN2-ATF4 pathway induction by an EAA deprivation. **(A)** Impact of T cell activation on TRB3 mRNA expression induced by leucine deprivation. Primary human T cells were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) in the absence (CD3/CD28-) or in the presence (CD3/CD28+) of anti-biotin bead particles loaded with CD2, CD3 and CD28 antibodies (+IL2), and harvested after 6h or 24h of incubation. TRB3 mRNA expression level was assayed by RT-qPCR and normalized on β -actin mRNA level (Student's t-test –Leu versus Ctl: *** P < 0.001; n= 4-5 per condition; error bars, s.e.m.). **(B)** Impact of T cell activation on GCN2-ATF4 pathway induction by leucine deprivation. Primary human T cells were incubated for 6h either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu), in the presence or not of magnetic beads loaded with anti-CD2/CD3/CD28 antibodies + IL-2, and harvested after 6h of incubation. Immunoblot analysis of phospho-GCN2, total GCN2, phospho-eIF2 α , total eIF2 α , ATF4 and β -actin was performed. **(C)** Impact of IL-2 supplementation on TRB3 mRNA expression induced by leucine deprivation. Primary activated human T cells were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) in the absence (-IL-2) or in the presence (+IL-2) of IL-2 and harvested after 16h of incubation. TRB3 mRNA expression level was assayed by RT-qPCR and normalized on β -actin mRNA

level (Student's t-test -Leu versus Ctl: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; $n = 3$ per condition; error bars, s.e.m.).

Figure 3. EAA deprivation does not alter the state of T cells.

Primary activated human T cells were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) and harvested after 6h or 16h of incubation. **(A)** Impact of leucine deprivation on CD25 late activation marker. Expression of cell surface CD25 marker was analyzed by flow-cytometry. Results are expressed in percentage of cells with surface co-expression of CD4 or CD8 and CD25 activation marker (Student's t-test -Leu versus Ctl: * $P < 0.05$; $n = 3-14$ per condition; error bars, s.e.m.). Dot plots are extracted from a representative experiment. **(B)** Impact of leucine deprivation on CD69 early activation marker. Expression of cell surface activation CD69 marker was analyzed by flow-cytometry. Results are expressed in percentage of cells with surface co-expression of CD4 or CD8 and CD69 activation marker (Student's t-test -Leu versus Ctl: * $P < 0.05$; $n = 3-14$ per condition; error bars, s.e.m.). Dot plots are extracted from a representative experiment. **(C)** Impact of leucine deprivation on T cell condition. Primary activated human T cells were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) and harvested after 6h (left) or 16h (right) of incubation. Transcription factors or cytokines mRNA expression level was assayed by RT-qPCR and normalized on β -actin mRNA level (Student's t-test -Leu versus Ctl: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; $n = 3-24$ per condition; error bars, s.e.m.).

Figure 4. NUTRIREG allows conditional expression of the eGFP reporter gene in human T cells. **(A)** Schematic representation of 2xAARE-TK-eGFP construct. This construct was transduced through a lentiviral vector 24 h after activation of T cells. **(B)** Functionality of eGFP-NUTRIREG in CD45⁺ cells after leucine deprivation. Activated non-transduced T cells (NT

cells) or AARE-TK-eGFP transduced T cells (LT AARE-TK-eGFP) were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) and harvested after 16h of incubation. Expression of eGFP was analyzed by flow-cytometry. Results are expressed as percentage of cells with co-expression of CD45 and eGFP (Anova test -Leu versus Ctl and NT cells vs LT AARE-TK-eGFP: ns non-significant **** P < 0.0001; n = 2-9 per condition; error bars, s.e.m.). Dot plots are extracted from a representative experiment. **(C)** Functionality of eGFP-NUTRIREG in CD4⁺ and CD8⁺ cells after leucine deprivation. Primary activated human AARE-TK-eGFP transduced T cells (LT AARE-TK-eGFP) were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) and harvested after 16h of incubation. Expression of eGFP was analyzed by flow-cytometry. Results are expressed in percentage of cells with co-expression of CD4 or CD8 and eGFP (Anova test -Leu versus Ctl and CD4⁺ vs CD8⁺ T cells: *** P < 0.001 **** P < 0.0001; n = 9 per condition; error bars, s.e.m.). Dot plots are extracted from a representative experiment. **(D)** Functionality of eGFP-NUTRIREG in CD45⁺ cells after deprivation of one of the 9 EAA. Primary activated human AARE-TK-eGFP transduced T cells were incubated either in control (Ctl) or one EEA-free medium and harvested after 16h of incubation. Expression of eGFP was analyzed by flow-cytometry. Results are expressed in percentage of cells with co-expression of CD45 and eGFP (Student's t-test -EEA versus Ctl: * P < 0.05; n= 2 per condition; error bars, s.e.m.). **(E)** GCN2 kinase dependency of eGFP-NUTRIREG expression. Primary activated human non-transduced T cells (NT cells) or AARE-TK-eGFP transduced T cells (LT AARE-TK-eGFP) were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu), supplemented with either DMSO (- GCN2 Inh.) or pharmacological GCN2-inhibitor (+ GCN2 Inh.) and harvested after 16h of incubation. Expression of eGFP was analyzed by flow-cytometry. Dot plots are extracted from a representative experiment. **(F)** Impact of T cell activation on eGFP-NUTRIREG expression. Primary activated human AARE-TK-eGFP transduced T cells (LT AARE-TK-eGFP) were incubated either in control (Ctl) or leucine-free

medium (-Leu) and harvested after 16h of incubation. Co-expression of T cells CD69 and CD25 activation markers and eGFP was analyzed by flow-cytometry. Dot plots and histograms are extracted from a representative experiment.

Figure 5. Transient expression of IL-10 in human T cells enables to direct the immune response towards a Tr1 type response. (A) Schematic representation of 2xAARE-TK-IL-10 construct. (B) Functionality of IL-10-NUTRIREG in CD45⁺ cells after leucine deprivation at mRNA and protein levels. Primary activated human non-transduced T cells (NT cells) or AARE-TK-IL-10 transduced T cells (LT AARE-TK-IL-10) were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) and harvested after 16h of incubation. IL-10 mRNA expression level was assayed by RT-qPCR, normalized on β -actin mRNA level (left) and IL-10 concentration was assessed by ELISA (right) (Anova test -Leu versus Ctl and NT cells vs LT AARE-TK-IL-10: ns non-significant *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$; n = 6 per condition; error bars, s.e.m.). (C) Reversibility of IL-10 transgene expression following leucine deprivation. Primary activated human AARE-TK-IL-10 transduced T cells (LT AARE-TK-IL-10) were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) during 16h, then leucine-starved T cells were supplemented with leucine and harvested after 24h or 48h of incubation. IL-10 mRNA expression level was assayed by RT-qPCR, normalized on β -actin mRNA level (left) and IL-10 concentration was assessed by ELISA (right) (Anova test -Leu versus Ctl and -Leu (16h) vs -Leu (16h) + Leu (24h): ns non significant *** $P < 0,001$ **** $P < 0.0001$; n = 3-6 per condition; error bars, s.e.m.). (D) Functionality of IL-10-NUTRIREG in CD45⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells after leucine deprivation. Primary activated human non-transduced T cells (NT cells) or AARE-TK-IL-10 transduced T cells (LT AARE-TK-IL-10) were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) and harvested after 16h of

incubation. Expression of intra-cellular IL-10 was analyzed by flow-cytometry. Results are expressed as percentage of cells with co-expression of CD45 (left) or CD4/CD8 (right) and IL-10 (Anova test –Leu versus Ctl and NT cells vs LT AARE-TK-IL-10: ns non-significant *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$; n= 7-12 per condition; error bars, s.e.m.). **(E)** Induction of Tr1 cell profile by transient expression of IL-10. Primary activated human non-transduced T cells (NT cells) or AARE-TK-IL-10 transduced T cells (LT AARE-TK-IL-10) were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) and harvested after 16h of incubation. Transcription factors or cytokines mRNA expression level was assayed by RT-qPCR and normalized on β -actin mRNA level (Anova test –Leu versus Ctl and NT cells vs LT AARE-TK-IL-10: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$; n = 3-6 per condition ; error bars, s.e.m.). **(F)** Primary activated human non-transduced T cells (NT cells) or AARE-TK-IL-10 transduced T cells (LT AARE-TK-IL-10) were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) during 16h, then leucine-starved T cells were supplemented with leucine and harvested after 24h of incubation. Co-expression of CD49b and LAG-3 was analyzed by flow-cytometry. Results are expressed in percentage of cells with co-expression of CD4, CD49b and LAG-3 (Anova test –Leu versus Ctl ; NT cells vs LT AARE-TK-IL-10 ; and -Leu (16h) vs -Leu (16h) + Leu (24h) : ns non-significant ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; n = 5-6 per condition; error bars, s.e.m.).

Figure 6. *In vivo* regulation of Interleukin-10 expression in human T cells via NUTRIREG.

(A) Schematic representation of experimental design. NXG immunodeficient mice received $10 \cdot 10^6$ human T cells transduced with AARE-TK-IL-10 construct and $5 \cdot 10^6$ human irradiated PBMC by tail vein injection. Seven days later, and then once a week until week 3, mice were fed with a control diet or leucine deficient diet for 16 hours, prior to blood sampling for flow cytometry analysis and IL-10 measurement. **(B)**. Monitoring the expansion of human CD45+

cells in blood. PBMCs were analysed by flow cytometry every week from week 1 to week 3, after the mice had consumed the control diet or leucine deficient diet for 16h. Results are expressed as percentage of human CD45⁺ cells (left) or percentage of cells with co-expression of human CD45⁺ and CD4⁺ or CD8⁺ (Student's t-test –Leu (16h) versus Ctl: ns non-significant ; *n*= 4-5 per condition; error bars, s.e.m.). (C) Monitoring of human IL-10 in plasma. Plasmatic human IL-10 concentration was assayed by ELISA according to Methods section, every week from week 1 to week 3, just after mice consumption of control diet or leucine deficient diet for 16h (Student's t-test –Leu (16h) versus Ctl: ns non-significant ; *n*= 3-4 per condition; error bars, s.e.m.).

Supplementary figure 1. Validation of GCN2-ATF4 pathway inducibility by EAA starvation in human primary T cells. (A) Kinetics of GCN2-ATF4 pathway induction by leucine deprivation. Primary activated human T cells were incubated for 4-24h either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) and harvested after the indicated incubation times. CHOP (left) and ASNS (right) mRNA expression level were assayed by RT-qPCR and normalized on β -actin mRNA level (Student's t-test –Leu versus Ctl: * *P* < 0.05 ** *P* < 0.01 *** *P* < 0.001; *n*= 2-11 per condition; error bars, s.e.m.). (B) GCN2-ATF4 pathway induction by deprivation of one of the 9 EAA. Primary activated human T cells were incubated either in control (Ctl) or one EAA-free medium and harvested after 4-8h of incubation. CHOP (left) and ASNS (right) mRNA expression level were assayed by RT-qPCR and normalized on β -actin mRNA level (Student's t-test –EAA versus Ctl: * *P* < 0,05 ** *P* < 0,01 *** *P* < 0,001; *n*= 2 per condition; error bars, s.e.m.).

Supplementary figure 2. Impact of EAA starvation on T cells state. (A) Impact of IL-2 supplementation on increase of CD69⁺ expression induced by leucine deprivation. Primary activated human T cells were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) in the absence (-IL-2) or in the presence (+IL-2) of IL-2 and harvested after 16h of incubation. Expression of cell surface activation marker CD69 was analyzed by flow-cytometry. Results are expressed in percentage of cells with surface co-expression of CD4 or CD8 and CD69 (n = 1 per condition). (B) Impact of one of the 9 EAA deprivation on T cell activation. Primary activated human T cells were incubated either in control (Ctl) or one EAA-free medium and harvested after 16h of incubation. Expression of cell surface activation marker CD69 was analyzed by flow-cytometry. Results are expressed in percentage of cells with surface co-expression of CD4 or CD8 and CD69 (n = 1 per condition).

Supplementary figure 3. Validation of NUTRIREG functionality in human T cells with the luciferase (LUC) reporter gene. (A) Schematic representation of 2xAARE-TK-LUC construct. (B) Functionality of LUC-NUTRIREG in T cells after leucine deprivation. Primary activated human non transduced T cells (NT cells) or AARE-TK-LUC transduced T cells (LT AARE-TK-LUC) were incubated either in control (Ctl) or leucine-free medium (-Leu) and harvested after the indicated time of incubation. Expression of luciferase was measured and normalized on protein amount (Anova test -Leu versus Ctl and NT cells vs LT AARE-TK-LUC: ns non significant * P < 0.05 ** P < 0.01; n = 5 per condition; error bars, s.e.m.).

	Forward sequence	Reverse sequence
β-Actin	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
TRB3	TGGTACCCAGCTCCTCTACG	GACAAAGCGACACAGCTTGA
CHOP	GCCTTTCTCTTCGGACACTG	TGTGACCTCTGCTGGTTCTG
ASNS	ATCACTGTCTGGGATGTACCC	CTTCAACAGAGTGGCAGCAA
T-bet	AACCACCTGTTGTGGTCCAA	CCCGGCCACAGTAAATGACA
IL-2	AGACCCAGGGACTTAATCAGC	AATGGTTGCTGTCTCATCAGC
IFN-γ	GGCTTTTCAGCTCTGCATCG	ATGGGTCCTGGCAGTAACAG
GATA-3	GCATCCAGACCAGAAACCGA	CGAGCTGTTCTTGGGGAAGT
IL-4	GTGCACCGAGTTGACCGTA	GTTGTGTTCTTGGAGGCAGC
IL-5	CTCTTGGAGCTGCCTACGTG	AGCAGTGCCAAGGTCTCTTT
ROR-γt	GCTGCAAAGAAGACCCACAC	CCTCACAGGTGATAACCCCG
IL-17	GAGGACAAGAACTTCCCCCG	CTCTCAGGGTCCTCATTGCG
IL-22	GCCCTATATCACCAACCGCA	CCAAGCTAGCCTCCTTAGCC
FoxP3	TCTTCCTTGAACCCCATGCC	AAATGTGGCCTGTCCTGGAG
IL-10	TACGGCGCTGTCATCGATTT	ATTCTTCACCTGCTCCACGG
TGF-β	GGACCAGTGGGGAACACTAC	GCACTTCAACAGTGCCCAAG
GZM-b	GATCATCGGGGGACATGAGG	ATGGAGCTTCCCCAACAGTG
PRF1	ACCTTCATCCAAGCATGGGG	TATTGTCCCACACGGTGCTC

Supplementary Table S1. RT-qPCR primers sequences.

REFERENCES

1. Singh AK, McGuirk JP. Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Historical and Scientific Overview. *Cancer Research*. 2016;76(22):6445–6451.
2. Kolb H-J, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood*. 2004;103(3):767–776.
3. Voynova E, Kovalovsky D. From Hematopoietic Stem Cell Transplantation to Chimeric Antigen Receptor Therapy: Advances, Limitations and Future Perspectives. *Cells*. 2021;10(11):2845.
4. Ghimire S, Weber D, Mavin E, et al. Pathophysiology of GvHD and Other HSCT-Related Major Complications. *Front Immunol*. 2017;8:79.
5. Chaveroux C, Bruhat A, Carraro V, et al. Regulating the expression of therapeutic transgenes by controlled intake of dietary essential amino acids. *Nature Biotechnology*. 2016;34(7):746–751.
6. Maurin A-C, Jousse C, Averous J, et al. The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab*. 2005;1(4):273–277.
7. Chaveroux C, Lambert-Langlais S, Cherasse Y, et al. Molecular mechanisms involved in the adaptation to amino acid limitation in mammals. *Biochimie*. 2010;92(7):736–745.
8. Kilberg MS, Balasubramanian M, Fu L, Shan J. The transcription factor network associated with the amino acid response in mammalian cells. *Adv Nutr*. 2012;3(3):295–306.
9. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*. 2003;11(3):619–633.
10. Bruhat A, Jousse C, Carraro V, et al. Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol. Cell. Biol*. 2000;20(19):7192–7204.
11. Carraro V, Maurin A-C, Lambert-Langlais S, et al. Amino acid availability controls TRB3 transcription in liver through the GCN2/eIF2 α /ATF4 pathway. *PLoS ONE*. 2010;5(12):e15716.
12. Chaveroux C, Carraro V, Canaple L, et al. In vivo imaging of the spatiotemporal activity of the eIF2 α -ATF4 signaling pathway: Insights into stress and related disorders. *Sci Signal*. 2015;8(374):rs5.
13. Dorsch D, Hoelzemann G, Calderini M, Wegener A, Poeschke O. Triazolo[4,5-D]pyrimidine Derivatives for the Treatment of Diseases Such as Cancer. 2014;
14. Bröer A, Gauthier-Coles G, Rahimi F, et al. Ablation of the ASCT2 (SLC1A5) gene encoding a neutral amino acid transporter reveals transporter plasticity and redundancy in cancer cells. *J Biol Chem*. 2019;294(11):4012–4026.
15. B'chir W, Maurin A-C, Carraro V, et al. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(16):7683–7699.
16. Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, et al. Activation of the Human Asparagine Synthetase Gene by the Amino Acid Response and the Endoplasmic Reticulum Stress Response Pathways Occurs by Common Genomic Elements. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(35):26976–26985.
17. Averous J, Bruhat A, Jousse C, et al. Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J Biol Chem*. 2004;279(7):5288–5297.
18. Andolfi G, Foustero G, Rossetti M, et al. Enforced IL-10 Expression Confers Type 1 Regulatory T Cell (Tr1) Phenotype and Function to Human CD4⁺ T Cells. *Mol Ther*. 2012;20(9):1778–1790.

19. Locafaro G, Andolfi G, Russo F, et al. IL-10-Engineered Human CD4⁺ Tr1 Cells Eliminate Myeloid Leukemia in an HLA Class I-Dependent Mechanism. *Mol Ther.* 2017;25(10):2254–2269.
20. Song Y, Wang N, Chen L, Fang L. Tr1 Cells as a Key Regulator for Maintaining Immune Homeostasis in Transplantation. *Front Immunol.* 2021;12:671579.
21. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med.* 2013;19(6):739–746.
22. Munn DH, Sharma MD, Baban B, et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity.* 2005;22(5):633–642.
23. Van de Velde L-A, Guo X-ZJ, Barbaric L, et al. Stress Kinase GCN2 Controls the Proliferative Fitness and Trafficking of Cytotoxic T Cells Independent of Environmental Amino Acid Sensing. *Cell Rep.* 2016;17(9):2247–2258.
24. Sundrud MS, Koralov SB, Feuerer M, et al. Halofuginone inhibits TH17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response. *Science.* 2009;324(5932):1334–1338.
25. Bunpo P, Cundiff JK, Reinert RB, et al. The eIF2 kinase GCN2 is essential for the murine immune system to adapt to amino acid deprivation by asparaginase. *J. Nutr.* 2010;140(11):2020–2027.
26. Kilberg MS, Shan J, Su N. ATF4-DEPENDENT TRANSCRIPTION MEDIATES SIGNALING OF AMINO ACID LIMITATION. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(9):436–443.
27. Hayashi K, Ouchi M, Endou H, Anzai N. HOXB9 acts as a negative regulator of activated human T cells in response to amino acid deficiency. *Immunol Cell Biol.* 2016;94(6):612–617.

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES HORS PUBLICATION

Pour une meilleure lisibilité de ce chapitre, les figures présentant des résultats expérimentaux se trouvent intégrées dans le texte.

I. Analyse transcriptomique de l'impact d'une carence en leucine de 6 heures sur des lymphocytes T humains

1) Rationnel

Peu de données dans la littérature sont disponibles au sujet de l'impact d'une carence courte en leucine sur la fonctionnalité du lymphocyte T. Nous avons donc réalisé une analyse transcriptomique en utilisant la technique de séquençage de l'ARN (RNA-Seq) à partir de cellules T humaines cultivées en milieu complet ou en milieu carencé en leucine pendant 6 heures. Nous souhaitons également évaluer le rôle de GCN2 dans cet impact, et identifier des gènes dépendants de cette kinase dans les lymphocytes T. Nous avons donc ajouté dans l'analyse, des cellules T cultivées en milieu complet ou en milieu carencé en leucine pendant 6 heures, en présence d'un inhibiteur pharmacologique de GCN2.

2) Matériel et Méthodes

D'un point de vue expérimental, nous avons purifié des lymphocytes T (LT) humains à partir de cellules mononuclées obtenues à partir de poche de couche leucoplaquettaire issue de l'Établissement Français du Sang. Ces LT ont été activés par un système de billes chargées d'anticorps anti-CD2/CD3/CD28 (Myltenyi Biotec), en présence d'IL-2. Huit jours après la mise en culture, les cellules ont été lavées au PBS puis transférées en plaque 48 puits, avec une densité de 1.10^6 cellules par puits. Huit puits ont été cultivés en milieu DMEM complet (Ctl) et huit autres en milieu DMEM carencé en leucine (-Leu). Dans chaque condition, quatre puits

ont été supplémentés avec 2,5 μM d'un inhibiteur pharmacologique spécifique de GCN2, et quatre autres avec 2,5 μM de DMSO (pour s'assurer de l'absence d'effet de l'agent utilisé pour diluer l'inhibiteur de GCN2). Après 6 heures de culture, les cellules ont été centrifugées et les culots cellulaires ont été resuspendus dans un tampon de lyse spécifique avant d'extraire les ARN messagers par purification sur colonnes associée à un traitement à la DNase (kit NucleoSpin RNA - Macherey Nagel). Après avoir vérifié que la quantité d'ARNm était suffisante avec une qualité satisfaisante au Nanodrop, les échantillons ont été congelés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis transférés à la plateforme GenomEast située à Strasbourg. Cette plateforme a réalisé l'alignement des séquences sur le génome *Homo sapiens* (hg38), et quantifié l'expression des gènes qui présentaient des séquences à alignement unique, sans ambiguïté, soit près de 90% des gènes dans chaque échantillon.

3) Analyse en composantes principales

La plateforme a réalisé une analyse en composantes principales (**Figure 34**), avec identification de deux axes permettant d'expliquer 73,67% de la variance entre les groupes d'échantillons (46,8% par l'axe 1 et 26,87% par l'axe 2), soit un pourcentage acceptable. On peut remarquer qu'au sein de chaque groupe de condition, les échantillons sont proches, en faveur d'une reproductibilité satisfaisante des résultats. On peut également noter que l'inhibiteur de GCN2 a un effet propre, mais minime, puisque les deux groupes contrôle (Ctl et Ctl + GCN2 Inh.) sont distincts mais tout de même très proches. Les deux groupes de carence en leucine (- Leu (6h) et - Leu (6h) + GCN2 Inh.) sont bien distincts des groupes contrôle, montrant l'impact de la carence sur l'expression d'un certain nombre de gènes. Les deux groupes carencés sont également distincts l'un de l'autre, signifiant qu'un groupe de gènes voit son expression varier suite à l'activation de la kinase GCN2, mais qu'un autre groupe de gènes varie du fait d'un effet de la carence en leucine, mais indépendamment de la kinase GCN2.

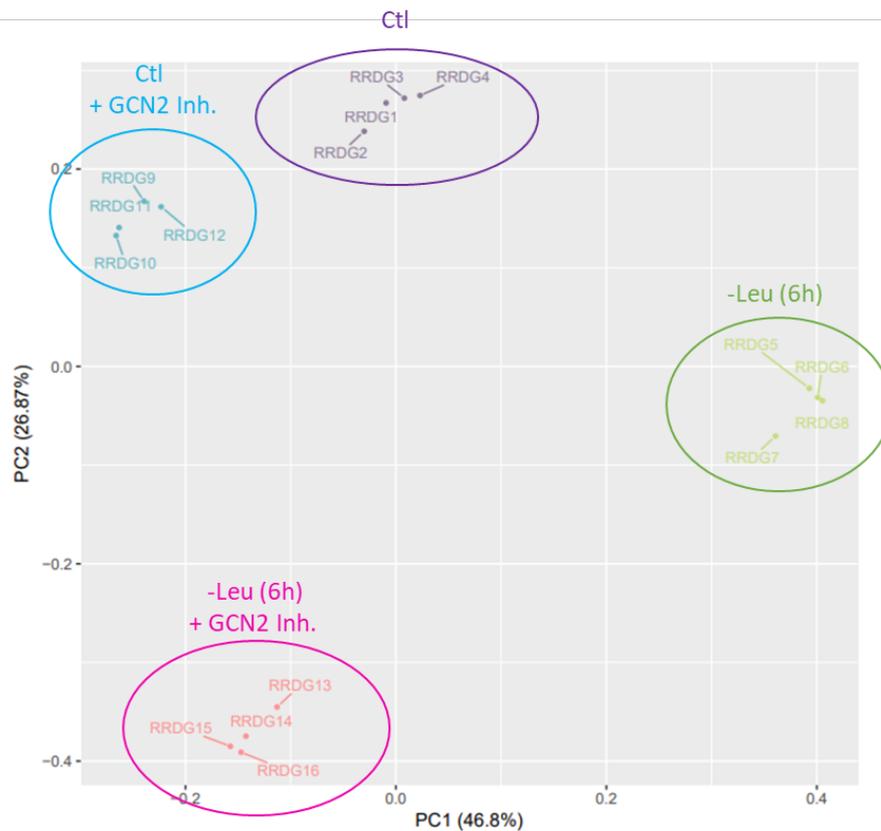


Figure 34. Analyse en composantes principales des résultats de RNA-Seq.

4) Identification des gènes différentiellement exprimés en cas d'exposition de lymphocytes T humains à une carence en leucine de 6h

Une première analyse d'expression différentielle des gènes entre les quatre groupes (deux à deux) a été réalisée par la plateforme GenomEast, avec calcul d'une P-value ajustée pour chaque gène, selon la méthode de Benjamini et Hochberg.

Nous avons ensuite réalisé une analyse plus précise visant à identifier le nombre de gènes surexprimés en cas de carence en leucine, en les triant par *Fold-Change* (FC, taux d'induction) entre les échantillons - Leu (6h) et les échantillons Ctl, et par P-value ajustée, afin de sélectionner de manière pertinente un nombre de gènes raisonnable pour nos analyses ultérieures (**Figure 35**).

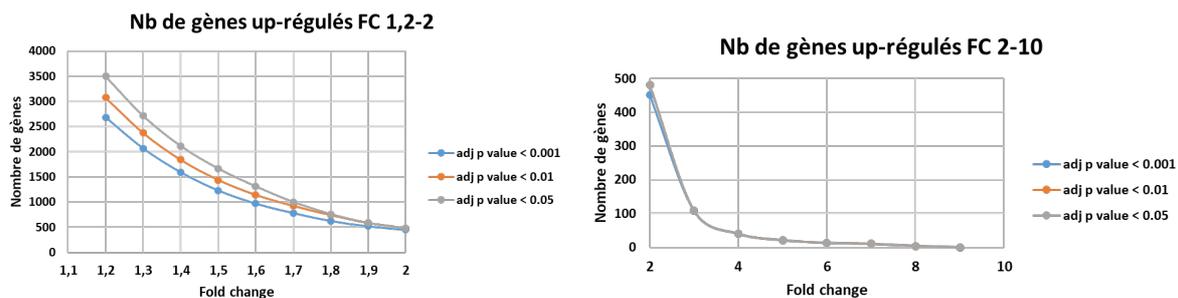


Figure 35. Identification du nombre de gènes surexprimés en cas de carence en leucine (6h) selon *Fold Change* (FC) et P-value ajustée (adj p value).

Il nous a paru correct de sélectionner les gènes surexprimés en cas de carence en leucine avec un *fold-change* $\geq 1,5$ avec une P-value ajustée $< 0,001$ afin d'être le plus sélectif possible. En choisissant ces conditions, nous avons identifié 6045 gènes différentiellement exprimés entre le milieu contrôle et le milieu carencé en leucine pendant 6 heures, dont 1233 gènes surexprimés et 807 gènes réprimés ($FC \leq 0,67$) (Figure 36).

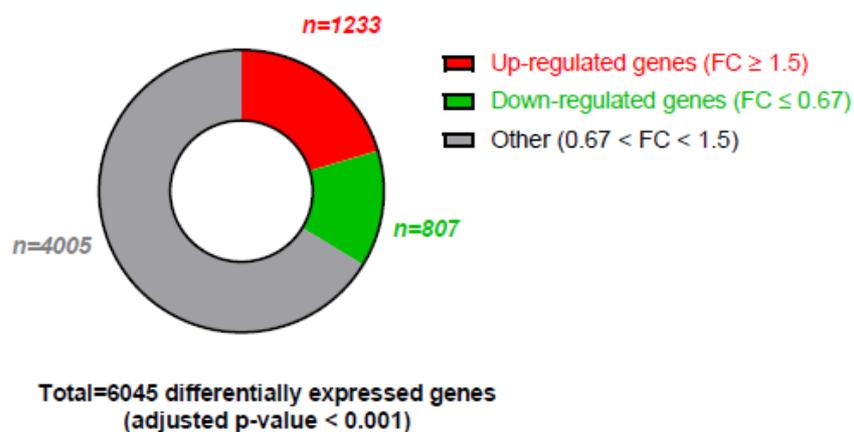


Figure 36. Nombre de gènes surexprimés ($FC \geq 1,5$) ou réprimés ($FC \leq 0,67$) en cas de carence en leucine (6h) avec une P-value ajustée $< 0,001$.

La **figure 37** présente les 30 gènes les plus fortement surexprimés ou réprimés en cas de carence en leucine pendant 6 heures. Parmi les gènes surexprimés, un certain nombre est bien connu pour être régulé par ATF4 comme *CHAC1*, *DDIT3* (*CHOP*), *HOXB9*, *SES2* (*Sestrin2*) ou encore *TRIB3* (*TRB3*).

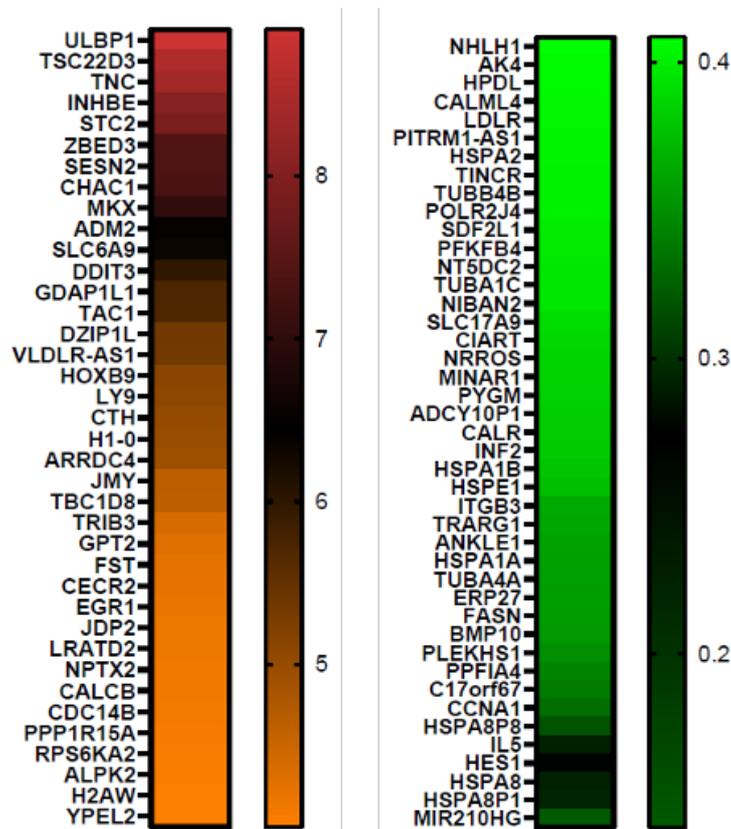


Figure 37. Liste des 30 gènes les plus fortement surexprimés (à gauche) et des 30 gènes les plus fortement réprimés (à droite) en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.

Dans le trio de tête des gènes les plus fortement induits, on retrouve *ULBP1* (*UL16 binding protein 1*), qui est un ligand du récepteur activateur NKG2D exprimé principalement par les cellules NK mais aussi par les LT CD8+, ainsi que les LT $\gamma\delta$ et les cellules NKT, pour lesquels il joue une fonction de co-stimulation. Il est décrit dans la littérature que l'expression d'*ULBP1* augmente en cas d'exposition au stress, en particulier au stress induisant des dommages de l'ADN, ou en cas d'exposition à une infection virale ou à certains oncogènes, ou encore suite à

l'activation de p53, mais rien n'est décrit quant à son augmentation d'expression en cas de carence en acide aminé indispensable (Raulet et al., 2013).

Le second gène le plus exprimé en cas de carence en leucine, *TSC22D3*, aussi connu sous le nom de *GILZ* (*Glucocorticoid-induced leucine zipper*), est induit au niveau transcriptionnel par le récepteur aux glucocorticoïdes (GR). Il est plutôt décrit comme ayant un rôle immunosuppresseur en régulant négativement l'activation et la différenciation des cellules T par inhibition, entre autres, de la voie NF- κ B, et en promouvant l'activité des Tregs par activation de la voie du TGF- β (Cannarile et al., 2019).

Enfin, *TNC* (*Tenascin-C*), le 3^{ème} gène le plus fortement exprimé, est un gène qui peut être induit par de nombreuses cytokines en cas d'état inflammatoire, et semble lui aussi jouer un rôle immunosuppresseur en bloquant l'activation de la cellule T (Midwood et al., 2016 ; Jachetti et al., 2015).

5) Identification des processus biologiques impactés par la carence en leucine pendant 6 heures dans les lymphocytes T humains

Certains gènes fortement exprimés en cas de carence en leucine semblant donc jouer un rôle sur la fonctionnalité immune du lymphocyte T, nous avons réalisé une analyse en *Gene Ontology* (GO) de l'ensemble des gènes surexprimés et réprimés identifiés précédemment, afin d'identifier les processus biologiques impactés par la carence en leucine pendant 6 heures.

Cette analyse de GO a été réalisée à l'aide du logiciel Cytoscape/Metaspape (Zhou et al., 2019), et nous a permis de regrouper ces processus biologiques en deux grands groupes. Le premier groupe, que nous avons dénommé « processus métaboliques », montre de manière attendue et logique que la carence en leucine impacte un certain nombre de *clusters* de gènes impliqués dans le transport ou la synthèse d'acides aminés, la régulation de l'apoptose, ou encore dans le repliement des protéines. Le deuxième grand groupe identifié correspond plutôt à l'impact sur le système immunitaire, puisque nous pouvons remarquer que la carence en leucine semble

jouer sur l'activation, la différenciation et la prolifération leucocytaire, ainsi que sur la signalisation et la production des cytokines (**Figure 38**).

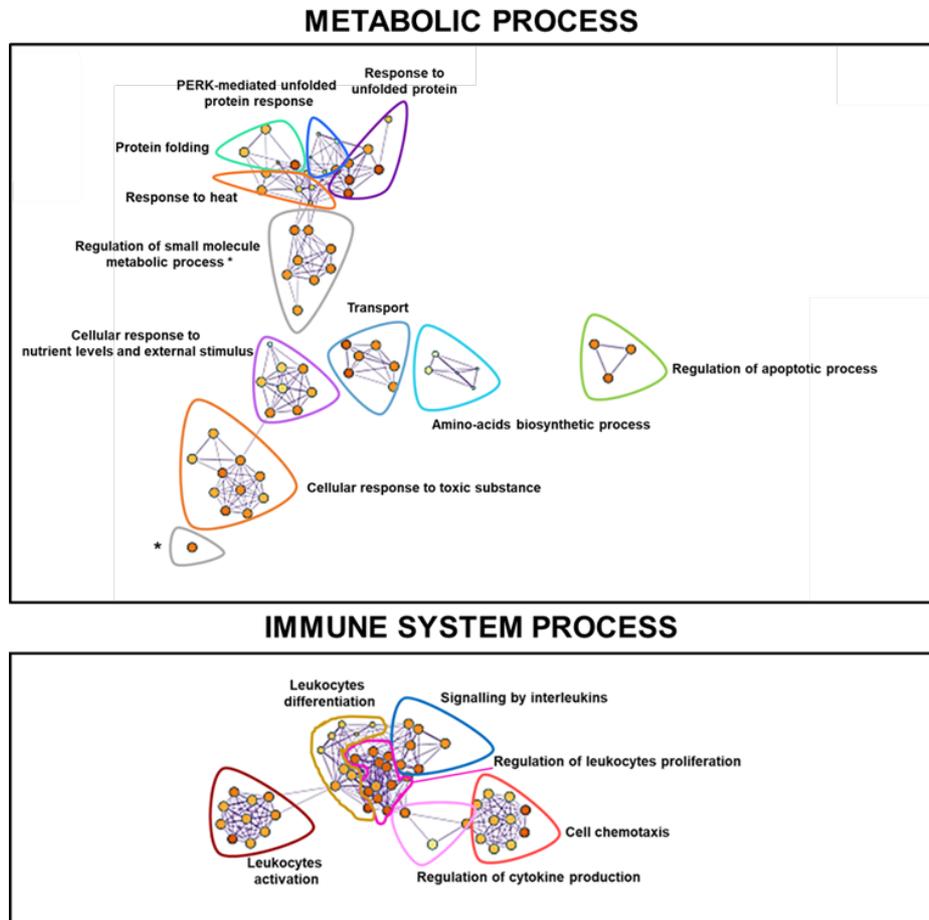


Figure 38. Résultats d'analyse en *Gene Ontology* des gènes surexprimés ou réprimés en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.

La **figure 39** permet de visualiser dans chaque *cluster*, si une majorité de gènes est surexprimée ou plutôt réprimée. Toutefois, il est difficile de conclure de manière générale pour chaque *cluster* puisque certains gènes surexprimés peuvent avoir une fonction inhibitrice et inversement. Une sélection de gènes pour certains *clusters* est représentée dans la **figure 40**.

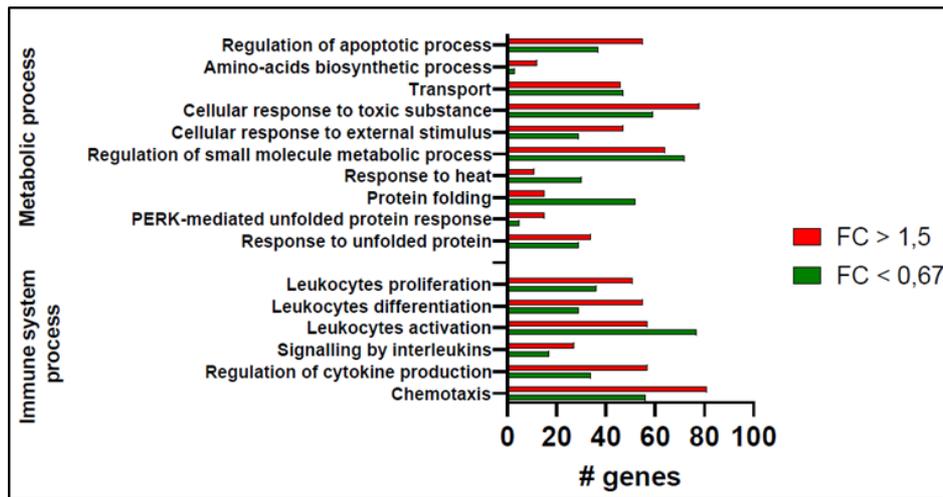
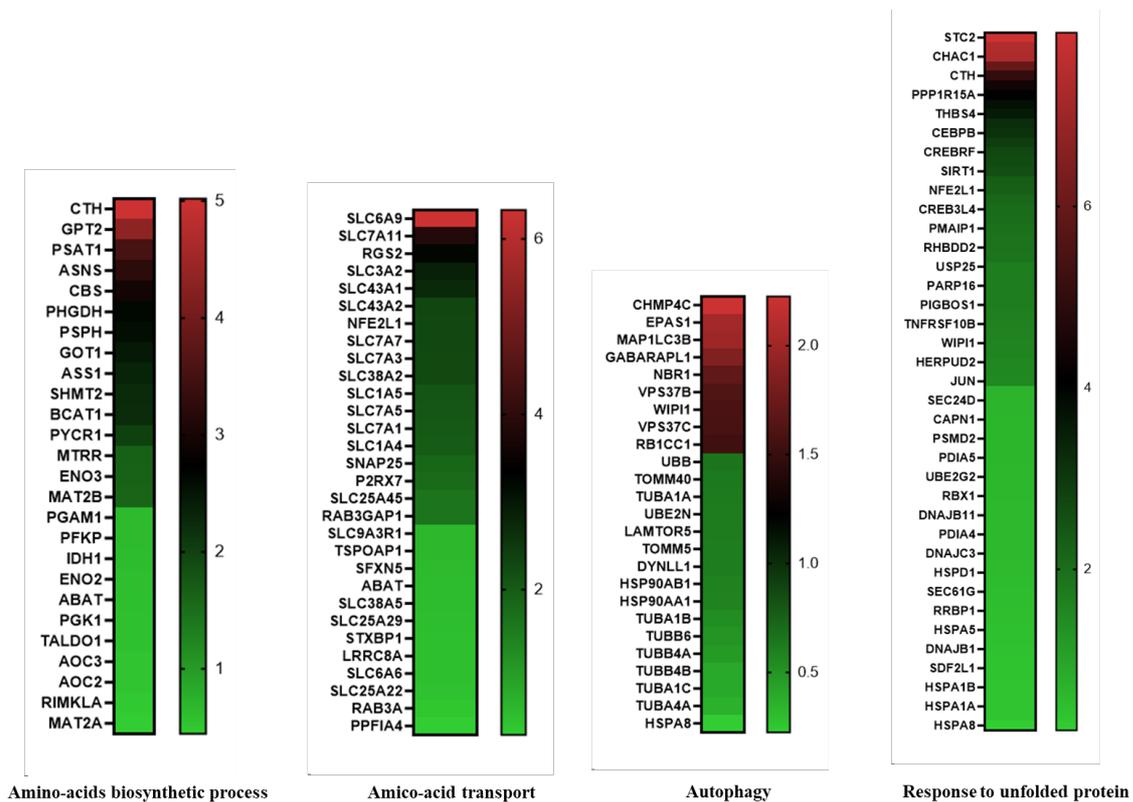


Figure 39. Identification du nombre de gènes surexprimés ou réprimés par *clusters* de GO en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.



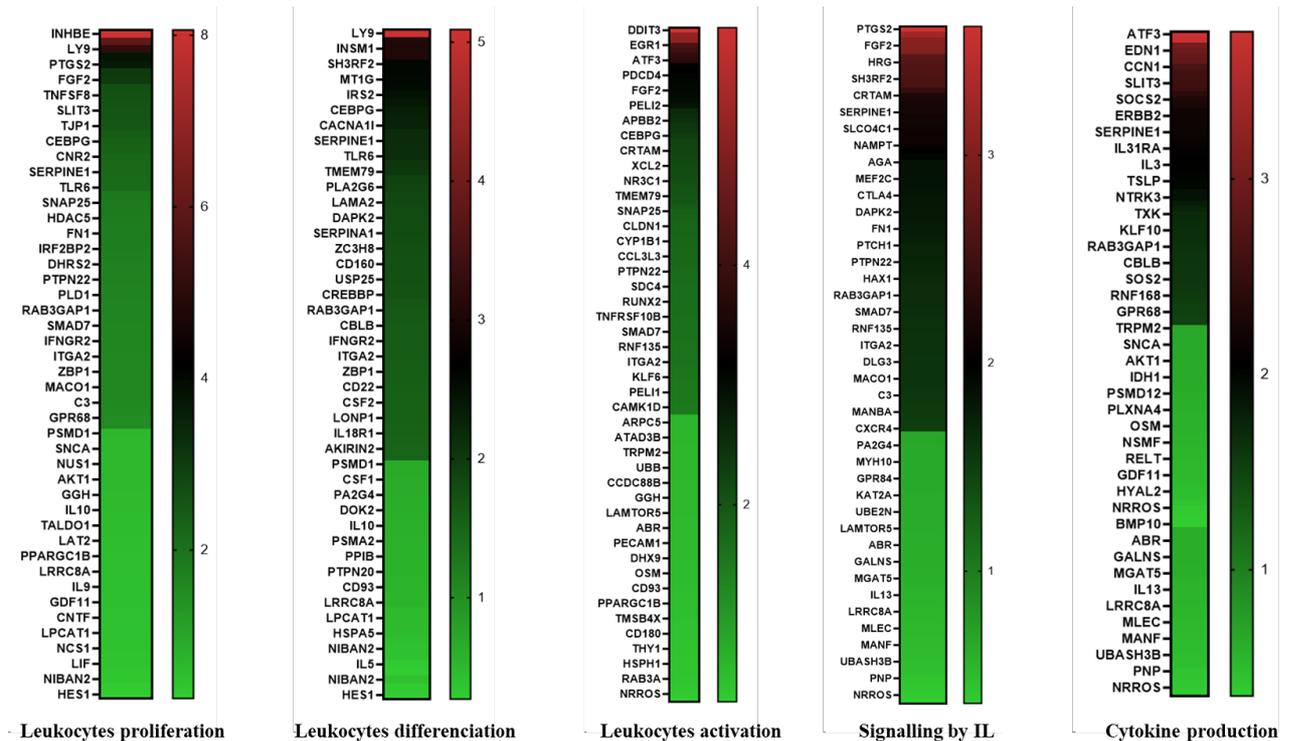
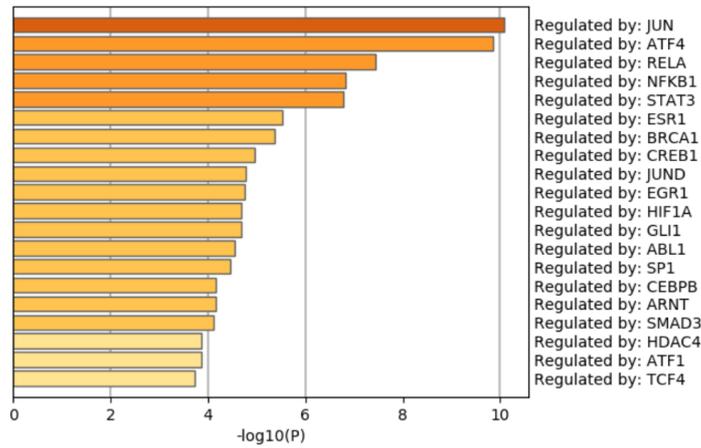


Figure 40. Liste des gènes surexprimés ou réprimés dans les principaux *clusters* de GO en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.

L'analyse dans Metascape nous a également permis d'identifier les facteurs de transcription régulant les gènes présents dans l'analyse. Deux facteurs de transcription ressortent majoritaires : JUN et, de manière attendue, ATF4. Grâce à une analyse complémentaire *via* la base de données TRRUST (*Transcription Regulatory Relationships Unraveled Sentence-based Text mining*), il semblerait en effet que 33 gènes de notre liste sont régulés par JUN et 16 par ATF4 (Figure 41).



Enrichment FDR	Genes in list	Total genes	Functional Category	Genes
1,75E-06	16	35	ATF4	ASNS ATF3 CEBPB CHAC1 CXCL8 DDIT3 DDIT4 HSPA5 MAP1LC3B NDC80 PTGS2 S100P SIRT1 TNFRSF10B TRIB3 VEGFA
4,77E-05	33	149	JUN	ABCB1 ATF3 BATF3 CSF1 CSF2 CXCL8 DDIT3 EDN1 FOSL1 IL12A IL2 IL23A IL24 IL3 JUN LDHA MAT2A NAMPT NQO1 OXTR PCK2 PLAT PLAUR PTGS2 RELB RUNX2 SMAD7 SYK TERT TNC TNFRSF1B VCAM1 VEGFA
0,004767307	15	57	BRCA1	AREG BACH1 CASR CYP1A1 CYP1B1 DDIT3 EGR1 FOS FST GADD45A HSPA5 IGF1 SIRT1 TP63 VEGFA
0,004767307	11	34	JUND	BCL6 ERBB2 FOSL1 GADD45A IL3 IL5 ITGB3 NQO1 PLAT PLAUR PTGS2
0,006534395	8	20	ARNT	BHLHE40 CYP1A1 CYP1B1 FOS JUN MFS2A RELB VEGFA
0,006995422	18	83	HIF1A	ABCB1 ASS1 BNIP3 CDH1 CXCR4 EDN1 FGF2 HBEGF LDHA NR3C1 NR4A1 PFKFB4 PGK1 SERPINE1 SLC29A1 TERT TLR6 VEGFA
0,006995422	26	142	STAT3	ABCA1 AKT1 BCL2 BCL6 CCND3 CDH1 CXCL8 CCN1 DDIT3 EPAS1 ETV6 FGF2 FOS IL10 IL2 IL21 LCAT MMP10 OSM PTGS2 PTPN13 TERT TNFRSF10B TP63 UCP2 VEGFA
0,009933686	14	59	CEBPB	ABCB1 ASNS CXCL8 DAPK1 DDIT3 IL10 IL13 IL24 IL3 IL5 OXTR PCK2 PTGS2 PTPN13
0,009933686	44	299	RELA	ABCA1 ABCB1 AKT1 BCL2 CCR2 CD69 CD86 CDH1 CEACAM1 CSF1 CSF2 CXCL8 CXCR4 CYP1A1 EDN1 EGR1 EPAS1 FN1 FOXO3 HBEGF HES1 IL10 IL12A IL2 IL23A MAT2A NAMPT OXTR PCK2 PLAUR PTGS2 PTHLH PTPN13 SERPINE1 SIRT1 TERT TNC TNFAIP3 TNFRSF10B TRIB3 TSLP UPP1 VCAM1 VEGFA
0,011768005	8	24	ATF1	BCL2 CCNA1 ERBB2 FLT1 IL10 LDHA MAP1LC3B PLAUR
0,011768005	16	76	ESR1	BCL2 CDH1 CEBPB CYP1A1 CYP1B1 FLT1 FOS FOXP1 JUN NQO1 PMAIP1 PTMA RUNX2 SERPINE1 TERT VEGFA
0,011768005	7	19	GLI1	AKT1 BCL2 CCN1 EGR2 JUN PDGFRA TNFRSF10B
0,011768005	8	24	HDAC4	IL10 IL5 JUN PTGS2 RUNX2 TGIF1 VCAM1 VEGFA
0,012576011	5	10	ABL1	BCL2 BCL6 CSF1 FOXO3 JUN
0,012576011	9	31	SMAD3	FST JUN MXD1 PTHLH SERPINE1 SMAD7 TERT TNC VEGFA
0,012576011	8	25	TCF4	ABCB1 BCL2 FST HECA JUN PLD1 SKP2 VEGFA
0,016964463	17	88	EGR1	ABCB1 ATF3 CXCL8 EAPP FGF2 FLT1 FN1 IL2 IL3 LDLR LTB PLAUR PTGS2 SLC4A2 SPRY1 TCF4 VEGFA
0,019588889	42	302	NFKB1	ABCA1 ABCB1 AKT1 ATF3 BCL2 CCR2 CD69 CD86 CDH1 CEACAM1 CSF1 CSF2 CXCL8 CXCR4 CYP1A1 EDN1 EGR1 FN1 FOXO3 HAX1 HBEGF HES1 IL10 IL12A IL2 IL21 IL23A MAT2A NAMPT PLAUR PTGS2 PTHLH PTPN13 SERPINE1 TERT TNC TNFAIP3 TNFRSF10B TSLP UPP1 VCAM1 VEGFA
0,029418727	10	42	VDR	BHLHE40 CDH1 CXCL8 CYP1A1 DDIT4 ERBB2 IL10 IL2 PLD1 SKP2
0,030126521	6	18	DDIT3	ASNS CXCL8 MAP1LC3B SIRT1 TNFRSF10B TRIB3
0,030126521	6	18	GLI2	BCL2 CDH1 FST JUN PDGFRA TNFRSF10B
0,030126521	4	8	RBMX	EGR1 FOS FOSL1 TXNIP
0,031740579	5	13	TP73	AQP3 BBC3 CABLES1 PMAIP1 TERT
0,035285995	6	19	ESR2	FOS JUN MKNK2 SERPINE1 TERT VEGFA
0,035285995	7	25	PGR	BCL2 ERBB2 IL10 IRS2 PLD1 PTGS2 VEGFA
0,035285995	6	19	XBP1	CXCL8 DDIT3 ERN1 HSPA5 PRNP VEGFA
0,038628993	4	9	HIC1	LRP8 SIRT1 VEGFA VLDLR
0,039654536	6	20	NFYA	ABCB1 CBS DDIT3 GADD45A HOXB7 HSPA5
0,039654536	3	5	NR1H3	ABCA1 ABCG1 BHLHE40
0,039654536	7	26	SMAD4	BCL2 FBXO32 JUN SERPINE1 SMAD7 TNC UCP2

Figure 41. Identification des facteurs de transcription régulant l'expression des gènes surexprimés ou réprimés en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.

6) Identification des gènes dont l'expression est dépendante de la kinase GCN2

En ce qui concerne le deuxième objectif de cette analyse, qui consistait à identifier les gènes dont l'expression est dépendante de la kinase GCN2, nous avons analysé la variation d'expression de nos 1233 gènes surexprimés et de nos 807 gènes réprimés par la carence en leucine (gènes identifiés dans la première partie), en présence de l'inhibiteur de GCN2.

Pour les gènes surexprimés, nous avons considéré que leur expression était dépendante de la kinase GCN2 si (i) la différence d'expression entre le milieu contrôle et le milieu carencé en leucine devient non significative (P value ajustée $\geq 0,05$) en présence de l'inhibiteur ou si (ii) la différence reste significative (P value ajustée $< 0,05$) mais que le gène devient réprimé (*fold change* < 1). Nous avons considéré que l'expression des gènes était non dépendante de GCN2 si le *fold change* restait $\geq 1,5$ en présence de l'inhibiteur avec une différence significative (P value ajustée $< 0,05$) (**Figure 42 A**).

Pour les gènes réprimés, nous avons considéré que leur expression était dépendante de la kinase GCN2 si (i) la différence d'expression entre le milieu contrôle et le milieu carencé en leucine devient non significative (P value ajustée $\geq 0,05$) en présence de l'inhibiteur ou si (ii) la différence reste significative (P value ajustée $< 0,05$) mais que le gène devient surexprimé (*fold change* > 1). Nous avons considéré que l'expression des gènes était non dépendante de GCN2 si le *fold change* restait $\leq 0,67$ en présence de l'inhibiteur avec une différence significative (P value ajustée $< 0,05$) (**Figure 42 B**).

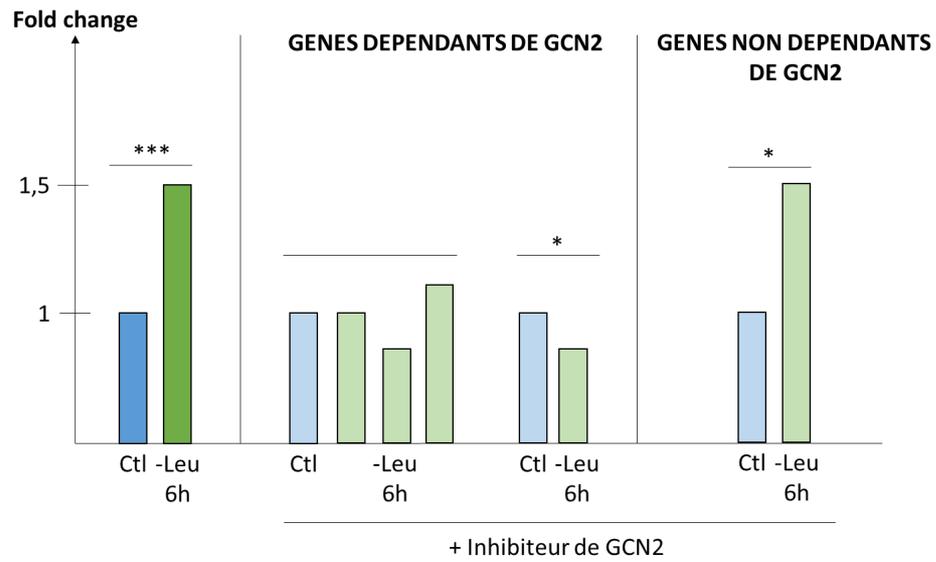
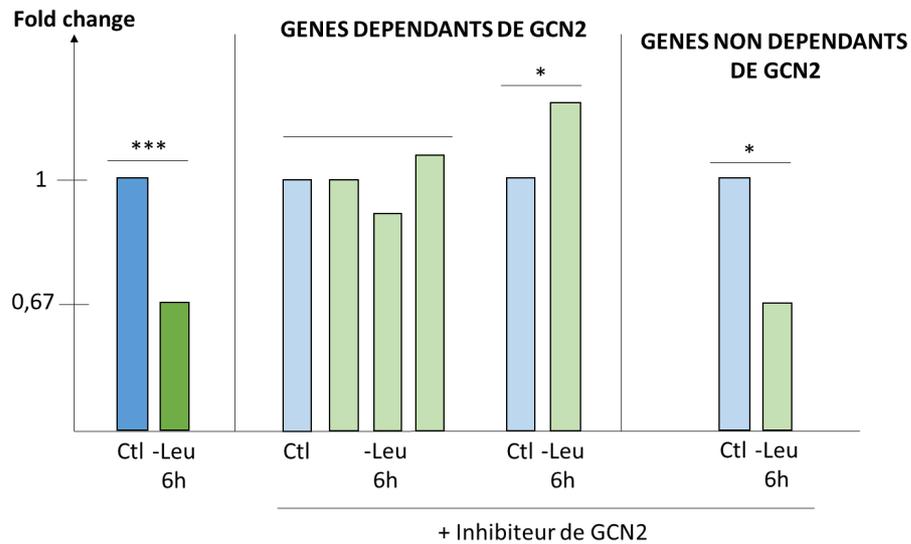
A**B**

Figure 42. Stratégie d'identification des gènes dont l'expression est dépendante de la kinase GCN2 en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains. A. Stratégie pour les gènes surexprimés. B. Stratégie pour les gènes réprimés.

Nous avons ainsi identifié 767 gènes dont l'expression est dépendante de la kinase GCN2 : 526 parmi les 1233 gènes surexprimés et 241 parmi les 807 gènes réprimés (**Figures 43 et 44**).

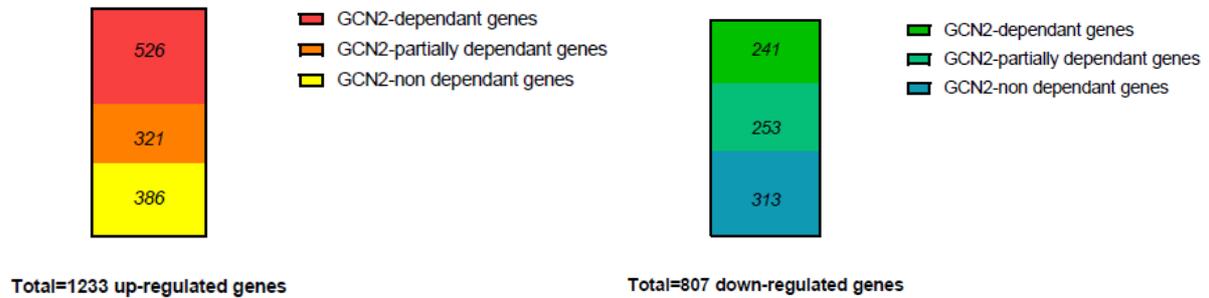


Figure 43. Nombre de gènes surexprimés (à gauche) ou réprimés (à droite) dont l'expression est dépendante, partiellement dépendante, ou indépendante de la kinase GCN2 en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.

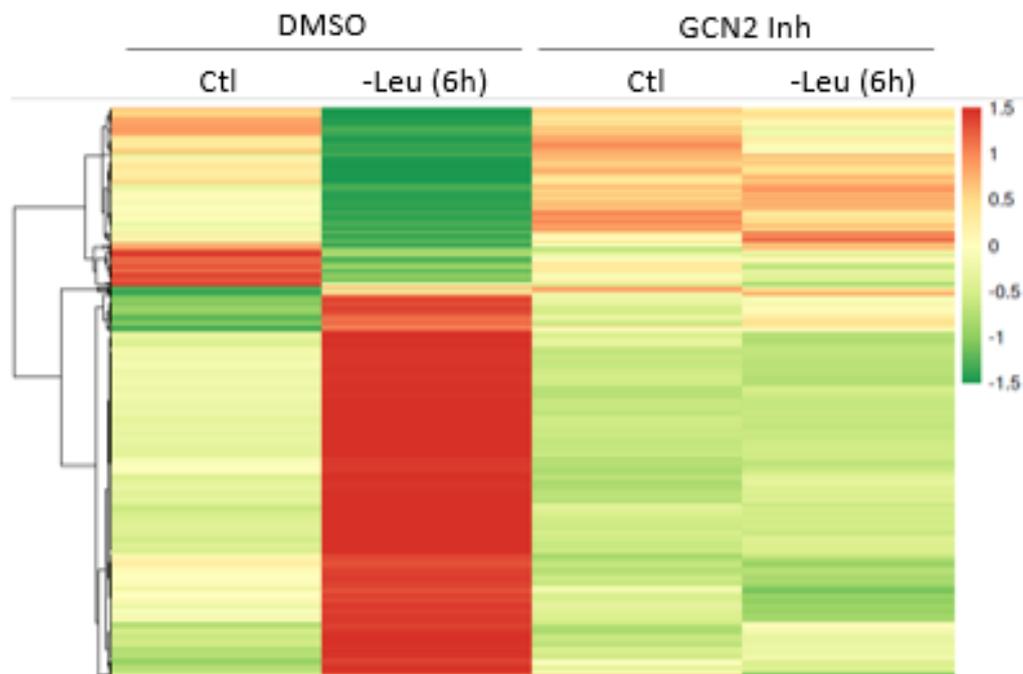


Figure 44. *Heatmap* représentant les gènes surexprimés (en rouge) ou réprimés (en vert), dont l'expression est dépendante de la kinase GCN2 en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.

La **figure 45** présente les 30 gènes les plus induits par la carence en leucine et que nous avons identifié comme ayant une expression dépendante de GCN2. Certains de ces gènes sont connus pour être régulés par la voie eIF2 α -ATF4 en cas de carence en un AAI, tels que *TRIB3*, *SLC7A11*, *CHAC1*, ou *HOXB9* (Carraro et al., 2010 ; Chen et al., 2017 ; Hayashi et al 2016 ; Lee et al., 2008). D'autres ont déjà été décrits comme répondant à une carence en cystéine dans d'autres types cellulaires tels que *INHBE*, *STC2* ou encore *CTH* (Lee et al., 2008), sans que la dépendance à GCN2 ait été évalué. D'autres n'ont jamais été décrit comme étant modulés par une carence en AAI, comme *MKX*, *ADM2* ou encore *LY9*. De manière surprenante, l'expression de *CHOP* apparait comme étant non dépendante de la kinase GCN2 dans notre analyse. Il est en effet induit avec un FC de 5,98 (P = 0) en cas de carence en leucine sans l'inhibiteur et de 2,17 (P = 2,96E-53) en présence de l'inhibiteur, alors qu'il a déjà été décrit dans la littérature comme ayant une expression strictement dépendante de GCN2 dans des LT carencés en tryptophane (Munn et al., 2005). Ces premiers résultats doivent cependant être validés par une autre technique d'inhibition de GCN2, par exemple avec l'utilisation d'un sh-RNA, associée à une mesure de l'expression des ARNm en RT-qPCR.

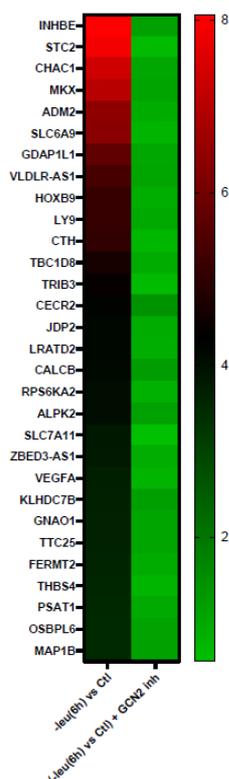


Figure 45. Liste des 30 gènes les plus fortement surexprimés en cas de carence en leucine (6h) et dont l'expression est dépendante de la kinase GCN2 dans les lymphocytes T humains.

7) Analyse en *Gene Ontology* du rôle de GCN2 dans l'impact d'une carence en leucine de 6 heures dans les lymphocytes T humains

Nous avons réalisé une nouvelle analyse en GO en n'intégrant cette fois-ci que les gènes que nous avons identifiés comme ayant une expression dépendante de la kinase GCN2. Il semblerait que ces gènes soient plutôt regroupés dans des *clusters* impliqués dans les processus métaboliques, tels que transport d'acides aminés, biosynthèse d'acides aminés, réponse à la carence ou à différents types de stimulus. L'impact sur le système immunitaire semble être au second plan et est plutôt en faveur d'une régulation négative de l'activation et de la prolifération cellulaire T. Ainsi, il semblerait qu'une carence en leucine de 6h impacte la fonctionnalité immune du lymphocyte T, mais de manière partiellement dépendante de la kinase GCN2 (Figure 46).

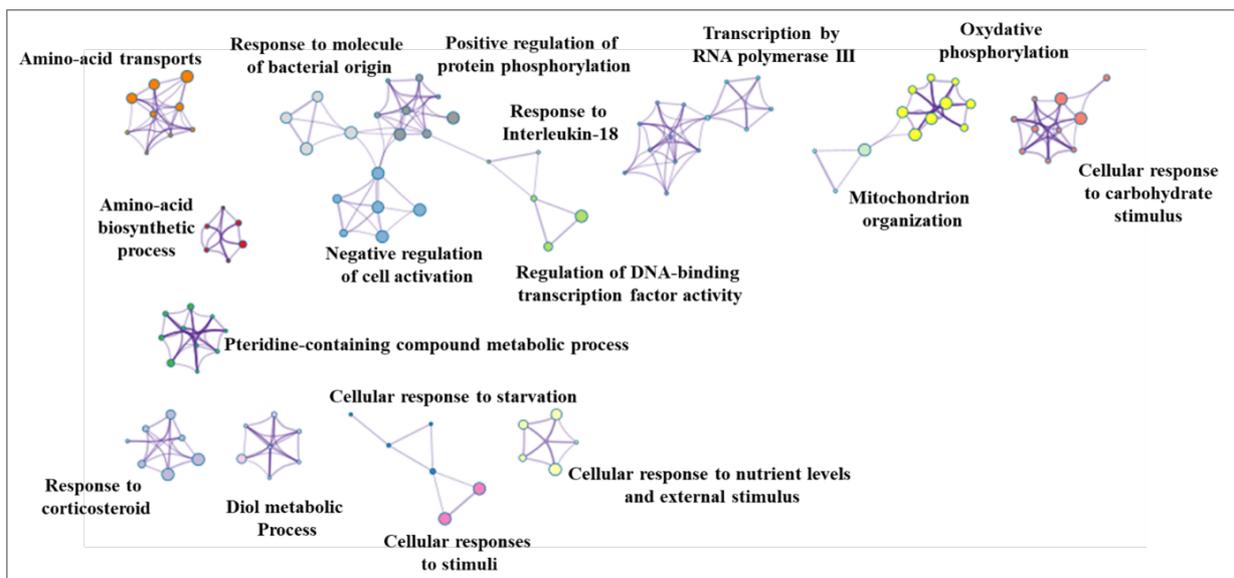


Figure 46. Résultats d'analyse en *Gene Ontology* des gènes surexprimés ou réprimés de manière dépendante de GCN2 en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.

Nous avons également recherché, *via* la base de données TRRUST, les facteurs de transcription communs à nos différents gènes. De nouveau, et de manière attendue, le facteur de transcription principal régulant les gènes de notre analyse est ATF4, qui régule l'expression de *ASNS*, *CEBPB*, *CHAC1*, *MAP1LC3B*, *TRB3*, *S100P* et *VEGFA* (**Figure 47**).

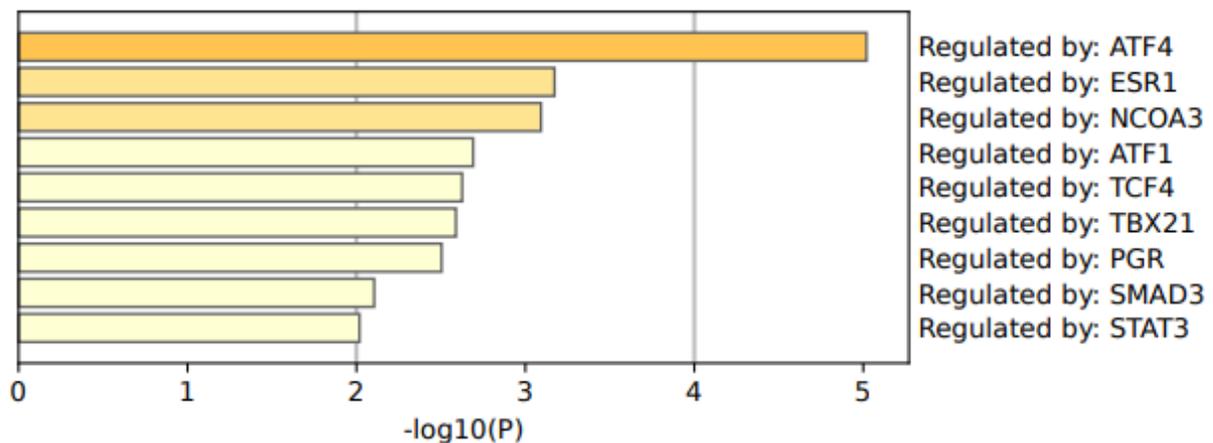


Figure 47. Identification des facteurs de transcription régulant l'expression des gènes surexprimés ou réprimés de manière dépendante de GCN2 en cas de carence en leucine (6h) dans les lymphocytes T humains.

8) Perspectives

L'ensemble de ces résultats doit encore être approfondi. Tout d'abord, il nous faut vérifier l'expression en RT-qPCR des ARNm des cibles les plus marquantes identifiées dans cette analyse. Il pourrait par ailleurs être intéressant de réaliser la même analyse transcriptomique avec une carence en leucine de 6 heures mais avec des lymphocytes T issus de différents donneurs de l'EFS afin de vérifier la reproductibilité de ces données d'un individu à un autre. Nous pourrions également réaliser la même analyse transcriptomique avec une carence en leucine de 16 heures afin d'évaluer l'impact d'une carence plus longue sur la fonctionnalité du lymphocyte T. Enfin, il conviendrait de valider l'absence d'impact d'une carence en leucine sur des lymphocytes T non activés. Ce travail sera ainsi poursuivi puis valorisé après collaboration avec un biostatisticien du CHU de Clermont-Ferrand ainsi qu'un bio-informaticien.

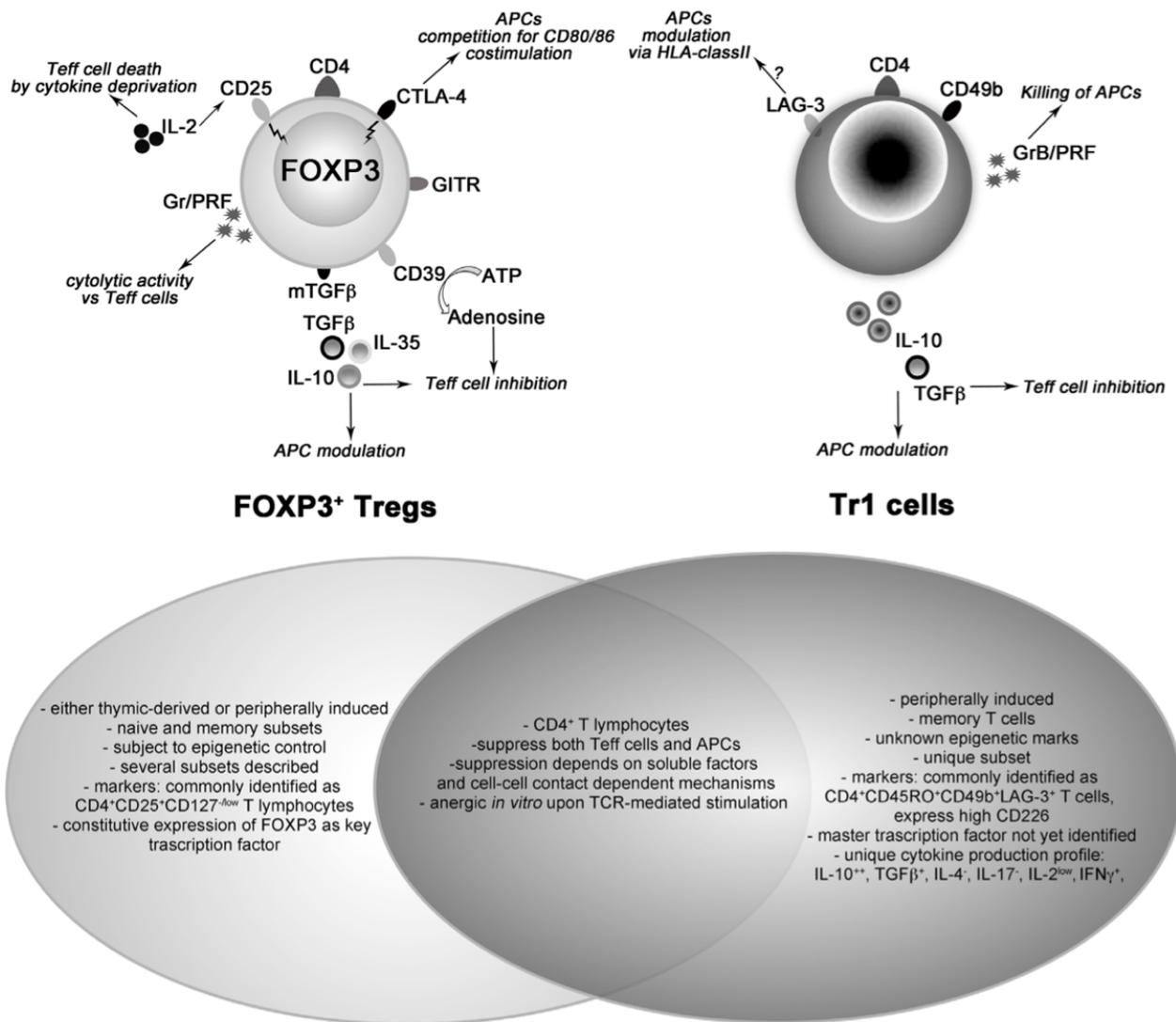


Figure 48. Schéma représentant les caractéristiques phénotypiques et les mécanismes d'action des lymphocytes Tregs FoxP3⁺ (à gauche) et Tr1 (à droite). Les Tregs FoxP3⁺ expriment constitutivement le CD25 et FoxP3. Leur action immunosuppressive est liée à l'expression de CTLA-4, GITR et CD39, à la captation importante d'IL-2, à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles qu'IL-10, TGF-β et IL-35, et à la destruction des cellules T effectrices par sécrétion de Granzyme B et de Perforine. Les cellules Tr1 sont induites en périphérie, n'expriment pas FoxP3, présentent un profil cytokinique spécifique (IL-10⁺⁺, TGF-β⁺, IL-4⁻, IL-17⁻, IL-2^{low} et IFNγ⁺). Leur action immunosuppressive est liée à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et à la destruction des cellules présentatrices d'antigène par sécrétion de Granzyme B et de Perforine (*d'après Gregori et al., 2015*).

II. Une autre piste pour démontrer la fonctionnalité de NUTRIREG dans les lymphocytes T : avec le gène à orientation thérapeutique *FoxP3*

1) Rationnel

Nous avons décrit dans l'article présenté et actuellement soumis, les résultats de nos travaux avec le transgène AARE-TK-IL-10 dont l'objectif est de faire polariser le lymphocyte T en phénotype Tr1 (*T regulatory type 1*), en cas d'exposition à une carence en un acide aminé indispensable. L'objectif final est de pouvoir démontrer que cette différenciation transitoire en Tr1 peut permettre de prévenir ou traiter une réaction du greffon contre l'hôte (GvH) après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, sans perdre l'effet anti-tumoral de type GvL.

Il existe deux principaux types de lymphocytes T régulateurs décrits dans la littérature : les Tregs FoxP3⁺ et les Tr1 (**Figure 48**).

Les lymphocytes T régulateurs de type Tr1

Les Tr1, décrits dans notre article, sont des LT mémoires sécrétant, après activation, des niveaux élevés d'IL-10 et +/- de TGF- β , des quantités variables d'IL-5, de GM-CSF et d'IFN- γ , et de faibles quantités d'IL-2, d'IL-4 et d'IL-17. Ces cellules n'expriment pas le facteur de transcription FoxP3, sauf transitoirement et faiblement au moment de leur activation. Ces cellules Tr1 sont capables de contrôler la réponse immune en inhibant la production d'IL-2 et d'IFN- γ par les LT pro-inflammatoires, inhibant ainsi leur prolifération, par effet direct de l'IL-10 et du TGF- β . Elles sont aussi capables de freiner l'activité des cellules présentatrices d'antigène en inhibant la production de molécules de costimulation et de cytokines pro-inflammatoires, mais elles peuvent aussi détruire ces CPA par mécanisme cytotoxique direct par le Granzyme B.

Les lymphocytes T régulateurs de type Tregs FoxP3+

Les Tregs FoxP3⁺ peuvent être eux issus du thymus (tTregs), ou bien induits en périphérie (pTregs). Ces deux sous-types expriment constitutivement CD25 (*IL-2-receptor- α -chain*) et FoxP3. Leur mécanisme d'action immunosuppresseur est lié à l'expression de CTLA-4 (point de contrôle immunitaire), GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-related protein*) et CD39 (*Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1*), à la forte affinité de leur récepteur CD25 pour l'IL-2 qui privera ainsi les LT effecteurs de cette cytokine, à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles qu'IL-10, TGF- β et IL-35, mais aussi à la destruction des cellules T effectrices par sécrétion de Granzyme B et de Perforine (*Gregori et al., 2015 ; Levings et Roncarolo, 2005*).

L'expression du gène *FoxP3* (*Forkhead Box P3*) est indispensable pour le développement des lymphocytes T régulateurs et ainsi pour l'homéostasie immune, puisque sa mutation entraîne un syndrome héréditaire, appelé IPEX (Immunodérégulation, Polyendocrinopathie, et Entéropathie liées au chromosome X), responsable d'atteintes auto-immunes multiples et de réactions allergiques (*Fontenot et al., 2003*). Quelques publications dans la littérature démontrent qu'une transduction de lymphocytes T avec le gène *FoxP3* permet d'orienter le phénotype de ces lymphocytes T en phénotype Treg FoxP3⁺. Par exemple, l'injection de cellules T CD4⁺CD25⁻ (pas d'expression constitutive de *FoxP3*), transduites avec un rétrovirus portant *FoxP3*, à des souris immuno-déficientes RAG^{-/-}, permet d'orienter ces cellules vers un phénotype CD4⁺CD25⁺, de supprimer la réaction cytotoxique CD8⁺, et de prévenir l'apparition d'une colite inflammatoire (*Fontenot et al., 2003 ; Hori et al. 2003*). Ces résultats chez la souris ont été confirmés *in vitro* dans des cellules humaines par transduction lentivirale de *FoxP3* (*Allan et al., 2008*).

Dans ce cadre, nous avons travaillé sur la surexpression *via* NUTRIREG du facteur de transcription Foxp3, dans le but de faire polariser de manière transitoire et réversible les lymphocytes T en phénotype Treg.

2) Matériel et méthodes

Nous avons ainsi conçu un transgène 2xAARE-TK-FoxP3 (humain) que nous avons transduits dans des lymphocytes T humains activés depuis 24 heures. Huit jours après la transduction, nous avons transféré nos cellules en milieu contrôle ou carencé en leucine pendant 16 heures puis analysé réalisé (i) l'expression du gène *FoxP3* par RT-qPCR; (ii) l'expression de la protéine FoxP3 en western blot ; (iii) le phénotype des cellules en cytométrie en flux ; et (iv) l'expression des ARNm des cytokines et facteurs de transcription des LT effecteurs et cytotoxiques par RT-qPCR. Nous avons réalisé des transductions à différentes MOI (de 5 à 50), et testé un autre promoteur que le TK (beta-globine), mais nous ne présenterons que les résultats les plus encourageant, à savoir avec une MOI à 10, et avec le promoteur TK.

3) Premiers résultats

Expression de l'ARNm de FoxP3 : Nous avons tout d'abord validé qu'une carence en leucine de 16h permet d'induire l'expression de l'ARNm de FoxP3 dans les cellules transduites, avec un niveau d'expression supérieure à celui des cellules transduites cultivées en milieu contrôle et à celui des cellules non transduites cultivées en milieu carencé en leucine (**figure 49**).

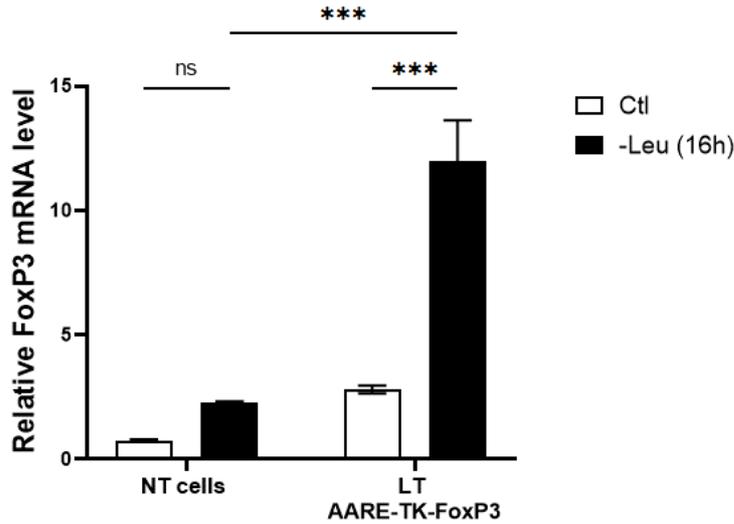


Figure 49. Analyse du niveau d'expression par RT-qPCR de l'ARNm du gène FoxP3 de LT non transduits (NT cells) et de LT transduits avec le transgène AARE-TK-FoxP3 (MOI 10) cultivés en milieu contrôle (Ctl) ou carencé en leucine pendant 16h (-Leu (16h)). Expression normalisée sur celle de l'actine. Test statistique ANOVA (-leu vs ctl et NT cells vs LT AARE-TK-FoxP3) : ns non significatif, *** $p < 0,001$, écart-types S.E.M., $n=3$ /condition.

Expression de la protéine FoxP3 : Nous avons vérifié que cette induction de l'expression de l'ARNm de FoxP3 par une carence en leucine de 16h est également valide au niveau protéique, par analyse en western blot. Cette analyse montre une expression plus forte de FoxP3 dans les cellules transduites avec le transgène AARE-TK-FoxP3 que dans les cellules non transduites, et cette expression est majorée en cas de carence en leucine. L'analyse de l'expression de phospho-eIF2 α permet de contrôler que l'expression du transgène FoxP3 est bien liée à une induction de la voie eIF2 α -ATF4 (Figure 50).

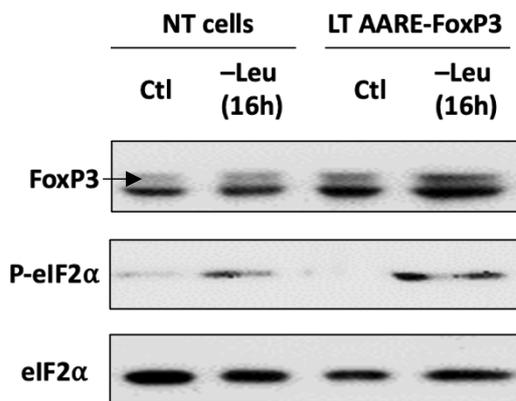


Figure 50. Analyse du niveau d'expression de la protéine FoxP3 et d'eIF2 α (forme totale et phosphorylée) par western blot dans des LT non transduits (NT cells) et dans des LT transduits avec le transgène AARE-TK-FoxP3 (MOI 10) cultivés en milieu contrôle (Ctl) ou carencé en leucine pendant 16h (-Leu (16h)).

Analyse du phénotype Treg des cellules : Nous avons ensuite voulu valider que nos cellules transduites présentaient un phénotype Treg, à savoir CD4+CD25+FoxP3+, en cytométrie en flux. Nous avons ainsi réalisé un marquage intra-cellulaire de FoxP3. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de différence de phénotype entre nos cellules non transduites et nos cellules transduites par l'utilisation des marqueurs CD25 et FoxP3. En effet, et comme démontré dans notre article, nos cellules expriment toutes très fortement le CD25, car il s'agit du récepteur de l'IL-2, avec laquelle nous supplémentons nos milieux de culture. Concernant le marqueur FoxP3, nous obtenons bien un marquage positif de nos cellules, mais il n'existe pas de différence de marquage entre nos différentes conditions (**Figure 51**).

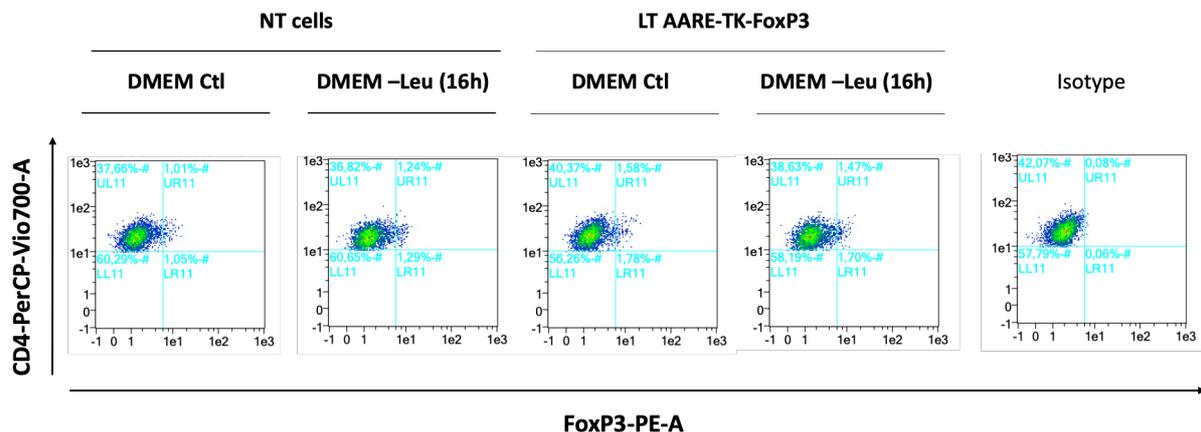


Figure 51. Analyse en cytométrie en flux de la co-expression du marqueur de surface CD4 et du marqueur intra-cellulaire FoxP3 dans des LT non transduits (NT cells) et dans des LT transduits avec le transgène AARE-TK-FoxP3 (MOI 10) cultivés en milieu contrôlé (Ctl) ou carencé en leucine pendant 16h (-Leu (16h)).

Expression de l'ARNm des cytokines et facteurs de transcription des LT effecteurs et cytotoxiques : Concernant l'impact fonctionnel du transgène AARE-FoxP3, certaines de nos données de RT-qPCR sont encourageantes car montrent une augmentation significative de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire TGF- β , et des granules cytotoxiques Granzyme B et Perforine, dans les cellules transduites en cas de carence en leucine en comparaison aux cellules T non transduites carencées. Nos résultats ne montrent en revanche pas d'impact sur

l'expression de l'IL-10 (**Figure 52**). Il n'existe pas non plus d'impact sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires.

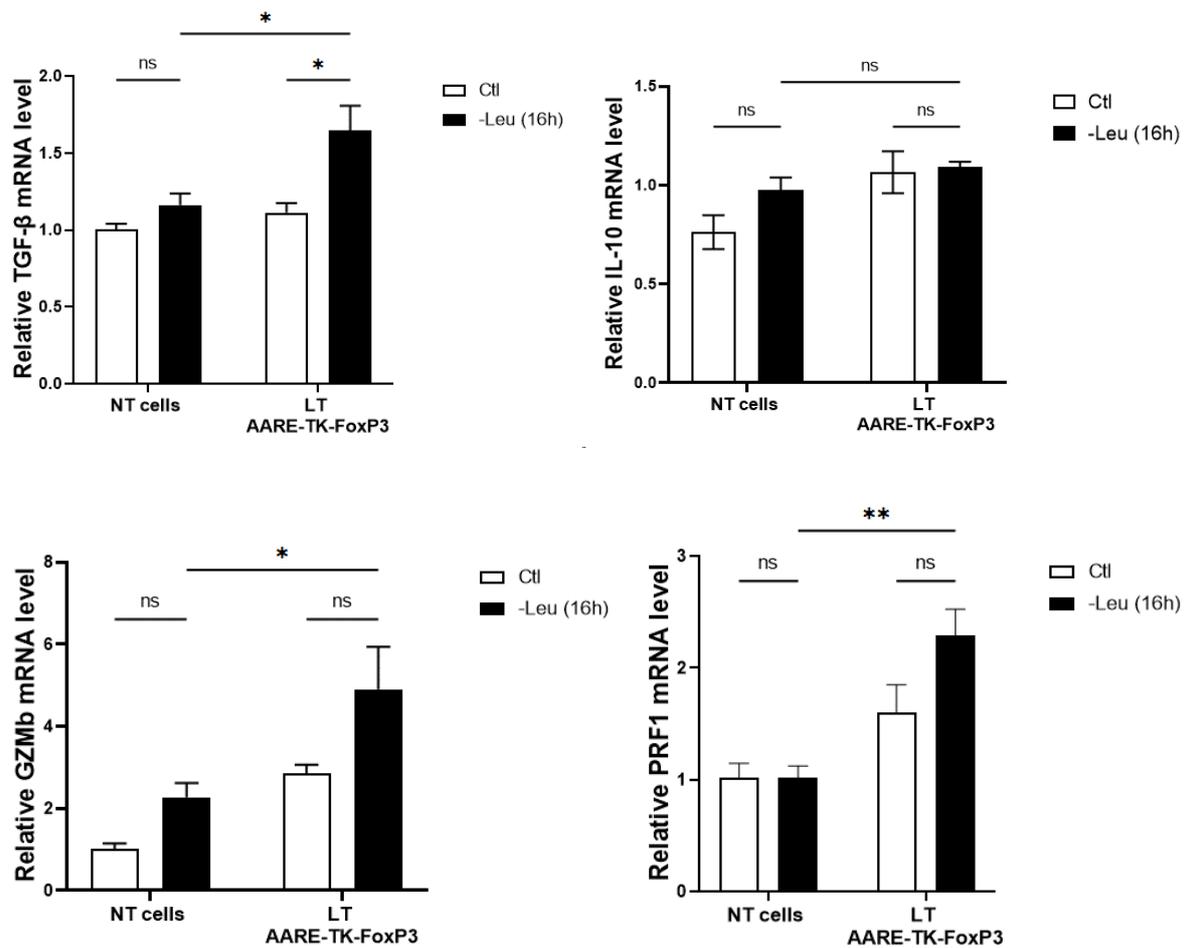


Figure 52. Analyse du niveau d'expression par RT-qPCR de l'ARNm des gènes TGF-β, IL-10, Granzyme B (GZMb) et Perforine 1 (PRF1) de LT non transduits (NT cells) et de LT transduits avec le transgène AARE-TK-FoxP3 (MOI 10) cultivés en milieu contrôlé (Ctl) ou carencé en leucine pendant 16h (-Leu (16h)). Expression normalisée sur celle de l'actine. Test statistique ANOVA (-leu vs ctl et NT cells vs LT AARE-TK-FoxP3) : ns non significatif, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, écart-types S.E.M., $n=3$ /condition.

4) Synthèse et perspectives

Ainsi, nous avons réussi à démontrer qu'une transduction de *FoxP3* sous la dépendance de NUTRIREG permet d'induire l'expression de ce transgène suite à une culture en milieu carencé en leucine pendant 16 heures. Cette expression est induite au niveau transcriptionnel ainsi qu'au niveau traductionnel. Cette expression de FoxP3 est associée à l'augmentation d'expression de la cytokine anti-inflammatoire TGF- β , ainsi qu'aux molécules cytotoxiques Granzyme B et Perforine 1, qui font partie des caractéristiques présentées par les Treg FoxP3+. Cependant, nous n'avons pas encore réussi à démontrer que l'expression contrôlée de FoxP3 permet de modifier le phénotype de la cellule en phénotype Treg CD4+CD25+FoxP3+ en cytométrie en flux. Nous pourrions ainsi compléter ces analyses par des marquages complémentaires de CTLA-4, GITR et CD39 (Gregori *et al.*, 2015). Afin d'évaluer l'impact fonctionnel, nous pourrions également réaliser des expériences de co-culture de nos LT modifiés avec des cellules présentatrices d'antigène et des cellules effectrices afin d'évaluer les effets cytotoxiques et d'inhibition de ces cellules.

Les résultats ayant été rapidement plus satisfaisants avec le transgène AARE-IL-10, nous avons privilégié son développement dans le cadre de ce travail de thèse. Cependant, ce travail avec le transgène FoxP3 mérite d'être approfondi en poursuivant les mises au point sur les conditions de culture et co-culture, de transduction, et de carence en AAI, afin d'obtenir un impact fonctionnel optimal.



DISCUSSION & PERSPECTIVES

SYNTHÈSE ET DISCUSSION DES RÉSULTATS DU TRAVAIL DE THÈSE

I. Description des conditions d'activation de la voie GCN2-ATF4 et de ses conséquences dans les lymphocytes T humains

Dans le but de pouvoir développer NUTRIREG dans le domaine de l'immunothérapie cellulaire, il fallait tout d'abord vérifier qu'il était possible d'induire la voie GCN2-ATF4 dans les lymphocytes T humains par une carence en acides aminés indispensables.

Induction de la voie GCN2-ATF4 dans les lymphocytes T humains

Nous avons ainsi démontré, grâce à la mesure d'expression de gènes cibles d'ATF4 (*TRB3*, *CHOP*, *ASNS*), qu'une carence en chacun des neuf AAI permet d'induire la voie GCN2-eIF2 α -ATF4, et ce dès 4 heures de carence. Nous avons choisi la carence en leucine pour la grande majorité de nos expériences, mais nous aurions pu sélectionner d'autres AAI comme l'isoleucine ou la phénylalanine, qui sont également de bons inducteurs. La carence en tryptophane en revanche semble être le moins bon inducteur, ce qui paraît surprenant au vu du nombre d'expérimentations menées autour de cet AAI pour explorer le rôle de GCN2 dans les lymphocytes T rapporté dans *Munn et al., 2005* ; *Eleftheriadis et al., 2013-2014-2015* ; *Habibi et al., 2010* ; *Fruventoh et al., 2002* ; *Van de Velde et al., 2016* ; *Hayashi et al., 2016* ; et *Rashidi et al., 2020*. Par l'utilisation d'un milieu carencé en leucine, nous avons également démontré que l'induction de la voie GCN2-ATF4 est réversible quelques heures après l'ajout de l'acide aminé manquant, et que l'induction de la voie eIF2 α -ATF4 est bien liée à l'activation de GCN2 grâce à l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique spécifique de cette kinase.

Nécessité absolue d'une activation du lymphocyte T pour l'induction de la voie GCN2-ATF4

Nous avons démontré que l'induction de la voie GCN2-ATF4 par une carence en leucine nécessite absolument que le lymphocyte T soit activé, avec une induction optimale de la voie si les 3 signaux d'activation du LT sont présents (signal activant le CD3, costimulation pour activer le CD28, et signal cytokinique par IL-2). Cela semble plutôt logique puisque le lymphocyte T quiescent, non activé par son antigène, présente un métabolisme de base et des besoins en nutriments assez faibles puisqu'il privilégie la production d'énergie à la biosynthèse (MacIver *et al.*, 2013). Il est donc possible qu'il ne détecte pas la présence d'une carence. Quelques données de la littérature ont déjà montré que l'induction de gènes cibles d'ATF4 dans des lymphocytes T n'était possible que si le LT est activé, mais cela concernait essentiellement des données chez la souris avec l'IDO ou la carence en tryptophane (Munn *et al.*, 2005 ; Van de Velde *et al.*, 2016), ou bien dans des LT humains mais avec des carences longues de plusieurs AA (Hayashi *et al.*, 2016). Il s'agit donc à notre connaissance d'une première démonstration de la relation entre activation du LT et activation de la voie GCN2-ATF4 en cas de carence en leucine dans des lymphocytes T humains.

Impact d'une carence en AAI sur le niveau d'activation du lymphocyte T

Nous avons démontré qu'une carence courte (6h) en leucine n'entraîne pas de modification d'expression des marqueurs d'activation CD25 et CD69 du lymphocyte T, le CD25 étant déjà fortement exprimé par nos cellules en condition contrôle. Ce marqueur étant un marqueur d'activation tardif, et puisque nos analyses sont réalisées 8 jours après l'activation des cellules, il est logique qu'il soit fortement exprimé. De plus, il correspond à la chaîne α du récepteur à l'IL-2, cytokine qui est fortement présente dans nos milieux de culture.

En revanche, nous avons pu démontrer qu'une carence en AAI de 16 heures, entraîne une augmentation de l'expression du CD69 à la surface de la cellule T. Le CD69 est un marqueur d'activation précoce de la cellule T puisque son ARNm est exprimé 30 à 60 minutes suivant

l'activation du TCR, et sa protéine est détectée 2 à 3 heures après. Le CD69 possède de nombreux ligands, le plus spécifique étant Gal-1, exprimé par les cellules dendritiques et les macrophages dans le but de contrôler la réponse inflammatoire et en particulier la différenciation en LT TH17. En plus de ces ligands, le CD69 interagit latéralement avec LAT1, transporteur majeur des acides aminés (*Cibrian et Sanchez-Madrid, 2017*). Le CD69 contribue à la stabilité de LAT1 et ainsi au transport des acides aminés à travers la membrane, en particulier de la leucine et des acides aminés aromatiques comme le tryptophane (*Cibrian Vera et al., 2016*). Il a déjà été démontré dans la littérature que l'expression de LAT1 est induite à la suite d'une activation de la voie eIF2 α -ATF4, en particulier en cas de stress du reticulum endoplasmique (*Usuki et al., 2017*). Nous pouvons donc supposer que l'augmentation d'expression du CD69 à la surface de nos LT activés en cas de carence en leucine (mais aussi avec les autres AAI) est étroitement liée à une induction de l'expression de LAT1 suite à l'activation de la voie eIF2 α -ATF4. Ce niveau d'expression du CD69 semble d'ailleurs corrélé au niveau d'induction de la voie eIF2 α -ATF4 dans nos expériences, puisque la carence en tryptophane est celle qui induit la plus faible augmentation d'expression du CD69, mais aussi le plus faible niveau d'induction de gènes cibles d'ATF4 tels que *TRB3*. Nous pourrions ainsi mesurer l'expression de LAT1 (au niveau de son ARNm et au niveau protéique) et étudier sa corrélation avec le niveau d'expression de CD69.

Impact d'une carence en un AAI sur la fonctionnalité du lymphocyte T

Nous avons tout d'abord étudié l'impact sur la différenciation des CD4⁺ ou sur l'expression de molécules cytotoxiques. Lors d'une carence courte de 6 h, le seul facteur de transcription dont l'expression varie de manière significative est *FoxP3*. Une des hypothèses pour expliquer ce phénomène est celle d'une levée d'inhibition de l'expression de *FoxP3* exercée par la voie mTOR (*Cobbold et al., 2009*), cette dernière étant inhibée lors d'une carence en AA (*Carroll et al., 2015*). Lors d'une carence plus longue, il semblerait que beaucoup plus de facteurs

de transcription et cytokines spécifiques des différents sous-types de CD4+, ou les molécules de cytotoxicité Granzyme B et Perforine 1, voient l'expression de leur ARNm augmenter. Cependant, il ne semble pas qu'un sous-type de T effecteur soit privilégié, et les niveaux d'expression restent assez faibles. Il conviendrait tout de même de vérifier ces résultats de RT-qPCR par une analyse d'expression protéique de ces différents facteurs (technique ELISA ou dosage multiplex), afin de savoir si cette modulation transcriptionnelle entraîne un réel impact biologique.

Par ailleurs, la réalisation d'une analyse transcriptomique par technique de RNA-Seq de lymphocytes T activés carencés ou non en leucine pendant 6 heures nous a permis d'approfondir ces données. Nous avons ainsi identifié 6045 gènes différentiellement exprimés de manière significative (P-value ajustée < 0,001) entre le milieu contrôle et le milieu carencé en leucine, dont 1233 gènes surexprimés ($FC \geq 1,5$) et 807 gènes réprimés ($FC \leq 0,67$). L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de GCN2 nous a permis d'identifier, parmi ces gènes, 767 gènes dont l'expression est dépendante de la kinase GCN2 : 526 parmi les gènes surexprimés et 241 parmi les gènes réprimés. L'analyse de *Gene Ontology* de l'ensemble des gènes surexprimés et réprimés, nous a permis de démontrer qu'une carence courte en leucine entraîne une modulation d'un certains nombres de processus biologiques, impliquant des fonctions métaboliques, mais également des fonctions immunitaires. L'analyse complémentaire de GO en ne ciblant que les gènes dépendants de GCN2 semble démontrer que la kinase joue essentiellement un rôle dans la modulation des processus métaboliques, et que son rôle dans la modulation des fonctions immunes est plutôt au second plan. Ces résultats avec l'inhibiteur de GCN2 doivent toutefois être confirmés avec une autre stratégie d'inhibition de la kinase, par exemple en utilisant un sh-RNA. Les mécanismes de modulation des fonctions immunitaires du lymphocyte T en cas de carence en leucine, en plus de ceux impliquant la voie GCN2-ATF4, méritent d'être plus précisément étudiés.

I. Preuve de concept de la fonctionnalité de la technologie NUTRIREG dans des lymphocytes T humains *in vitro*

1) A l'aide d'un gène rapporteur

Après avoir validé le fait que la voie GCN2-ATF4 peut bien être induite par une carence en AAI dans les lymphocytes T humains, et après avoir défini les conditions optimales pour son activation, nous avons pu établir une preuve de concept de la fonctionnalité de NUTRIREG dans les lymphocytes T humains *in vitro*, tout d'abord à l'aide de gènes rapporteurs.

Avec le gène rapporteur luciférase

Nous avons en première intention utiliser le gène rapporteur luciférase avec le transgène AARE-TK-LUC, qui nous a permis de valider l'induction possible de ce transgène dans nos lymphocytes T activés, en cas de carence en leucine, et ce dès 3 heures de carence. Nous sommes rapidement passés à l'utilisation du gène rapporteur Green Fluorescent Protein (GFP) avec le transgène AARE-TK-eGFP afin de pouvoir réaliser des analyses plus fines en cytométrie en flux, ce qui n'était pas possible avec le gène luciférase.

Avec le gène rapporteur Green Fluorescent Protein (GFP)

Les expériences menées avec le transgène AARE-TK-eGFP nous ont permis de valider l'induction possible de la eGFP dans nos lymphocytes T activés, à condition d'exposer les cellules à un temps de carence plus long en AAI (16h) que pour la luciférase. Une carence en chacun des neuf AAI permet d'induire l'expression du transgène, le tryptophane restant le moins bon inducteur, ce qui est cohérent avec les données décrites précédemment (moindre induction de la voie GCN2-ATF4 et du CD69). Nos résultats montrent également que le pourcentage de LT CD8⁺ exprimant la eGFP en cas de carence en leucine est supérieur à celui des LT CD4⁺. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : (i) la population T CD8⁺ est celle pour laquelle la transduction est la plus efficace ou (ii) la population T CD8⁺ est celle

qui est la plus sensible à la carence en AAI. Afin de répondre à ce questionnement, nous pourrions envisager de réaliser une transduction avec le transgène AARE-TK-eGFP en lui intégrant un marqueur de surface permettant d'évaluer le pourcentage de cellules transduites, ce qui n'est pas le cas actuellement dans les constructions utilisées pour ce travail. Nous avons également montré que l'expression du transgène induite par la carence en leucine est bien liée à l'activation de la voie GCN2-ATF4, puisque l'ajout d'un inhibiteur pharmacologique de GCN2 inhibe l'expression de la eGFP dans les cellules transduites carencées. Enfin, nous avons pu montrer que l'activation du lymphocyte T est indispensable pour induire un transgène sous la dépendance de NUTRIREG puisque les cellules T transduites non activées (n'exprimant ni le CD25, ni le CD69) n'expriment pas la eGFP, et que les cellules T transduites qui expriment le plus la eGFP sont celles qui sont le plus fortement activées (en exprimant à la fois le CD25 et le CD69). Ces résultats sont ainsi cohérents avec ceux de la première partie du travail.

2) A l'aide d'un gène à orientation thérapeutique

Dans l'objectif final de faire polariser le lymphocyte T en phénotype T régulateur afin de prévenir ou de traiter une réaction du greffon contre l'hôte (GvH) après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, nous avons mené des expériences avec deux types de transgène : un transgène permettant l'expression contrôlée de la cytokine IL-10 et un transgène permettant l'expression contrôlée de FoxP3. L'hypothèse initiale était qu'une expression transitoire et régulée, suite à l'exposition des LT à une carence en leucine, d'IL-10 ou de FoxP3 permettrait d'orienter la différenciation de ces LT respectivement en phénotype Tr1 ou Treg FoxP3+ (Gregori *et al.*, 2015).

Expression contrôlée de la cytokine IL-10 dans les lymphocytes T humains

En ce qui concerne le transgène AARE-TK-IL-10, nous avons démontré qu'il était possible d'induire l'expression d'IL-10 sous la dépendance de NUTRIREG, en cas de carence en leucine de 16h, et ce tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau traductionnel. L'ajout de leucine dans le milieu carencé entraîne un arrêt de la transcription de l'ARNm d'IL-10 dès 24h, la protéine elle reste détectable dans le milieu de culture jusqu'à 48 heures, probablement à cause de la stabilité ou de la clairance de cette protéine. L'analyse du marquage intra-cellulaire d'IL-10 par cytométrie en flux montre, comme pour le transgène eGFP, que l'expression du transgène IL-10 prédomine dans les lymphocytes T CD8+. L'expression d'IL-10 suite à l'exposition à une carence en leucine de 16h est associée à une augmentation de l'expression des ARNm de Granzyme B, d'IFN- γ et d'IL-22, ainsi qu'à une absence d'expression de FoxP3 et d'IL-4, ce profil d'expression étant celui des lymphocytes Tr1 (*Gregori et al., 2015*). De plus on retrouve, 24 heures après l'ajout de leucine dans le milieu carencé, une augmentation de la co-expression des marqueurs de surface CD49b et LAG3 en cytométrie en flux, phénotype caractéristique des Tr1 (*Gagliani et al., 2013*). Le pourcentage de cellules avec un phénotype Tr1 est faible dans nos expériences mais cohérent avec les données de la littérature. En effet, environ 2% de cellules Tr1 sont détectées dans le sang de donneur sain (2,14% +/- 0,25% dans la publication de *Gagliani et al., 2013*), ce qui correspond aux données obtenues dans notre population de LT non transduits et de LT transduits non carencés. La carence en leucine permet de doubler au minimum le pourcentage de cellules CD4⁺LAG3⁺CD49b⁺, ce qui pourrait très certainement être encore amélioré par une transduction sélective de lymphocytes T CD4⁺. Afin de compléter ces expériences, il conviendrait de vérifier le profil cytokinique des LT ainsi orientés Tr1 (par exemple en technique ELISA), et de valider leur effet immunosuppresseur sur d'autres LT en système de co-culture (inhibition de prolifération par exemple).

Expression contrôlée du facteur de transcription FoxP3 dans les lymphocytes T humains

Concernant nos résultats avec le transgène AARE-TK-FoxP3, nous avons pu démontrer qu'il est possible d'induire une expression de FoxP3 sous la dépendance de NUTRIREG suite à une culture en milieu carencé en leucine pendant 16 heures, au niveau transcriptionnel ainsi qu'au niveau traductionnel. Cette expression de FoxP3 est associée à l'augmentation d'expression de la cytokine anti-inflammatoire TGF- β , ainsi que des molécules cytotoxiques Granzyme B et Perforine 1, qui font partie des caractéristiques présentées par les Treg FoxP3+ (Gregori *et al.*, 2015). Cependant, nous n'avons pas réussi à démontrer que l'expression contrôlée de FoxP3 permet de modifier le phénotype de la cellule en phénotype Treg CD4+CD25+FoxP3+ en cytométrie en flux, du fait d'une forte expression préalable de CD25 et d'un marquage intracellulaire de FoxP3 identique quelles que soient les conditions. Ces analyses pourraient être complétées par d'autres marquages spécifiques des Tregs tels que CTLA-4, GITR et CD39. Nous pourrions également réaliser des expériences de co-culture des LT ainsi modifiés avec des cellules cibles présentatrices d'antigène et des cellules T effectrices afin d'évaluer les effets cytotoxiques et immunosuppresseurs.

II. Preuve de concept de la fonctionnalité de la technologie NUTRIREG dans des lymphocytes T humains *in vivo*

La dernière partie de notre travail visait à établir une preuve de concept *in vivo* de la fonctionnalité de NUTRIREG dans des lymphocytes T humains. La grande difficulté de cette partie du travail résidait dans le fait que la technologie NUTRIREG permet de contrôler l'expression d'un transgène dans les lymphocytes T, mais uniquement si ces derniers sont activés. Il fallait donc travailler avec un modèle murin, dans lequel nous pouvions injecter des lymphocytes T humains transduits avec notre système, et dans lequel les lymphocytes T pouvaient être activés au moment de l'exposition de la souris à un régime carencé en un acide

aminé indispensable. Nous avons ainsi choisi de travailler avec un modèle de souris humanisée classiquement utilisé dans des modèles de GvH : la souris NXG (Janvier Labs). Cette souris est immunodéficiente car elle présente une mutation $Prkdc^{scid}$ entraînant un blocage de développement des lymphocytes T et B, et une mutation du gène codant pour la chaîne γ de l'IL-2 ($IL2rg^{Tm1}$), bloquant ainsi la différenciation et le fonctionnement de nombreuses cellules hématopoïétiques, en particulier des cellules NK. La combinaison de ces deux mutations confère donc à ces souris une immunodéficience sévère avec absence de lymphocytes T, B et NK. Elles sont ainsi fréquemment utilisées dans les travaux expérimentaux autour de la transplantation, et en particulier de la GvH (*Ali et al., 2012*).

Nous avons choisi d'établir notre preuve de concept *in vivo* avec le transgène AARE-TK-IL-10. La détermination du nombre de cellules à injecter ($10 \cdot 10^6$ de lymphocytes T humains transduits au préalable avec le transgène et $5 \cdot 10^6$ de PBMCs humains autologues) a été faite à partir des données de la littérature (*Volk et al., 2012 ; Parmar et al., 2014 ; Ali et al., 2012*). L'injection des PBMCs avait pour but d'entraîner une activation des lymphocytes T au sein de la souris par les cellules présentatrices d'antigène présentes dans les PBMCs. Ces PBMCs ont été au préalable irradiés (30 Gy) afin de limiter leur survie et leur expansion après l'injection. En effet, l'objectif était qu'ils activent initialement les lymphocytes T, puis qu'ils soient détruits afin de laisser la place pour le développement des lymphocytes T modifiés.

Du fait de contraintes logistiques liées à la fermeture de l'animalerie du centre INRAe de Theix pour travaux, nous avons été amenés à réaliser nos expériences dans une autre animalerie à Clermont-Ferrand, avec une possibilité d'hébergement d'un faible nombre de souris. Nous avons ainsi pu injecter nos cellules par voie intra-veineuse (veine de la queue) à dix souris NXG. Malheureusement, une des souris est morte lors de l'injection. Les analyses sanguines réalisées à la fin de la consommation des régimes contrôle ou carencé en leucine nous ont tout

d'abord permis de suivre l'expansion de nos cellules CD45⁺ humaines dans le sang circulant, sans impact de la carence en leucine sur cette expansion. En revanche, parmi les neuf souris, deux (une du groupe contrôle et une du groupe carencé) n'ont pas eu d'expansion satisfaisante des cellules CD45⁺ humaines (< 5%).

Nous souhaitions initialement réaliser des marquages intracellulaires d'IL-10 en cytométrie en flux mais les prélèvements sanguins ne contenant que 100 µL de sang au maximum, le nombre d'évènements était trop faible pour réaliser de tel marquage de manière fiable. Nous avons ainsi mesuré la concentration d'IL-10 humaine dans le plasma des souris et avons pu mettre en évidence une concentration croissante d'IL-10 au fur et à mesure du temps, avec une concentration supérieure chez les souris soumises au régime carencé en leucine par rapport aux souris soumises au régime contrôle.

Cette première preuve de concept de la possibilité d'exprimer *in vivo* un transgène sous la dépendance de NUTRIREG dans les lymphocytes T humains doit cependant être reproduite et approfondie. Les résultats obtenus doivent être confirmés sur un nombre plus important de souris. Il serait intéressant également de compléter les résultats de mesure de l'expression de la protéine IL-10 par des analyses en immunofluorescence de différents organes comme le foie, la rate, les intestins ou la peau, à l'aide d'anticorps anti-CD45 et anti-IL-10 humains. Afin de valider la possibilité d'une régulation on/off du transgène, il conviendrait également que chaque souris soit son propre contrôle avec un prélèvement réalisé sous régime contrôle puis un second réalisé après consommation d'un régime carencé en leucine. Le temps de carence et l'acide aminé inducteur doivent également être affinés car la carence en leucine pendant 16 heures peut ne pas être la condition optimale.

PERSPECTIVES DE CE TRAVAIL DE THÈSE

Ce travail a permis de démontrer que la technologie NUTRIREG peut être utilisée dans les lymphocytes T humains afin de faire exprimer un gène à orientation thérapeutique par exposition à une carence en un acide aminé indispensable. Nos données sont principalement issues d'expériences *in vitro* et nos premiers résultats *in vivo* sont encourageants. Une fois que ces résultats seront confirmés et que nous aurons finalisé un certain nombre de mises au point, nous pourrons envisager des perspectives d'utilisation de la technologie NUTRIREG dans le domaine de l'immunothérapie cellulaire, dont voici quelques illustrations.

I. NUTRIREG et allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

1) Rationnel de l'utilisation de lymphocytes T régulateurs pour la prévention ou le traitement de la réaction du greffon contre l'hôte (GvH)

La GvH est une complication fréquente de l'allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (allo-CSH) puisque 30 à 70% des patients allogreffés développeront une GvH dite aigüe (apparaissant dans les 100 jours suivant la greffe). Il s'agit également d'une complication grave car 15 à 20% des patients décéderont des suites d'une GvH sévère, et la GvH sous sa forme chronique représente la première cause de décès non liés à la rechute de la maladie. Plusieurs stratégies thérapeutiques sont utilisées actuellement pour prévenir l'apparition d'une GvH telles que le sérum anti-lymphocytaire, les inhibiteurs de calcineurine ou encore les injections en post-allogreffe de cyclophosphamide. En cas d'apparition d'une GvH, les corticoïdes sont utilisés en première intention, mais une proportion non négligeable de patients y sera résistant. Tous ces traitements immunosuppresseurs impactent bien entendu le fonctionnement du système immunitaire, entraînant ainsi un risque infectieux accru mais aussi une altération de l'effet GvT

(*Graft versus Tumor*) ou GvL (*Graft versus Leukemia*) attendu de la greffe. Il est donc essentiel de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour répondre au mieux à cette situation (Jiang *et al.*, 2021).

Pour rappel, la réaction de GvH fait suite à la reconnaissance des antigènes du receveur comme étant étrangers par les cellules présentatrices d'antigène du donneur, aboutissant à l'activation des lymphocytes T du donneur, puis au relargage de cytokines inflammatoires et à la prolifération de cellules cytotoxiques responsables de la destruction des tissus sains du receveur (**Figure 3**) (Ghimire *et al.*, 2017). Il a été démontré qu'à cette réaction inflammatoire s'associe une perte progressive de lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, entraînant une dérégulation et une expansion de LT CD4⁺ de phénotype T_H1 ou T_H17 (Chen *et al.*, 2007). Or, ces lymphocytes Treg ont des fonctions immunosuppressives qui pourraient être d'un intérêt majeur pour limiter cette réaction inflammatoire. En effet, ils peuvent freiner différents types cellulaires tels que les LT CD4⁺ et CD8⁺, les cellules présentatrices d'antigène, mais aussi les cellules NK et les lymphocytes B par déplétion du micro-environnement en IL-2, relargage de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF-β, IL-35), sécrétion de Granzyme B et Perforine 1 aboutissant à l'apoptose de leurs cellules cibles, et expression du CTLA-4 bloquant les signaux de costimulation (Romano *et al.*, 2017). Tout comme les Tregs, les cellules Tr1 peuvent avoir un intérêt majeur dans la prévention de la GvH du fait de leur capacité à produire de fortes doses d'IL-10, d'inhiber la production d'IL-2 et d'IFN-γ par les LT pro-inflammatoires, de freiner l'activité des cellules présentatrices d'antigène en inhibant la production de molécules de costimulation et de cytokines pro-inflammatoires, et de détruire ces CPA par mécanisme cytotoxique direct par le Granzyme B (**Figure 48**) (Song *et al.*, 2021).

2) Données pré-cliniques et cliniques de l'utilisation de Treg et de Tr1 pour la prévention ou le traitement de la GvH

Données pré-cliniques

L'intérêt de l'injection de lymphocytes T régulateurs en prévention de l'apparition d'une GvH a d'abord été démontré chez la souris. On retrouve plusieurs modèles murins de GvH : soit la GvH est induite par une injection de lymphocytes T issus d'une autre souche de souris (ex : injection de CD4⁺ issus de souris C57BL/6 à des souris BALB/c qui présentent entre elles un mismatch complet pour les CMH de classe I et II), soit la GvH est induite par injection de cellules T humaines à des souris NXG. Dans la majorité des cas, les souris sont au préalable irradiées dans le cadre du conditionnement de l'allogreffe.

Il a tout d'abord été mis en évidence que l'injection d'un greffon déplété en lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ accélère la mortalité liée à la GvH (*Taylor et al., 2002*). A l'inverse, l'injection de cellules CD4⁺CD25⁺ préalablement activées et expansées *ex vivo* entraîne une amélioration de la GvH et une augmentation significative de la survie chez ces souris en comparaison à celles n'ayant reçu que des CD4⁺ ou des CD4⁺ associées à des CD4⁺CD25⁻ (*Taylor et al., 2002*). Il a ensuite été démontré que ces Tregs améliorent la GvH en inhibant la prolifération des LT alloréactifs, mais ils n'impactent pas les capacités d'activation et de sécrétion de perforine de ces derniers, permettant ainsi de conserver l'effet anti-tumoral GvT (*Edinger et al., 2003*). Une des problématiques avec l'utilisation potentielle de Tregs est que cette population de cellules est peu représentée dans le sang circulant (5-10% de la population totale de CD4⁺), alors qu'il faut une quantité importante de cellules pour avoir un effet thérapeutique (*Taylor et al., 2002*). Certaines équipes se sont alors intéressées à l'expansion de Tregs issus de sang de cordon, et ont démontré que cette technique était viable mais également efficace en termes de prévention de la GvH dans un modèle de souris NXG (*Parmar et al., 2014*). Comme décrit précédemment, il a été démontré qu'une transduction de lymphocytes T avec le gène *FoxP3* permet d'orienter

le phénotype de ces lymphocytes T en phénotype Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, avec acquisition de fonctions immunosuppressives (*Fontenot et al., 2003 ; Hori et al. 2003 ; Allan et al., 2008*). Cela a également été validé dans un modèle murin de GvH par injection de lymphocytes T humains CD4⁺ transduits au préalable avec un lentivirus portant le gène *FoxP3*. D'une part, ces CD4^{FoxP3} permettaient de prévenir efficacement l'apparition de GvH, et conservaient d'autre part leur phénotype Treg de manière stable dans le temps (*Passerini et al., 2013*).

En ce qui concerne les Tr1, différentes techniques ont été étudiées et validées *in vitro* et *in vivo* pour la génération de ces cellules afin d'être utilisées à visée thérapeutique. Pour rappel, ces cellules représentent un pourcentage minime des cellules circulantes (environ 2% chez des donneurs sains) (*Gagliani et al., 2013*), il faut donc amplifier ces cellules pour obtenir des quantités satisfaisantes. Parmi les techniques mises au point, l'une consiste à mettre en coculture des LT CD4⁺ ou des PBMCs du donneur avec des monocytes allogéniques du receveur en présence d'IL-10, ou avec des cellules dendritiques de type DC-10 qui sécrètent naturellement de fortes doses d'IL-10, afin d'obtenir une population de Tr1 spécifique de l'allo-antigène, ainsi que des précurseurs de ces cellules (*Gregori et Roncarolo, 2018*). Une autre stratégie consiste à induire de manière stable une surexpression d'IL-10 par les LT CD4⁺, grâce à une transduction lentivirale. Il a été démontré que cette transduction aboutit à l'acquisition d'un phénotype Tr1 et à des fonctions immunosuppressives *in vitro* par suppression de la réponse allogénique, mais également *in vivo* avec amélioration des signes de GvH et de la survie des souris (*Andolfi et al., 2012*). Il a de plus été démontré que ces LT CD4^{IL-10} ont des effets anti-leucémiques directs *in vitro* et *in vivo* grâce à la sécrétion de Granzyme B. L'injection conjointe de PBMCs et de CD4^{IL-10} entraîne ainsi à la fois un effet GvL et une prévention de la GvH induite par les PBMCs grâce à l'action de l'IL-10, avec toutefois un effet anti-leucémique un peu plus faible lors de l'adjonction des CD4^{IL-10} (*Locafaro et al., 2017*).

Essais cliniques

Ces données pré-cliniques ont d'ores-et-déjà abouti à quelques essais cliniques chez l'Homme.

La plupart de ces essais cliniques concernent l'utilisation de Tregs FoxP3+, isolés à partir du sang périphérique du donneur ou de sang de cordon, puis réinjectés tel quel ou après une étape d'expansion *in vitro*. Ces essais, menés sur un faible nombre de patients, ont permis de démontrer que cette injection est faisable et bien tolérée. Certains d'entre eux ont de plus montré une efficacité sur la prévention de la GvH. Par exemple, l'équipe de Brunstein *et al.* a injecté des Tregs issus de sang de cordon à 23 patients allogreffés, et a obtenu une diminution de l'incidence de la GvH aiguë de grade II-IV en comparaison à un groupe contrôle de patients traités antérieurement par allogreffe sans Tregs (n=108) (43% vs 61%, P = 0,05), et ce sans impact péjoratif sur le risque d'infection, de rechute ou de mortalité (Brunstein *et al.*, 2011). On retrouve également des résultats prometteurs dans un essai de phase II ayant inclus 43 patients atteint de leucémie aiguë traités par allogreffe haplo-identique avec un greffon enrichi en LT conventionnels et en LT régulateurs du donneur. A la suite de cette greffe, aucun traitement immunosuppresseur n'était donné, et seulement 15% des patients ont développé une GvH de grade ≥ 2 . De plus, le taux d'incidence cumulative de rechute de leucémie était significativement inférieur en comparaison au groupe contrôle de patients traités antérieurement sans Tregs (Martelli *et al.*, 2014).

Concernant l'utilisation de Tr1 en prévention de la GvH, on retrouve essentiellement un essai de phase I dans lequel les patients traités par allogreffe de CSH de type haplo-identique ont reçu des LT du donneur rendus préalablement anergiques (essai ALT-TEN). Pour cela, ces LT issus du donneurs ont été prélevés et mis en coculture avec des cellules présentatrices issus du receveur en présence d'IL-10, avant d'être réinjectés au patient. Douze patients ont ainsi reçu ces DLI-IL-10 (*Donor Lymphocyte Infusion*), en moyenne 35 jours après l'allogreffe.

Cette injection a montré une efficacité chez quatre patients, avec d'une part une reconstitution immune rapide, une GvH aigue modérée (3 patients avec une GvH de grade II et 1 patient avec GvH de grade III), l'absence de rechute de la maladie et une survie prolongée (patients toujours en vie plus de 5 ans après le traitement) (*Bacchetta et al., 2014 ; Gregori et al., 2015*). Il semblerait que ces résultats puissent être améliorés par coculture de LT CD4+ du donneur avec des cellules dendritiques tolérogènes de type DC-10, permettant d'obtenir une population encore plus enrichie en Tr1, qui reste détectable de manière prolongée dans le sang des patients allogreffés (*Chen et al., 2021*).

De nombreux essais cliniques sont en cours avec des lymphocytes T régulateurs dans le cadre de la prévention de la GvH après allogreffe de CSH, que ce soit avec des Tregs ou avec des Tr1, dans un but d'évaluation de leur efficacité mais aussi d'amélioration des techniques de production de ces cellules. Notons que ces cellules T régulatrices sont également en voie de développement dans d'autres domaines, principalement dans le domaine de la transplantation d'organes solides, mais aussi dans celui du traitement des maladies auto-immunes (*Gregori et al., 2015 ; Gregori et Roncarolo 2018 ; Romano et al., 2017*).

3) Quelle place pour NUTRIREG pour la prévention ou le traitement de la GvH ?

Les données concernant les Tregs obtenus par transduction de *FoxP3* ou les Tr1 obtenus par transduction d'*IL-10* sont prometteuses en termes de différenciation de la cellule en un phénotype régulateur avec acquisition de fonctions immunosuppressives, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles murins de GvH (*Passerini et al., 2013 ; Andolfi et al., 2012 ; Locafaro et al., 2017*). Toutefois, se pose la question du risque de perte d'effet anti-tumoral suite à une expression constitutive et permanente d'IL-10 par les lymphocytes T transduits. Une expression contrôlée et transitoire de FoxP3 ou d'IL-10 sous la dépendance de NUTRIREG pourrait donc être pertinente dans ce contexte.

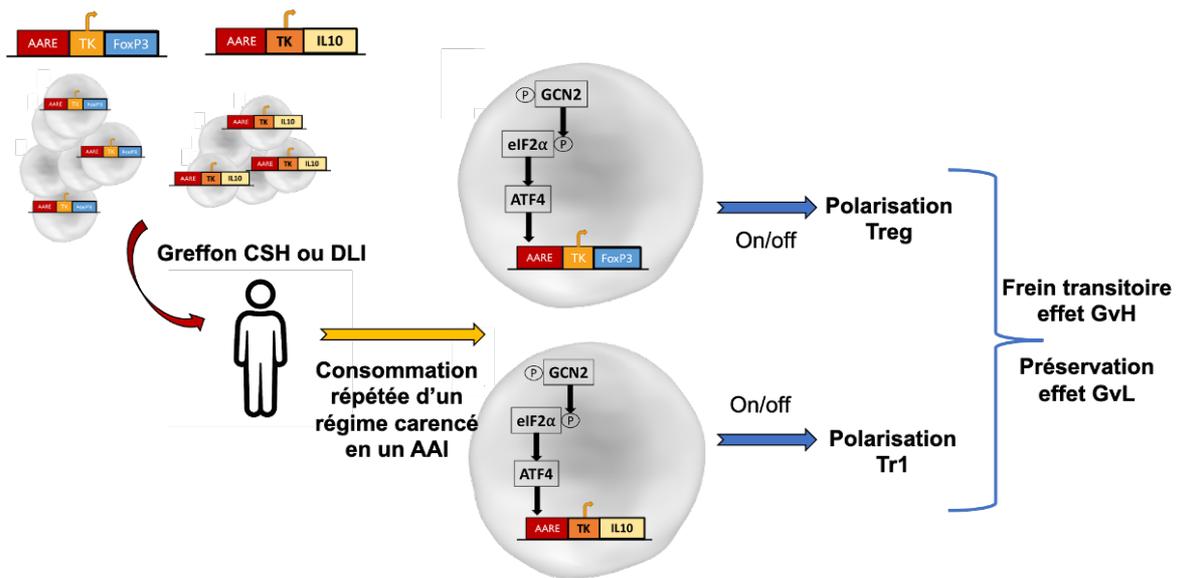


Figure 53. Stratégie potentielle d'utilisation de NUTRIREG pour la prévention ou le traitement de la GvH dans le cadre de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

Nous pourrions ainsi imaginer deux scénarios possibles (**Figure 53**) :

- Le premier serait celui de l'injection d'un **greffon** dans lequel seraient associé aux cellules CD34+ habituelles des LT du donneur transduits avec le transgène AARE-TK-FoxP3 ou le transgène AARE-TK-IL-10. Le patient receveur pourrait ensuite consommer de manière répétée un régime carencé en un acide aminé indispensable afin d'induire le transgène de manière pulsée mais réversible. Cette induction ponctuelle et transitoire du transgène pourrait ainsi permettre d'induire une différenciation Treg ou Tr1 visant à prévenir ou freiner l'apparition d'une GvH, tout en conservant au maximum l'effet GvL.
- Le second scénario serait celui de l'injection de poches de **DLI** (*Donor Lymphocyte Infusion*) contenant en partie des LT transduits avec le transgène AARE-TK-FoxP3 ou le transgène AARE-TK-IL-10. Les injections de DLI sont classiquement réalisées dans le but de prévenir ou de traiter la rechute de la maladie, mais elles s'accompagnent très classiquement d'une GvH parfois sévère (*De Vos et al., 2019*). L'injection de DLI-NUTRIREG pourrait ainsi être réalisée en cas de rechute de la maladie, avec à la fois un effet bénéfique GvL des LT allogéniques et un effet préventif sur la GvH des LT transduits grâce à la consommation répétée d'un régime carencé en un AAI par le patient receveur. Ces poches de DLI-NUTRIREG pourraient également ne contenir que des LT modifiés FoxP3 ou IL-10 et être ainsi injectés précocement en cas d'apparition de signes de GvH.

La technologie NUTRIREG présente ainsi l'avantage dans ce contexte d'orienter de manière transitoire et réversible la réponse immunitaire vers une réponse tolérogène. De plus, NUTRIREG ne pouvant être induit que dans des lymphocytes T activés, l'induction de la réponse anti-inflammatoire se fera très certainement majoritairement au niveau des sites où les lymphocytes T sont fortement activés, et donc au niveau des sites de GvH, évitant ainsi un effet immunosuppresseur à distance. Cet effet immunosuppresseur « localisé » peut ainsi permettre de ne pas majorer le risque infectieux ni le risque de rechute de la maladie secondaire à la perte

d'effet GvT. Rappelons également que NUTRIREG est induit par un mécanisme nutritionnel et non pharmacologique, évitant ainsi toute interaction avec les nombreux traitements habituellement pris par les patients allogreffés.

4) Stratégie expérimentale pour démontrer la fonctionnalité de NUTRIREG pour la prévention ou le traitement de la GvH avec le transgène AARE-TK-IL-10

Nous avons d'ores-et-déjà démontré que la technologie NUTRIREG permet d'induire une expression transitoire et réversible d'IL-10 dans les lymphocytes T humains, avec une orientation vers un phénotype régulateur de type Tr1. Nous avons également obtenu des premiers résultats encourageant quant à la possibilité d'exprimer *in vivo* de l'IL-10 sous la dépendance de NUTRIREG. Une fois ces résultats confirmés et optimisés, la suite consistera à démontrer que l'expression d'IL-10 sous la dépendance de NUTRIREG peut permettre de prévenir ou de traiter une GvH chez la souris.

Pour cela, il faudra tout d'abord envisager d'irradier au préalable ces souris afin qu'elles développent une GvH plus sévère que celle qu'elles ont pu développer dans nos expériences réalisées sans irradiation. En effet, nous avons pu constater une perte de poids et une modification du pelage chez nos souris mais de manière très modérée en comparaison à ce qui est décrit dans la littérature (*Parmar et al., 2014 ; Ali et al., 2012*).

Ensuite, de la même manière que dans nos expériences déjà réalisées, nous pourrions injecter des LT AARE-TK-IL-10 aux souris (en association à des PBMCs, indispensables pour le développement de la GvH) puis exposer chaque semaine un groupe de souris à un régime carencé en un AAI et un autre groupe à un régime complet. L'objectif serait ainsi de valider que la consommation répétée d'un régime carencé en un AAI permet (i) l'expression transitoire et répétée d'IL-10, (ii) d'obtenir l'expansion d'un clone de cellules Tr1, et (iii) d'obtenir un effet anti-inflammatoire prévenant l'apparition d'une GvH, en comparaison aux souris

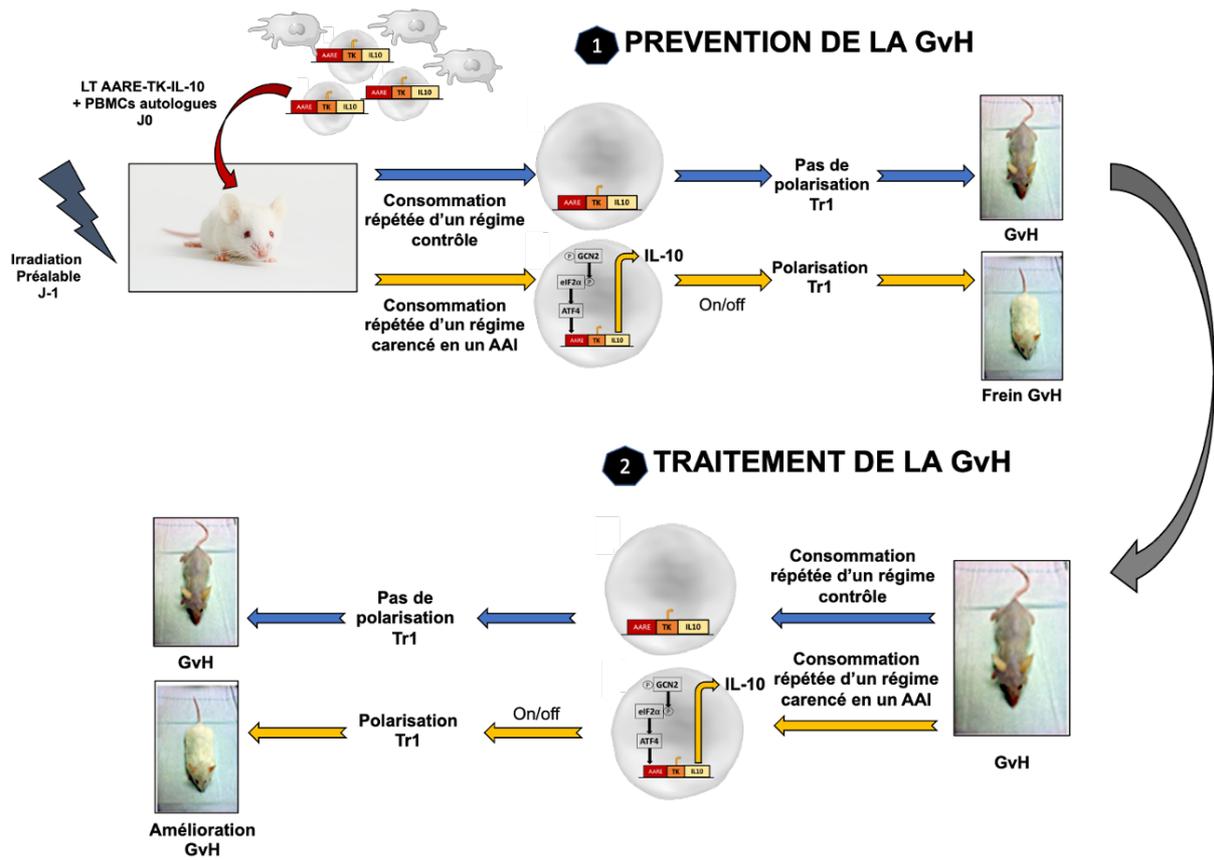


Figure 54. Stratégie expérimentale pour démontrer la fonctionnalité de NUTRIREG pour la prévention ou le traitement de la GvH avec le transgène AARE-TK-IL-10 dans un modèle murin.

soumises à un régime contrôle. Afin d'éviter qu'une carence répétée en un AAI ait des effets délétères, nous pourrions aussi envisager d'alterner des carences en différents AAI (*Chaveroux et al., 2016*) (**Figure 54**).

Nous pourrions également évaluer l'efficacité de NUTRIREG-IL-10 pour le traitement de la GvH et ainsi attendre que les souris développent des symptômes (perte de poids, alopecie, troubles digestifs, ...) avant de les exposer à un régime carencé en un AAI ou à un régime complet. L'objectif serait ainsi de démontrer que l'expression contrôlée d'IL-10 par la carence en AAI permet d'améliorer les symptômes de GvH en comparaison aux souris soumises à un régime contrôle. Cependant, il faudra s'assurer que les symptômes de GvH ne soient pas trop sévères au moment de débiter l'induction du transgène afin que les souris puissent consommer la nourriture carencée (**Figure 54**).

Enfin, nous pourrions vérifier qu'en plus de prévenir l'apparition de la GvH, nos lymphocytes T exprimant l'IL-10 sous la dépendance de NUTRIREG n'impactent pas l'effet GvT en injectant en plus de nos cellules immunitaires des cellules tumorales (par exemple des cellules leucémiques), puis suivre à la fois les signes de GvH et à la fois la survie sans maladie chez les souris (*Locafaro et al., 2017*).

5) Une autre piste potentielle pour l'utilisation de NUTRIREG au cours d'une allo-CSH : stimuler le greffon en cas de rechute ?

Les rechutes sont malheureusement fréquentes après une allogreffe de CSH puisqu'elles concernent 30 à 40% des patients atteints d'une leucémie aiguë myéloblastique et environ 30% des patients atteints d'une leucémie aiguë lymphoblastique avec chromosome de Philadelphie. Le pronostic de ces patients est particulièrement péjoratif et les stratégies thérapeutiques assez limitées. Dans le meilleur des cas, si l'état général du patient le permet, on proposera des traitements intensifs avec de la chimiothérapie, souvent associée à la transfusion des

lymphocytes du donneur (DLI), ou même une deuxième allogreffe à partir du même donneur ou d'un donneur différent. En revanche, chez les patients non éligibles à un traitement intensif, on propose souvent une chimiothérapie à faible dose, des agents hypométhylants dans certaines indications, l'arrêt de l'immunosuppression, les DLI ou un traitement palliatif, dans le but de contrôler la maladie et non d'obtenir une rémission (*Yafour et al., 2017*).

Ainsi, les stratégies thérapeutiques actuelles pour traiter la rechute présentent une efficacité variable et impliquent l'utilisation de traitements à haut risque de complications, pour des patients déjà fragiles. Dans le cas où la rechute de la maladie n'est pas liée à une perte de chimérisme (donc non liée à la disparition des cellules du donneur), il pourrait être intéressant de stimuler les cellules T du donneur afin de rebooster l'effet GvT. Ainsi, nous pourrions imaginer, comme pour la prévention de la GvH, d'injecter un greffon de CSH contenant en partie des LT du donneurs transduits avec un transgène placé sous la dépendance de NUTRIREG dont l'expression induirait une réponse cytotoxique anti-tumorale. La consommation répétée d'un régime carencé en un AAI par le patient receveur en cas de rechute permettrait ainsi une induction pulsée et transitoire de cette réponse cytotoxique, limitant ainsi le risque de GvH.

Pour le choix du transgène potentiellement intéressant dans ce contexte, il s'agirait principalement de molécules connues pour entraîner un effet GvL. Il pourrait ainsi s'agir de molécules cytotoxiques telles que Fas, Granzyme B ou Perforine 1, ou bien des cytokines ayant un effet anti-tumoral comme l'IFN- γ ou le TNF- α (*Chang et al., 2018*).

II. NUTRIREG et cellules T à récepteur antigénique chimérique

1) Cellules CAR-T : les problématiques actuellement rencontrées et les stratégies développées pour y faire face

La stratégie des cellules CAR-T a rapidement été considérée comme révolutionnaire devant l'obtention de taux de réponse encore jamais atteints auparavant dans les hémopathies malignes dans lesquelles elle était évaluée. En effet, dans les essais cliniques ayant abouti à une autorisation de mise sur le marché de ces cellules CAR-T, on retrouve des taux de réponse complète de l'ordre de 40 à 50% à 6 mois (*Neelapu et al., 2017 ; Schuster et al., 2017 ; Maude et al., 2018 ; Wang et al., 2022*). Ainsi, trois types de cellules CAR-T anti-CD19 sont actuellement disponibles en France : Yescarta®, Kymriah® et Tecartus®, dans le cadre du traitement d'hémopathies malignes en rechute ou réfractaires aux thérapies conventionnelles (lymphome diffus à grandes cellules B, lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B, leucémie aiguë lymphoblastique B, ou encore lymphome à cellules du manteau). De nombreux essais pré-cliniques et cliniques de cellules CAR-T sont en cours dans le cadre des hémopathies malignes, mais également dans le domaine des maladies-auto-immunes avec des CAR ciblant des auto-anticorps, ou encore dans le domaine des tumeurs solides, même si les résultats y sont à ce jour plus décevants (*Sadeqi Nezhad et al., 2020 ; Alnefaie et al., 2022*). Une classe particulière de cellules CAR-T est également en voie de développement : les CAR-Tregs. Il s'agit de Tregs directement transduits avec une construction CAR, ou bien de lymphocytes T CD3⁺ ou CD4⁺ transduits à la fois avec un CAR et avec le cDNA de FoxP3. Ces CAR-Tregs sont classiquement étudiés dans des modèles de pathologies inflammatoires ou auto-immunes dans le but de moduler la réponse immunitaire et de l'orienter vers une tolérance immune. Les cibles antigéniques de ces CAR peuvent ainsi être des alloantigènes du donneur afin de prévenir la GvH dans le cadre de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ou le rejet de greffe

dans le cadre de la transplantation d'organes solides, le plus étudié à ce jour étant l'HLA-A2 (Noyan et al., 2017 ; Bézie et al., 2019 ; Sicard et al., 2020). Il peut également s'agir de CAR spécifique de l'insuline dans le cadre de diabète de type I, ou encore de CAR spécifique du récepteur de l'IL-23, connu pour son rôle dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales. Même si les expérimentations avec ces CAR-Tregs sont encore pour la grosse majorité au stade pré-clinique, les résultats sont déjà très prometteurs (Arjomandnejad et al., 2022).

Malgré ces résultats remarquables dans certaines pathologies, un certain nombre de limitations sont rencontrées actuellement avec les cellules CAR-T, que ce soit en termes d'efficacité ou de toxicité. Nous nous concentrerons sur les problématiques rencontrées dans le domaine de la cancérologie.

Problématiques d'efficacité

Une des premières causes de perte d'efficacité du traitement par cellule CAR-T est celle de la perte d'expression, partielle ou totale, de l'antigène cible par les cellules tumorales. Par exemple, une perte d'expression du CD19 est retrouvée chez 30-70 % des patients en rechute après un traitement par cellules CAR-T pour une leucémie aigüe lymphoblastique B (Stern et Stern, 2021). Cette perte d'expression est liée au développement de mutations ciblant le gène codant pour l'antigène, favorisant ainsi l'expression d'antigènes alternatifs non reconnus par la cellule CAR-T (Majzner et Mackall, 2018).

La capacité de la cellule CAR-T à se rendre jusqu'à la tumeur puis à l'infiltrer impacte également l'efficacité du traitement. Cette difficulté d'accès à la tumeur est plutôt rencontrée dans les tumeurs solides, et est liée d'une part aux barrières physiques de la tumeur comme le stroma, et d'autre part à l'immunosuppression exercée par le micro-environnement tumoral (Alnefaie et al., 2022). Cette immunosuppression est médiée par un certain nombre de cellules

infiltrant la tumeur, telles que les MDSCs (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*), les TAMs (*Tumor-Associated Macrophages*) ou encore les Tregs, qui vont favoriser la survie tumorale par sécrétion de facteurs de croissance, de cytokines et de chimiokines. Des voies de signalisation inhibitrices vont également être stimulées, comme celles du PD-1 ou du CTLA-4, contribuant ainsi à la faible expansion et à la faible persistance des cellules CAR-T (*Sterner et Sterner, 2021*).

Cette surexpression de PD-1/PD-L1 dans le micro-environnement entraîne également un phénomène d'exhaustion de la cellule CAR-T (*Cherkassky et al., 2016*). L'exhaustion apparaît souvent après une stimulation antigénique persistante, et correspond à un état au cours duquel les lymphocytes T perdent leurs fonctions effectrices et leur capacité de prolifération, expriment des récepteurs inhibiteurs, et sont ainsi moins performants pour le contrôle des infections et des tumeurs (*Wherry, 2011*). Cet état d'exhaustion peut être aussi lié à l'activation par son antigène du TCR endogène de la cellule CAR-T, lorsque cet antigène est un autre antigène que celui ciblé par le CAR (*Yang et al., 2017*). D'autres signaux provenant du CAR lui-même peuvent également entraîner une exhaustion précoce de la cellule, comme la phosphorylation du CD3- ζ de manière indépendante de l'antigène, phénomène qui semble majoré lors d'une costimulation CD28 et diminué lors d'une costimulation 4-1BB (*Long et al., 2015 ; Kasakovski et al., 2018*).

Problématiques de toxicité

Une des principales toxicités des cellules CAR-T est celle de l'effet « *on-target/off-tumor* », lié à l'expression de l'antigène cible du CAR-T par les tissus normaux, entraînant ainsi un effet cytotoxique de la cellule CAR-T sur ces tissus. Par exemple, l'expression de HER2, même faible, par l'épithélium bronchique a été responsable d'une toxicité pulmonaire fatale lors d'essais cliniques de CAR-T anti-HER2 dans les cancers bronchiques (*Zhong et al., 2020*). Cette problématique est principalement rencontrée dans le cadre des tumeurs solides, puisque

beaucoup de cibles tumorales sont également exprimées par les tissus sains, rendant l'identification de cibles strictement spécifiques de la tumeur très difficile (Zhang et al., 2021).

Une autre toxicité aiguë particulièrement fréquente est celle du syndrome de relargage cytokinique ou CRS (*Cytokine Release Syndrome*), lié à une sécrétion excessive de cytokines inflammatoires (dont TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10) par la cellule CAR-T ou par les cellules immunitaires stimulées par la cellule CAR-T comme les macrophages. Cette toxicité peut être parfois très sévère, aboutissant à des défaillances multi-organes voire au décès du patient (Sun et al., 2018). La neurotoxicité fait également partie des effets indésirables fréquents (62 à 67% des patients traités pour une leucémie ou un lymphome), et parfois sévères puisque les symptômes peuvent aller de la confusion et des céphalées à l'œdème cérébral voire au coma (Sterner et Sterner, 2021). La physiopathologie de cette complication n'est encore pas clairement élucidée, et on ne sait pas encore si ces effets neurologiques sont liés à un effet direct des cellules CAR-T sur le système nerveux central, ou s'ils sont médiés par les cytokines inflammatoires (Sun et al., 2018).

Parmi les autres toxicités potentielles, nous citerons l'immunosuppression induite par la chimiothérapie lymphodéplétive préalablement administrée, l'immunogénicité liée au fait que la région de reconnaissance de l'antigène est classiquement dérivée d'un anticorps murin pouvant ainsi entraîner une anaphylaxie, et la génotoxicité liée à l'utilisation de vecteurs viraux intégratifs pouvant être responsables de mutagenèse potentiellement oncogénique ou de perte d'expression de gène (Sun et al., 2018).

Stratégies d'optimisation des cellules CAR-T

Lutter contre le micro-environnement immunosuppresseur : La première stratégie d'optimisation de la cellule CAR-T concerne la structure du CAR. En effet, plusieurs générations de CAR se sont succédées, avec l'ajout successif d'une ou de plusieurs molécules

de costimulation. La quatrième génération, aussi appelée TRUCKs (*T cells Redirected for Universal Cytokine-mediated Killing*), a l'avantage de pouvoir relarguer une cytokine (IL-12, IL-15) lors de l'activation du CAR, entraînant la sécrétion d'IFN- γ , de Perforine et de Granzyme par la cellule T, contribuant ainsi à son effet anti-tumoral tout en luttant contre le micro-environnement immunosuppresseur (Koneru et al., 2015 ; Krenciute et al., 2017 ; Chmielewski et Abken, 2020). Afin de favoriser l'accès de la cellule CAR-T à la tumeur, certains CAR sont associés à un récepteur aux chimiokines spécifiquement exprimées par la tumeur (comme CXCR1 ou CXCR2) (Whilding et al., 2019), ou à une molécule pouvant détruire certains éléments du stroma tumoral comme l'héparanase qui dégrade l'HSPG (*Heparin Sulfate ProteoGlycan*), composant clé de la matrice extra-cellulaire (Anelfaie et al., 2022). Des stratégies d'association de cellules CAR-T avec un traitement inhibiteur de point de contrôle immunitaire (anti-PD-1/PD-L1) sont également en plein essor, dans le but de stimuler l'expansion et la persistance des cellules CAR-T (Stern et al., 2021).

Cibler plusieurs antigènes : Se développent également des cellules T avec plusieurs récepteurs antigéniques chimériques (CAR-T bicistroniques, CAR-T en tandem, co-administration ou co-transduction de CAR-T), permettant ainsi de cibler plusieurs antigènes, et donc de lutter contre la perte d'efficacité liée à la perte d'expression de l'antigène par la tumeur. On retrouve ainsi des résultats prometteurs avec des CAR-T bispécifiques anti-CD19/CD22 dans les leucémies aigües lymphoblastiques et les lymphomes B diffus à grandes cellules (Dai et al., 2020), ou avec des CAR-T anti-CD19/BCMA ou anti-CD38/BCMA dans les myélomes multiples (Zhang et al., 2019 ; Mei et al., 2021). Cette stratégie de cibler plusieurs antigènes est également développée dans le domaine des tumeurs solides avec, à titre d'exemple, des CAR-T anti-HER2/IL13R α 2 dans les glioblastomes (Hegde et al., 2016), des CAR-T anti-c-Met/PD-L1 dans les carcinomes hépato-cellulaires (Jiang et al., 2021), ou des CAR-T anti-HER2/MUC1 dans les cancers du sein (Wilkie et al., 2012).

Lutter contre l'effet « on-target / off-tumor » : cette stratégie consiste par exemple à cibler des modifications post-traductionnelles propres aux tumeurs, comme la surexpression de O-glycanes tronqués (GalNAc1-O-Ser/Thr ou NeuAca2–6-GalNAc1-O-Ser/Thr) (*Steentoft et al., 2018*), ou bien d'administrer les cellules CAR-T localement au niveau de la tumeur. En plus de limiter les effets toxiques à distance, ces injections locales permettent de faciliter l'accès des cellules CAR-T à la tumeur. Des résultats intéressants ont ainsi été obtenus suite à l'injection intra-cérébrale de cellules CAR-T anti-IL13R α 2 dans les glioblastomes (*Brown et al., 2016*) ou suite à l'injection intra-pleurale de CAR-T anti-mésothéline dans les mésothéliomes pleuraux malins (*Adusumilli et al., 2021*). On retrouve également des stratégies avec des CAR-T ciblant deux cibles antigéniques tumorales distinctes, avec une activation possible du CAR qu'en cas de reconnaissance des deux antigènes de manière simultanée, limitant ainsi l'activation par reconnaissance d'une seule cible portée par un tissu sain (*Sun et al., 2018*). Il est également possible de moduler l'affinité du CAR pour sa cible antigénique afin qu'il ne s'active qu'en cas de forte densité antigénique, et donc préférentiellement au niveau du tissu tumoral (*Sterner et Sterner, 2021*).

Freiner la toxicité de la cellule CAR-T : Des stratégies visant à intégrer un gène suicide dans la construction du CAR sont également à l'essai, afin de détruire les cellules CAR-T en cas de toxicité sévère. La stratégie la plus aboutie actuellement est celle intégrant la caspase 9 inductible (iCasp9) par la molécule synthétique AP1903, permettant d'induire rapidement une apoptose des cellules CAR-T exprimant ce système (*Jones et al., 2014*). L'inconvénient de ce système est qu'il entraîne une destruction complète des cellules CAR-T. Il existe ainsi des stratégies de switch « on-off » de la cellule CAR-T permettant une régulation fine de la localisation, de la durée et de l'intensité de l'activité de la cellule. Ce switch peut être obtenu par séparation dans la construction des domaines extra-cellulaires et intra-cellulaires, qui se rassembleront suite à l'administration d'une molécule dimérisante (*Wu et al., 2015 ; Juillerat*

et al., 2016). Des résultats prometteurs ont également été obtenus suite à l'administration de dasatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase qui inhibe la phosphorylation du CD3 ζ au niveau du TCR, et donc l'activation du CAR. Cette molécule a l'avantage de bloquer transitoirement les fonctions des cellules CAR-T sans les détruire, avec un effet totalement réversible à l'arrêt du traitement (*Mestermann et al., 2019*).

Utiliser des cellules CAR-T allogéniques : notons que l'ensemble de ces problématiques en termes d'efficacité et de toxicité pourraient être limitées par l'utilisation de cellules CAR-T allogéniques. Ces cellules allogéniques peuvent provenir d'un donneur sain ou bien de sang de cordon, et n'ont donc pas été exposées antérieurement à des traitements immunosuppresseurs pouvant impacter le fonctionnement des lymphocytes T utilisés pour la transduction du CAR. De plus, l'utilisation de cellules allogéniques permettrait de faciliter la production de ces cellules CAR-T dites « universelles », notamment en termes de rapidité de production et de mise à disposition pour le patient, mais aussi en termes de coût (*June et al., 2018*). Cette stratégie offre également la possibilité de produire une quantité importante de cellules CAR-T, avec plusieurs cibles possibles, à partir du sang d'un seul donneur. Cependant, deux problématiques majeures limitent encore leur utilisation. La première est celle du développement d'une réaction du greffon contre l'hôte parfois sévère. La seconde est celle d'une élimination rapide des cellules CAR-T allogéniques par le système immunitaire du receveur, limitant ainsi leur effet anti-tumoral. De nombreuses phases pré-cliniques ou phases cliniques précoces sont actuellement en cours dans l'objectif de démontrer et d'améliorer la faisabilité, la sécurité et l'efficacité de ces cellules CAR-T allogéniques, principalement dans le cadre des hémopathies malignes, mais également dans celui des tumeurs solides (*Depil et al., 2020*).

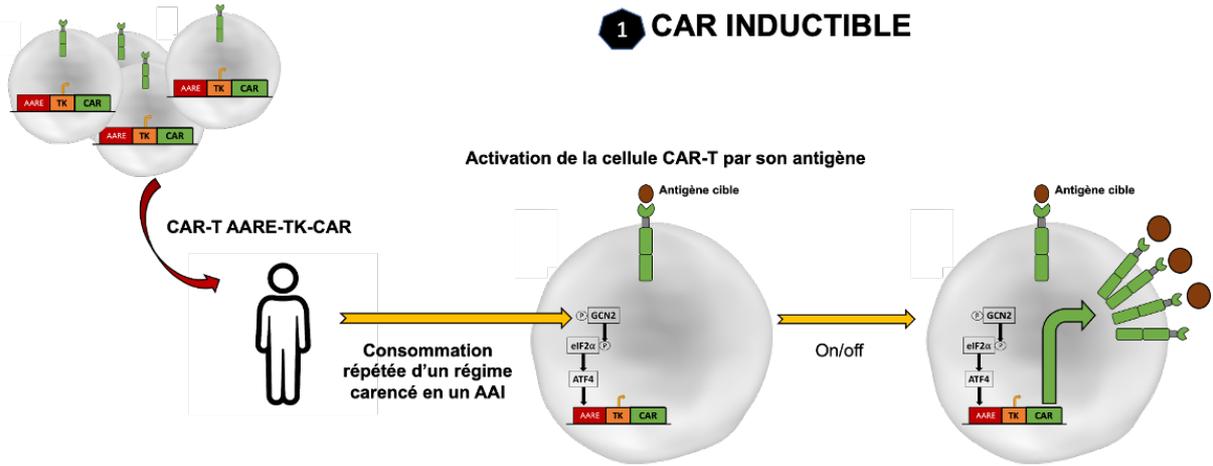
2) Quelle place pour NUTRIREG dans le domaine des cellules CAR-T ?

NUTRIREG pour stimuler l'efficacité de la cellule CAR-T

Une des causes majeures de perte d'efficacité de la cellule CAR-T est celle du développement d'un état d'exhaustion de la cellule. Cette exhaustion peut être secondaire à de nombreux phénomènes, notamment celui d'une stimulation antigénique excessive. Une des stratégies pour limiter cette exposition permanente de la cellule CAR-T à l'antigène consiste à induire une expression transitoire du CAR. Il existe à ce jour dans la littérature plusieurs descriptions de système permettant de contrôler l'expression du CAR au niveau transcriptionnel (*Gumber et Wang, 2022*). On retrouve par exemple une induction de l'expression du CAR par un système Tet-On qui répond à la prise de Doxycycline (*Drent et al., 2018 ; Gu et al., 2018 ; Zhang et al., 2019*), ou la construction d'un vecteur inductible dans lequel le CAR est placé sous la dépendance d'un promoteur synthétique constitué d'éléments de réponse à l'IFN- γ , au TNF- α et à l'hypoxie présents dans le micro-environnement tumoral (*Greenshpan et al., 2021*). Il existe également des systèmes de « *self-driving* » dans lesquels la reconnaissance de l'antigène par le CAR entraîne une induction d'une surexpression d'une construction CAR supplémentaire placée sous le contrôle transcriptionnel d'AP1/NF- κ B ou de STAT5, permettant ainsi une meilleure activation, une meilleure expansion, et une moindre exhaustion de la cellule CAR-T (*Webster et al., 2021*).

Dans ce contexte, la technologie NUTRIREG pourrait être utilisée en plaçant une construction CAR supplémentaire sous la dépendance des éléments de réponse aux acides aminés (AARE), avec une induction d'une surexpression suite à la reconnaissance de l'antigène par le CAR de surface, à condition qu'elle soit associée à la consommation d'un régime carencé en un acide aminé indispensable. Cette stratégie pourrait ainsi permettre une activation transitoire sur demande de la cellule CAR-T en réponse à l'antigène, afin de la préserver du phénomène

1 CAR INDUCTIBLE



2 EXPRESSION TRANSITOIRE D'UN GENE D'INTERET

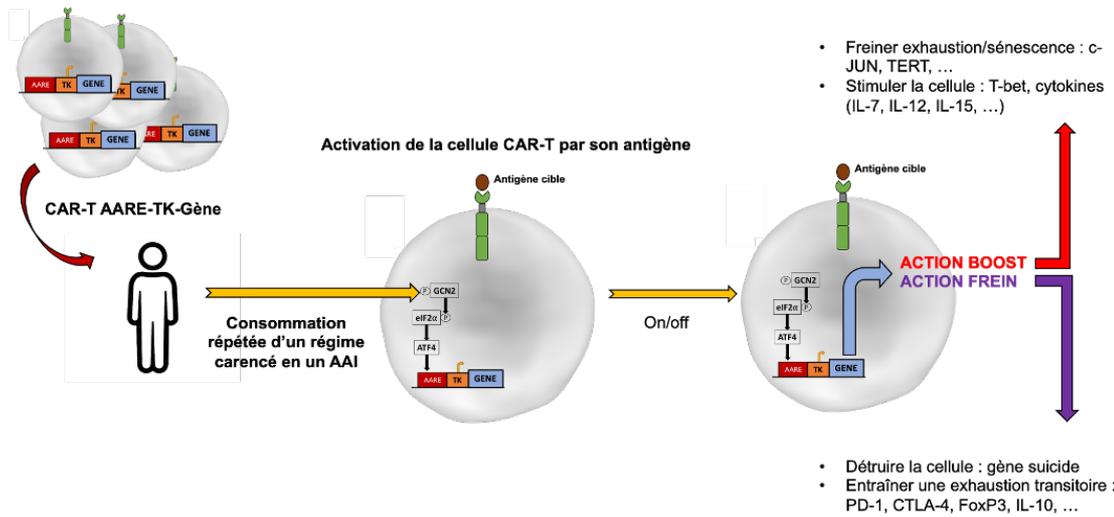


Figure 55. Stratégie potentielle d'utilisation de NUTRIREG pour stimuler ou freiner l'activité d'une cellule CAR-T.

d'exhaustion, et ce sans inducteur pharmacologique. Notons que la présence du CAR de surface comme décrite dans le système « *self-driving* » semble indispensable dans le cas de NUTRIREG puisque la technologie nécessite que la cellule T soit activée par son antigène (**Figure 55**).

Une autre stratégie dans laquelle NUTRIREG pourrait avoir sa place est celle du contrôle de l'expression d'un gène pouvant entraîner un état de résistance à l'exhaustion ou une meilleure efficacité et/ou une meilleure persistance de la cellule CAR-T (**Figure 55**) (*Poorebrahim et al., 2021*). Parmi les transgènes potentiellement intéressants dans ce contexte, on retrouve tout d'abord des travaux prometteurs avec la surexpression de **c-JUN**. Il a été démontré que l'association de l'expression de c-JUN avec celle du CAR entraîne un état de résistance à l'exhaustion de la cellule CAR-T, par activation directe par c-JUN du complexe AP1 (c-JUN/c-FOS) et l'inhibition indirecte du complexe AP1i associé à l'exhaustion (*Lynn et al., 2019*). **TERT** (*Telomerase Reverse Transcriptase*) pourrait également être un transgène intéressant puisqu'il a été démontré que son expression transitoire dans les cellules CAR-T entraîne une augmentation de l'activité télomérase et ainsi un retard de sénescence de la cellule. De plus, cet effet sur la sénescence est associée à une meilleure persistance, une meilleure prolifération et un effet anti-tumoral prolongé des cellules CAR-T anti-CD19 dans des modèles murins d'hémopathies malignes B (*Bai et al., 2015*). **CAT** (*catalase*), un autre transgène potentiel, a démontré sa capacité à réduire l'état de stress oxydatif de la cellule CAR-T en réponse aux fortes quantités de ROS (*Reactive Oxygen Species*) présentes dans le micro-environnement tumoral lors d'une co-expression de CAT et du CAR (*Ligtenberg et al., 2016*). La surexpression du gène **T-bet** (TBX21) dans la cellule CAR-T peut également permettre d'améliorer l'efficacité anti-tumorale de la cellule CAR-T en induisant un phénotype T_{H1} pro-inflammatoire (*Gacerez et Sentman, 2018*). Enfin, la co-expression du CAR avec une **cytokine** stimulante pourrait également être intéressante dans le but de stimuler une cellule CAR-T

hypofonctionnelle et de la reconvertir en cellule effectrice, mais aussi dans le but d'avoir une action inhibitrice sur les cellules immunosuppressives du micro-environnement tumoral, et donc d'obtenir un regain d'immunité. Parmi les cytokines ayant démontré une efficacité dans ce contexte, on retrouve des données dans la littérature concernant des expressions constitutives ou inductibles d'IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, et IL-23 (*Pietrobon et al., 2021*).

Dans ce contexte, une induction répétée de l'expression du transgène sous le contrôle de NUTRIREG pourrait permettre à la fois d'obtenir l'effet bénéfique du transgène transitoirement exprimé (résistance à l'épuisement, amélioration de la persistance) tout en limitant les effets toxiques potentiels de ce transgène grâce à la réversibilité rapide du système (effet oncogénique de c-JUN, excès d'inflammation liée à la surexpression permanente d'une cytokine, ...).

NUTRIREG pour freiner la cellule CAR-T en cas de toxicité

La stratégie décrite ci-dessus d'expression transitoire du CAR sous la dépendance de NUTRIREG pourrait également permettre de limiter la toxicité liée à une action permanente de la cellule CAR-T (**Figure 55**).

L'expression inductible d'un gène suicide sous la dépendance de NUTRIREG pourrait être une stratégie potentielle, mais il n'est pas certain que notre technologie ait un avantage dans ce contexte par rapport aux inducteurs pharmacologiques. Tout d'abord, les systèmes suicides sont classiquement utilisés en cas de toxicité aiguë sévère, et nécessitent donc une induction extrêmement rapide. Ensuite, tout comme les inducteurs pharmacologiques, une induction de l'expression du gène suicide par NUTRIREG entraînera une destruction complète des cellules CAR-T. Le seul avantage pourrait être que l'induction de NUTRIREG se produise exclusivement dans les cellules CAR-T fortement activées (puisque la voie GCN2-ATF4 n'est

inductible qu'en cas d'activation nette de la cellule), préservant ainsi les cellules CAR-T faiblement ou non activées, qui pourront ainsi maintenir un effet anti-tumoral ultérieur.

Dans l'objectif de freiner transitoirement la cellule CAR-T sans la détruire, nous pourrions cette fois-ci imaginer d'induire une expression, sous la dépendance de NUTRIREG, d'un gène connu pour être impliqué dans le développement d'un état d'exhaustion de la cellule T. Cet état étant réversible, nous pourrions ainsi simplement « mettre au repos » les cellules CAR-T de manière répétée en cas d'apparition d'une toxicité, notamment en cas d'effet « *on target/off tumor* », ou même en prévention d'une toxicité. Parmi les transgènes candidats, nous citerons ceux codant pour des récepteurs inhibiteurs des cellules T tels que PD-1, CTLA-4, TIM3 ou LAG3, ou bien ceux codant des protéines connues pour leur effet immunosuppresseur telles que les facteurs de transcription FoxP3, TOX ou Eomes, ou les cytokines à effet anti-inflammatoire IL-35, IL-10 ou TGF- β , ou encore l'IDO (**Figure 55**) (Poorebrahim et al., 2021 ; Gumber et Wang, 2022).

Enfin, NUTRIREG pourrait avoir sa place dans la gestion de la GvH liée aux cellules CAR-T allogéniques, par l'utilisation d'un transgène codant pour FoxP3 ou pour l'IL-10, tel que décrit dans la partie I sur NUTRIREG et allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

3) Stratégie expérimentale pour démontrer à court terme la fonctionnalité de NUTRIREG dans les cellules CAR-T

Avant de pouvoir développer ces différentes stratégies potentielles d'amélioration de l'efficacité ou de la toxicité des cellules CAR-T, il nous faut tout d'abord démontrer que l'induction de NUTRIREG est possible dans ce type de cellule. L'auto-activation de la cellule CAR-T suite à la reconnaissance de son antigène devrait être un avantage fort pour la fonctionnalité de NUTRIREG.

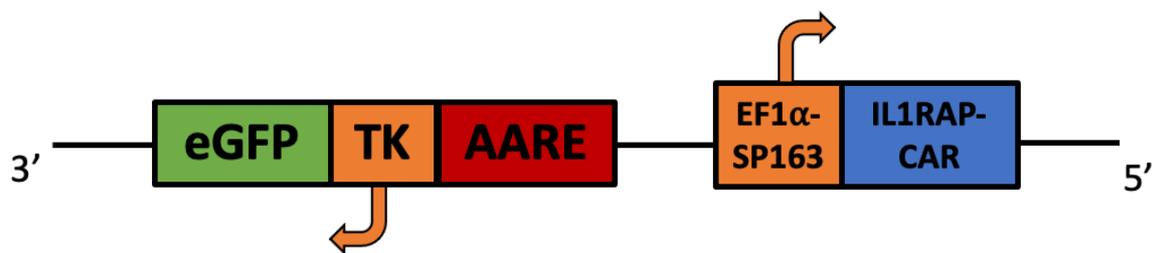


Figure 56. Représentation schématique de la construction génétique commune IL1RAP-CAR-AARE-TK-eGFP.

Dans cet objectif, nous avons mis en place une collaboration avec l'équipe INSERM UMR 1098 de Besançon (Christophe Ferrand & Marina Deschamps), la première équipe académique française à avoir développé et breveté un modèle de cellules CAR-T humaines qui ciblent la protéine IL1RAP pour lutter contre la leucémie myéloïde chronique. Après avoir généré un anticorps monoclonal anti-IL1RAP capable de reconnaître spécifiquement les cellules souches leucémiques IL1RAP+, l'équipe INSERM de Besançon a réalisé une construction CAR qui comporte les séquences codant les régions hypervariables de cette immunoglobuline constituant le scFv, couplées à celles codant les séquences d'activation T de troisième génération (CD28-4.1BB-CD3z). Cette construction (pSDY-5'LTR-iCASP9-T2A-CAR-P2A-ΔCD19-3'LTR) comporte également un système suicide inductible constitué d'un gène inductible par le Rimiducid® codant la caspase-9 (gène iCASP9), qui permet d'éliminer les cellules CAR T activées indésirables (*safety switch*), ainsi qu'un gène codant une protéine de surface (ΔCD19) permettant l'identification et la sélection de ces cellules CAR-T. Cette construction a été clonée dans un vecteur lentiviral qui permet ensuite de transduire les LT *ex vivo*. *In vitro*, en présence de cellules leucémiques cibles exprimant IL1RAP à leur surface, les cellules CAR-T anti-IL1RAP sont capables de proliférer et de sécréter de l'IFN-γ et d'autres cytokines pro-inflammatoires de type T_H1, et finalement d'avoir un effet cytotoxique sur ces cellules tumorales, y compris sur des cellules tumorales de patients atteints de leucémie myéloïde chronique. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans des modèles murins de xélogreffe tumorale (Warda et al., 2019).

La première étape pour démontrer la fonctionnalité de NUTRIREG dans les cellules CAR-T anti-IL1RAP consistera donc à utiliser un transgène AARE-TK/βG-eGFP (NUTRIREG) inséré dans un vecteur lentiviral IL1RAP-CAR dans le sens inverse de l'unité CAR pour empêcher toute interférence (**Figure 56**). Les cellules T transduites avec ce vecteur lentiviral IL1RAP-CAR-AARE- TK/βG-eGFP seront alors mises en culture avec des cellules tumorales exprimant

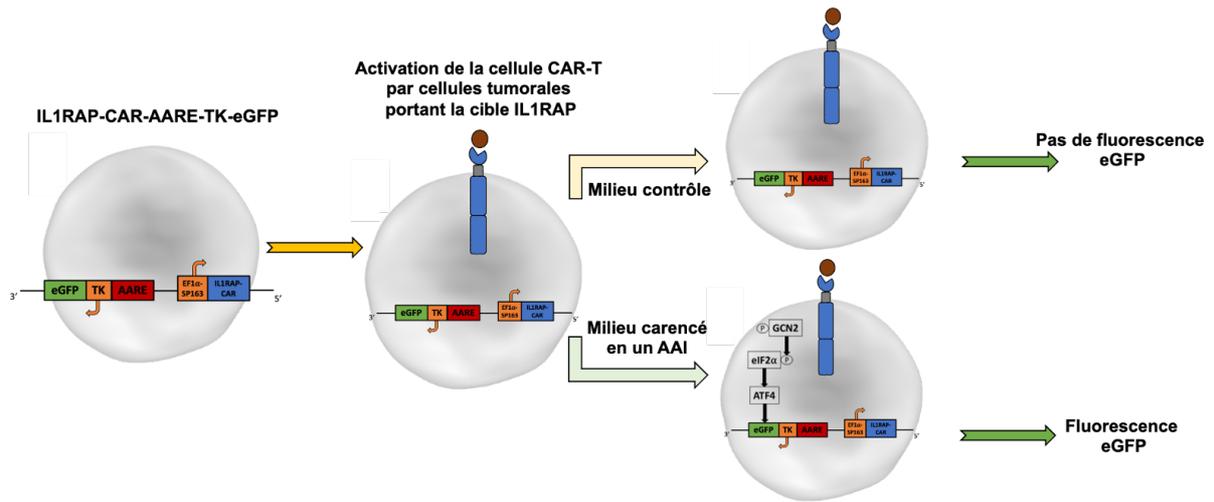


Figure 57. Stratégie expérimentale pour valider *in vitro* la fonctionnalité de la construction génétique commune IL1RAP-CAR-AARE-TK-eGFP.

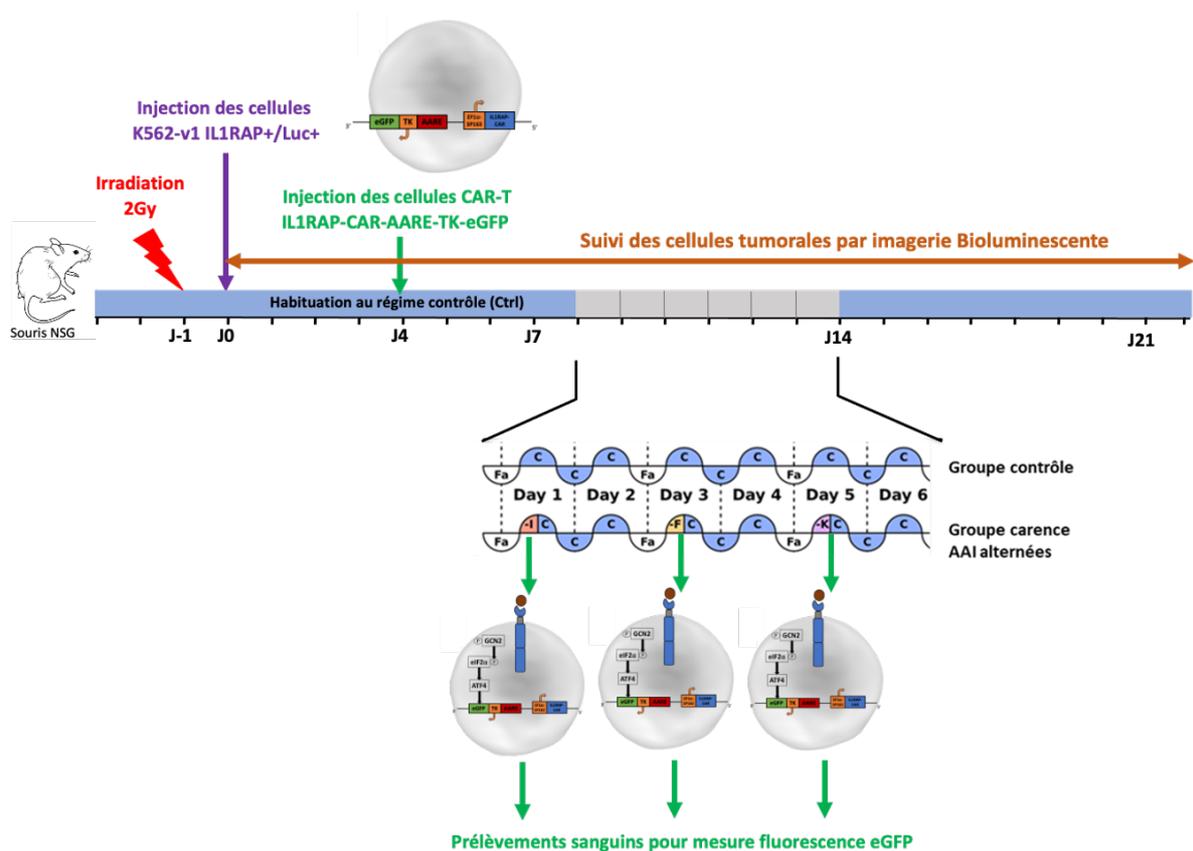


Figure 58. Stratégie expérimentale pour valider *in vivo* la fonctionnalité de la construction génétique commune IL1RAP-CAR-AARE-TK-eGFP.

IL1RAP avant d'être cultivées en milieu carencé en un AAI (*versus* milieu contrôle) afin de s'assurer que l'auto-activation de la cellule CAR-T suite à la reconnaissance de son antigène est suffisante pour activer la voie GCN2-ATF4 et induire l'expression du transgène eGFP (**Figure 57**).

Dans un second temps, ces cellules T IL1RAP-CAR-AARE-TK/ β G-eGFP seront amplifiées en milieu complet puis réinjectées dans la circulation sanguine de souris immunodéficientes NXG greffées auparavant avec des cellules tumorales IL1RAP+ (K562 IL1RAP+ Luciférase+). Ceci devrait permettre une auto-activation rapide de la cellule CAR-T. Ces souris seront alors nourries après un jeûne de courte durée (12h) avec un régime synthétique carencé en un AAI (*versus* régime contrôle) pendant 8-16h permettant ainsi l'induction de l'expression du transgène. Les souris seront ensuite renourries avec le régime contrôle pour récupération pendant 36h et il sera ensuite possible de faire plusieurs cycles d'induction en alternant la carence en différents AAI (isoleucine, phénylalanine, lysine) de façon à éviter des manques nutritionnels. Des prélèvements de sang seront effectués après chaque cycle d'induction et période de récupération pour pouvoir évaluer l'expression de la eGFP en cytométrie de flux (**Figure 58**).

Par la suite, nous pourrions démontrer la fonctionnalité de NUTRIREG avec un transgène thérapeutique avec un intérêt potentiel fort pour la cellule CAR-T, tel que c-JUN en prévention de l'exhaustion de la cellule CAR-T. Pour tester l'efficacité de NUTRIREG/c-JUN sur l'exhaustion des cellules CAR-T, l'ADNc de c-JUN sera inséré en aval des séquences promotrices AARE-TK/ β G dans le vecteur lentiviral IL1RAP-CAR. Comme décrit précédemment, la régulation de l'expression de c-Jun dépendante de NUTRIREG sera mesurée dans les cellules T transduites et cultivées en milieu carencé en un AAI par cytométrie de flux/RT-qPCR. Les cellules T IL1RAP-CAR-AARE-TK/ β G-c-JUN seront ensuite amplifiées

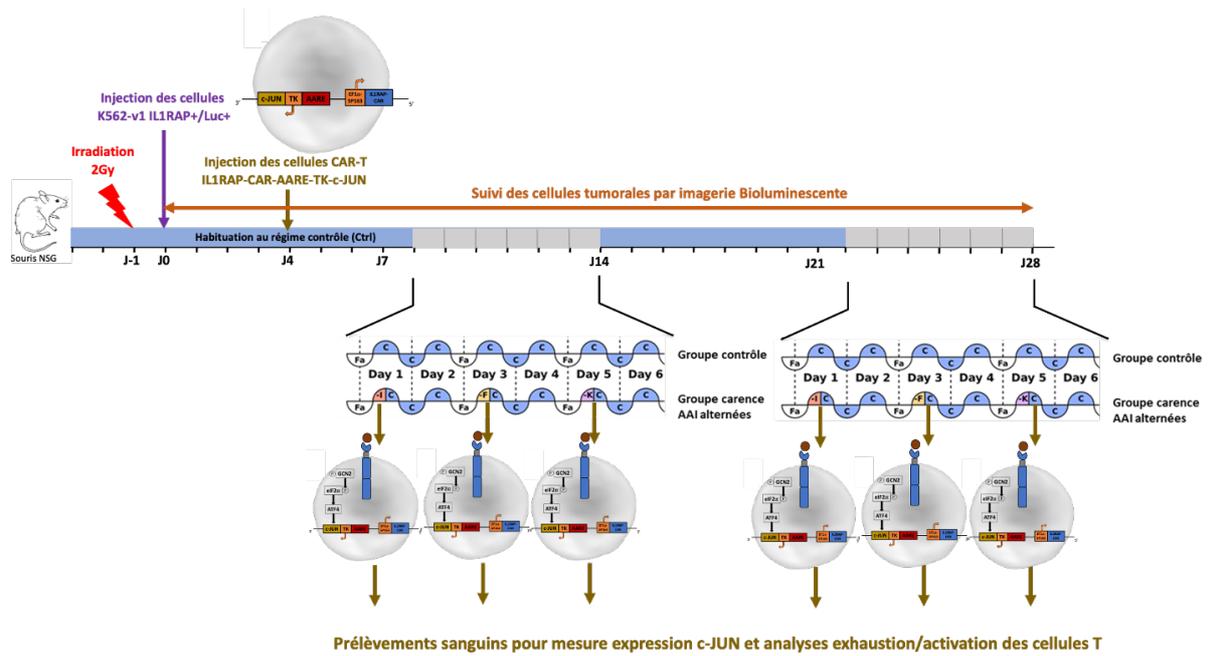


Figure 59. Stratégie expérimentale pour valider *in vivo* la fonctionnalité de la construction génétique commune IL1RAP-CAR-AARE-TK-c-JUN.

pour être réinjectées dans la circulation sanguine de souris NXG irradiées et greffées auparavant avec des cellules tumorales IL1RAP+/Luc+. La mesure de la bioluminescence permettra de suivre l'évolution des cellules tumorales. Le protocole nutritionnel précédemment décrit, incluant des phases de carence en AAI, sera appliqué pour induire transitoirement l'expression de c-Jun. Des prélèvements sanguins seront ensuite effectués pour suivre les cellules CAR-T et le phénomène d'exhaustion par mesure de l'expression de certains marqueurs comme CTLA-4, PD-1, LAG3, TIM3, ainsi que des dosages de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2 ou l'IFN- γ . L'objectif sera alors de démontrer que les souris ayant reçu les cellules T IL1RAP-CAR-AARE-TK/ β G-c-JUN, avec une induction répétée de l'expression de c-JUN, ont une meilleure survie et une moindre rechute tumorale que les souris recevant les cellules T IL1RAP-CAR, du fait d'une résistance à l'exhaustion de la cellule CAR (**Figure 59**). D'autres expériences pourront être réalisées avec d'autres gènes thérapeutiques, afin de booster l'action de la cellule CAR-T, ou bien avec des gènes visant à freiner la cellule en prévention ou en traitement d'une toxicité.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a tout d'abord permis de décrire les conditions d'activation de la voie GCN2-eIF2 α -ATF4 dans les lymphocytes T humains en cas d'exposition à une carence en un acide aminé indispensable. Nous avons pu démontrer qu'une carence, courte ou longue, en chacun des neuf AAI peut être utilisée pour induire la voie de signalisation, avec des variations du niveau d'induction selon l'AAI manquant. La condition indispensable pour l'induction de la voie GCN2-ATF4 est celle d'une activation préalable du lymphocyte T. L'impact d'une carence courte en leucine sur la fonctionnalité du lymphocyte T a été évalué au niveau transcriptomique et mérite d'être approfondie.

Ces résultats nous ont permis de définir les conditions de culture optimales afin de démontrer la fonctionnalité de la technologie NUTRIREG, utilisant la voie de signalisation GCN2-ATF4, dans les lymphocytes T humains. Nous avons tout d'abord pu démontrer qu'il est possible de faire exprimer transitoirement un gène rapporteur (luciférase, eGFP) dans les lymphocytes T activés, suite à une exposition à un milieu carencé en un AAI *in vitro*. De la même manière, nous sommes parvenus à faire exprimer, *in vitro* puis *in vivo*, un gène à orientation thérapeutique, l'IL-10, dans l'objectif d'orienter transitoirement une réponse inflammatoire vers une réponse tolérogène de type Tr1 dans des modèles de pathologies inflammatoires comme la réaction du greffon contre l'hôte survenant après une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

Ces premières preuves de concept nous ouvrent les portes vers l'utilisation de cette technologie innovante dans le domaine de l'immunothérapie cellulaire. De nombreuses pistes sérieuses peuvent être étudiées à court terme, en particulier celle de la prévention de la GvH, dans laquelle NUTRIREG peut offrir une alternative aux thérapeutiques conventionnelles dont on connaît la toxicité et le manque d'efficacité. La technologie NUTRIREG peut également être un atout

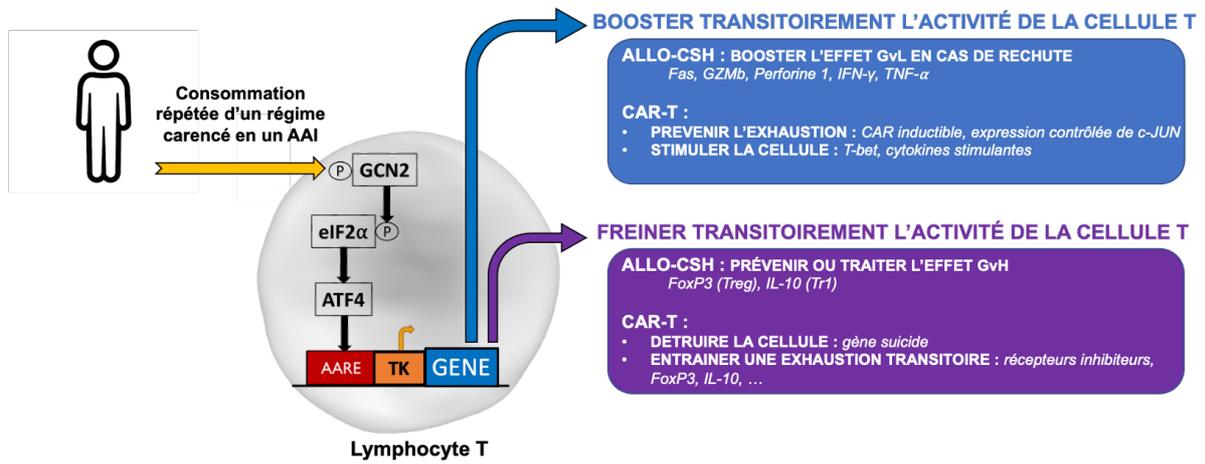


Figure 60. Schéma de synthèse de l'apport potentiel de NUTRIREG dans le domaine de l'immunothérapie cellulaire.

majeur dans le domaine des cellules CAR-T, et plus particulièrement dans un objectif d'amélioration de l'efficacité, tout en limitant les phénomènes de toxicité grâce à l'induction possible de l'expression d'un gène sur un mode « *on/off* » (**Figure 60**). De plus, l'apport bénéfique de NUTRIREG en immunothérapie cellulaire peut dépasser le domaine de la cancérologie, avec des stratégies potentielles d'utilisation dans le domaine de la transplantation d'organes solides ou dans celui des maladies auto-immunes et inflammatoires, offrant ainsi de multiples perspectives d'amélioration de la survie et de la qualité de vie des patients.



BIBLIOGRAPHIE

Adusumilli PS, Zauderer MG, Rivière I, Solomon SB, Rusch VW, O’Cearbhaill RE, et al. A Phase I Trial of Regional Mesothelin-Targeted CAR T-cell Therapy in Patients with Malignant Pleural Disease, in Combination with the Anti-PD-1 Agent Pembrolizumab. *Cancer Discov.* nov 2021;11(11):2748-63.

Ali N, Flutter B, Sanchez Rodriguez R, Sharif-Paghaleh E, Barber LD, Lombardi G, et al. Xenogeneic Graft-versus-Host-Disease in NOD-scid IL-2R γ null Mice Display a T-Effector Memory Phenotype. *Stoddart CA, éditeur. PLoS ONE.* 28 août 2012;7(8):e44219.

Allan SE, Alstad AN, Merindol N, Crellin NK, Amendola M, Bacchetta R, et al. Generation of Potent and Stable Human CD4⁺ T Regulatory Cells by Activation-independent Expression of FOXP3. *Mol Ther.* 1 janv 2008;16(1):194-202.

Alnefaie A, Albogami S, Asiri Y, Ahmad T, Alotaibi SS, Al-Sanea MM, et al. Chimeric Antigen Receptor T-Cells: An Overview of Concepts, Applications, Limitations, and Proposed Solutions. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:797440.

Altman BJ, Wofford JA, Zhao Y, Coloff JL, Ferguson EC, Wieman HL, et al. Autophagy Provides Nutrients but Can Lead to Chop-dependent Induction of Bim to Sensitize Growth Factor-deprived Cells to Apoptosis. *Mol Biol Cell.* 15 févr 2009;20(4):1180-91.

Anda S, Zach R, Grallert B. Activation of Gcn2 in response to different stresses. *PloS One.* 2017;12(8):e0182143.

Andolfi G, Fousteri G, Rossetti M, Magnani CF, Jofra T, Locafaro G, et al. Enforced IL-10 Expression Confers Type 1 Regulatory T Cell (Tr1) Phenotype and Function to Human CD4⁺ T Cells. *Mol Ther.* 4 sept 2012;20(9):1778-90.

Arjomandnejad M, Kopec AL, Keeler AM. CAR-T Regulatory (CAR-Treg) Cells: Engineering and Applications. *Biomedicines.* 26 janv 2022;10(2):287.

Averous J, Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Thiel G, Fafournoux P. Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J Biol Chem.* 13 févr 2004;279(7):5288-97.

Averous J, Jousse C, Maurin AC, Bruhat A, Fafournoux P. Adaptation to Amino Acid Availability: Role of GCN2 in the Regulation of Physiological Functions and in Pathological Disorders. *Boston: Academic Press; 2016. p. 289-303.*

B’chir W, Chaveroux C, Carraro V, Averous J, Maurin AC, Jousse C, et al. Dual role for CHOP in the crosstalk between autophagy and apoptosis to determine cell fate in response to amino acid deprivation. *Cell Signal.* 1 juill 2014;26(7):1385-91.

B’chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, et al. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* sept 2013;41(16):7683-99.

Bacchetta R, Lucarelli B, Sartirana C, Gregori S, Lupo Stanghellini MT, Miqueu P, et al. Immunological Outcome in Haploidentical-HSC Transplanted Patients Treated with IL-10-Anergized Donor T Cells. *Front Immunol.* 31 janv 2014;5:16.

Baertl JM, Placko RP, Graham GG. Serum proteins and plasma free amino acids in severe malnutrition. *Am J Clin Nutr.* 1 juill 1974;27(7):733-42.

Bai Y, Kan S, Zhou S, Wang Y, Xu J, Cooke JP, et al. Enhancement of the in vivo persistence and antitumor efficacy of CD19 chimeric antigen receptor T cells through the delivery of modified TERT mRNA. *Cell Discov.* 8 déc 2015;1:15040.

Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, Siu F, Schuster SM, Nick HS, et al. Activation of the Human Asparagine Synthetase Gene by the Amino Acid Response and the Endoplasmic Reticulum Stress Response Pathways Occurs by Common Genomic Elements. *J Biol Chem.* sept 2000;275(35):26976-85.

Bensinger SJ, Bradley MN, Joseph SB, Zelcer N, Janssen EM, Hausner MA, et al. LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell.* 11 juill 2008;134(1):97-111.

Bézie S, Charreau B, Vimond N, Lasselin J, Gérard N, Nerrière-Daguin V, et al. Human CD8+ Tregs expressing a MHC-specific CAR display enhanced suppression of human skin rejection and GVHD in NSG mice. *Blood Adv.* 26 nov 2019;3(22):3522-38.

Bindels LB, Neyrinck AM, Loumaye A, Catry E, Walgrave H, Cherbuy C, et al. Increased gut permeability in cancer cachexia: mechanisms and clinical relevance. *Oncotarget.* 6 avr 2018;9(26):18224-38.

Biolo G, Toigo G, Ciochi B, Situlin R, Iscra F, Gullo A, et al. Metabolic response to injury and sepsis: changes in protein metabolism. *Nutrition.* 1 sept 1997;13(9, Supplement 1):52-7.

Brenk M, Scheler M, Koch S, Neumann J, Takikawa O, Häcker G, et al. Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 juill 2009;183(1):145-54.

Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med.* 29 déc 2016;375(26):2561-9.

Bruhat A, Fafournoux P. The CCAAT/enhancer-binding protein-ATF response elements-luciferase mouse model, an innovative tool to monitor the integrated stress response pathway in vivo. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* mai 2017;20(3):175-80.

Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Reimold AM, Ferrara M, Fafournoux P. Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol Cell Biol.* oct 2000;20(19):7192-204.

Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood.* 20 janv 2011;117(3):1061-70.

Bunpo P, Cundiff JK, Reinert RB, Wek RC, Aldrich CJ, Anthony TG. The eIF2 kinase GCN2 is essential for the murine immune system to adapt to amino acid deprivation by asparaginase. *J Nutr.* nov 2010;140(11):2020-7.

Cannarile L, Delfino DV, Adorisio S, Riccardi C, Ayroldi E. Implicating the Role of GILZ in Glucocorticoid Modulation of T-Cell Activation. *Front Immunol.* 2019;10:1823.

Carlson TJ, Pellerin A, Djuretic IM, Trivigno C, Korolov SB, Rao A, et al. Halofuginone-Induced Amino Acid Starvation Regulates Stat3-Dependent Th17 Effector Function and Reduces Established Autoimmune Inflammation. *J Immunol.* 1 mars 2014;192(5):2167-76.

Carraro V, Maurin AC, Lambert-Langlais S, Averous J, Chaveroux C, Parry L, et al. Amino acid availability controls TRB3 transcription in liver through the GCN2/eIF2 α /ATF4 pathway. *PLoS One.* 21 déc 2010;5(12):e15716.

Carroll B, Korolchuk VI, Sarkar S. Amino acids and autophagy: cross-talk and co-operation to control cellular homeostasis. *Amino Acids.* oct 2015;47(10):2065-88.

Cham CM, Gajewski TF. Glucose Availability Regulates IFN- γ Production and p70S6 Kinase Activation in CD8⁺ Effector T Cells. *J Immunol.* 15 avr 2005;174(8):4670-7.

Chand S, Mahajan RV, Prasad JP, Sahoo DK, Mihooliya KN, Dhar MS, et al. A comprehensive review on microbial l-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. *Biotechnol Appl Biochem.* 2020;67(4):619-47.

Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ. Strategies for Enhancing and Preserving Anti-leukemia Effects Without Aggravating Graft-Versus-Host Disease. *Front Immunol.* 21 déc 2018;9:3041.

Chaveroux C, Bruhat A, Carraro V, Jousse C, Averous J, Maurin AC, et al. Regulating the expression of therapeutic transgenes by controlled intake of dietary essential amino acids. *Nat Biotechnol.* juill 2016;34(7):746-51.

Chaveroux C, Carraro V, Canaple L, Averous J, Maurin AC, Jousse C, et al. In vivo imaging of the spatiotemporal activity of the eIF2 α -ATF4 signaling pathway: Insights into stress and related disorders. *Sci Signal.* 28 avr 2015;8(374):rs5.

Chaveroux C, Lambert-Langlais S, Cherasse Y, Averous J, Parry L, Carraro V, et al. Molecular mechanisms involved in the adaptation to amino acid limitation in mammals. *Biochimie.* juill 2010;92(7):736-45.

Chen MS, Wang SF, Hsu CY, Yin PH, Yeh TS, Lee HC, et al. CHAC1 degradation of glutathione enhances cystine-starvation-induced necroptosis and ferroptosis in human triple negative breast cancer cells via the GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway. *Oncotarget.* 29 déc 2017;8(70):114588-602.

Chen PP, Cepika AM, Agarwal-Hashmi R, Saini G, Uyeda MJ, Louis DM, et al. Alloantigen-specific type 1 regulatory T cells suppress through CTLA-4 and PD-1 pathways and persist long-term in patients. *Sci Transl Med.* 27 oct 2021;13(617):eabf5264.

Chen X, Vodanovic-Jankovic S, Johnson B, Keller M, Komorowski R, Drobyski WR. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 15 nov 2007;110(10):3804-13.

Cheng H, Tian J, Zeng L, Pan B, Li Z, Song G, et al. Halofugine prevents cutaneous graft versus host disease by suppression of Th17 differentiation. *Hematol Amst Neth*. sept 2012;17(5):261-7.

Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, Feng Y, Dimitrov DS, Jones DR, et al. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *J Clin Invest*. 1 août 2016;126(8):3130-44.

Chmielewski M, Abken H. TRUCKS, the fourth-generation CAR T cells: Current developments and clinical translation. *Adv CELL GENE Ther [Internet]*. juill 2020 [cité 10 oct 2022];3(3). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/acg2.84>

Chu TLH, Guan Q, Nguan CYC, Du C. Halofuginone suppresses T cell proliferation by blocking proline uptake and inducing cell apoptosis. *Int Immunopharmacol*. août 2013;16(4):414-23.

Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*. juin 2017;47(6):946-53.

Cibrián Vera D, Saiz ML, de la Fuente H, Sánchez-Díaz R, Moreno-Gonzalo O, Jorge Cerrudo I, et al. CD69 controls L-Trp uptake through LAT1-CD98 and AhR-dependent IL-22 secretion in psoriasis. *Nat Immunol*. août 2016;17(8):985-96.

Cobbold SP, Adams E, Farquhar CA, Nolan KF, Howie D, Lui KO, et al. Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 juill 2009;106(29):12055-60.

Dai H, Wu Z, Jia H, Tong C, Guo Y, Ti D, et al. Bispecific CAR-T cells targeting both CD19 and CD22 for therapy of adults with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol*. 3 avr 2020;13(1):30.

De Vos J, Baudoux E, Bay JO, Calmels B, Cras A, El Cheikh J, et al. Injections de lymphocytes du donneur (DLI) : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer (Paris)*. 1 janv 2019;106(1, Supplement):S35-9.

Delgoffe GM, Xu C, Mackall CL, Green MR, Gottschalk S, Speiser DE, et al. The role of exhaustion in CAR T cell therapy. *Cancer Cell*. juill 2021;39(7):885-8.

Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. mars 2020;19(3):185-99.

Drent E, Poels R, Mulders MJ, van de Donk NWCJ, Themeli M, Lokhorst HM, et al. Feasibility of controlling CD38-CAR T cell activity with a Tet-on inducible CAR design. *PLoS ONE*. 30 mai 2018;13(5):e0197349.

Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. sept 2003;9(9):1144-50.

Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Indoleamine 2,3-dioxygenase depletes tryptophan, activates general control non-derepressible 2 kinase and down-regulates key enzymes involved in fatty acid synthesis in primary human CD4⁺ T cells. *Immunology*. oct 2015;146(2):292-300.

Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Spanoulis A, Liakopoulos V, Stefanidis I. Indoleamine 2,3-dioxygenase increases p53 levels in alloreactive human T cells, and both indoleamine 2,3-dioxygenase and p53 suppress glucose uptake, glycolysis and proliferation. *Int Immunol*. déc 2014;26(12):673-84.

Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Tsogka K, Sounidaki M, Liakopoulos V, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase downregulates T-cell receptor complex ζ -chain and c-Myc, and reduces proliferation, lactate dehydrogenase levels and mitochondrial glutaminase in human T-cells. *Mol Med Rep*. janv 2016;13(1):925-32.

Eleftheriadis T, Pissas G, Yiannaki E, Markala D, Arampatzis S, Antoniadis G, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in mixed lymphocyte reaction affects glucose influx and enzymes involved in aerobic glycolysis and glutaminolysis in alloreactive T-cells. *Hum Immunol*. 1 déc 2013;74(12):1501-9.

Essakalli M, Brick C, Bennani N, Benseffaj N, Ouadghiri S, Atouf O. Le lymphocyte TH17 dernier-né de la famille des lymphocytes T CD4⁺. *Pathol Biol*. déc 2010;58(6):437-43.

Fafournoux P, Remesy C, Demigne C. Fluxes and membrane transport of amino acids in rat liver under different protein diets. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 1 nov 1990;259(5):E614-25.

Ferguson DC, McCorkle JR, Barnett KR, Bonten EJ, Bergeron BP, Bhattarai KR, et al. Amino acid stress response genes promote L-asparaginase resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv*. 14 juin 2022;6(11):3386-97.

Ferreira RR, Varisi VA, Meinhardt LW, Lea PJ, Azevedo RA. Are high-lysine cereal crops still a challenge? *Braz J Med Biol Res*. juill 2005;38(7):985-94.

Fesnak A, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, US, O'Doherty U, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, US. Clinical Development and Manufacture of Chimeric Antigen Receptor T cells and the Role of Leukapheresis. *Eur Oncol Haematol*. 2017;13(01):28.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. avr 2003;4(4):330-6.

Forouzandeh F, Jalili RB, Germain M, Duronio V, Ghahary A. Differential immunosuppressive effect of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on primary human CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Mol Cell Biochem*. 1 févr 2008;309(1):1-7.

Fruento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med*. 19 août 2002;196(4):459-68.

Gacerez AT, Sentman CL. T-bet promotes potent antitumor activity of CD4⁺ CAR T cells. *Cancer Gene Ther*. juin 2018;25(5-6):117-28.

- Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med.* juin 2013;19(6):739-46.
- Galaine J, Godet Y, Adotévi O. Pour comprendre : l'activation lymphocytaire T. *Bull Cancer (Paris)*. nov 2016;103 Suppl 1:S127-31.
- Ghimire S, Weber D, Mavin E, Wang X nong, Dickinson AM, Holler E. Pathophysiology of GvHD and Other HSCT-Related Major Complications. *Front Immunol.* 20 mars 2017;8:79.
- Gold LT, Masson GR. GCN2: roles in tumour development and progression. *Biochem Soc Trans.* 29 avr 2022;50(2):737-45.
- Greenshpan Y, Sharabi O, Ottolenghi A, Cahana A, Kundu K, M. Yegodayev K, et al. Synthetic promoters to induce immune-effectors into the tumor microenvironment. *Commun Biol.* 29 janv 2021;4:143.
- Gregori S, Passerini L, Roncarolo MG. Clinical Outlook for Type-1 and FOXP3+ T Regulatory Cell-Based Therapy. *Front Immunol.* 25 nov 2015;6:593.
- Gregori S, Roncarolo MG. Engineered T Regulatory Type 1 Cells for Clinical Application. *Front Immunol.* 15 févr 2018;9:233.
- Gu X, He D, Li C, Wang H, Yang G. Development of Inducible CD19-CAR T Cells with a Tet-On System for Controlled Activity and Enhanced Clinical Safety. *Int J Mol Sci.* 3 nov 2018;19(11):3455.
- Gumber D, Wang LD. Improving CAR-T immunotherapy: Overcoming the challenges of T cell exhaustion. *EBioMedicine.* 15 mars 2022;77:103941.
- Habibi D, Jalili RB, Forouzandeh F, Ong CJ, Ghahary A. High expression of IMPACT protein promotes resistance to indoleamine 2,3-dioxygenase-induced cell death. *J Cell Physiol.* oct 2010;225(1):196-205.
- Hayashi K, Jutabha P, Endou H, Sagara H, Anzai N. LAT1 is a critical transporter of essential amino acids for immune reactions in activated human T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 oct 2013;191(8):4080-5.
- Hayashi K, Ouchi M, Endou H, Anzai N. HOXB9 acts as a negative regulator of activated human T cells in response to amino acid deficiency. *Immunol Cell Biol.* juill 2016;94(6):612-7.
- Hegde M, Mukherjee M, Grada Z, Pignata A, Landi D, Navai SA, et al. Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13R α 2 mitigate tumor antigen escape. *J Clin Invest.* 1 août 2016;126(8):3036-52.
- Hinnebusch AG. TRANSLATIONAL REGULATION OF *GCN4* AND THE GENERAL AMINO ACID CONTROL OF YEAST. *Annu Rev Microbiol.* 1 oct 2005;59(1):407-50.
- Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* avr 2005;6(4):318-27.

- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*. 14 févr 2003;299(5609):1057-61.
- Hubbard VM, Valdor R, Patel B, Singh R, Cuervo AM, Macian F. Macroautophagy Regulates Energy Metabolism during Effector T Cell Activation. *J Immunol*. 15 déc 2010;185(12):7349-57.
- Ishihara T, Hoshino T, Namba T, Tanaka K ichiro, Mizushima T. Involvement of up-regulation of PUMA in non-steroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 11 mai 2007;356(3):711-7.
- Jachetti E, Caputo S, Mazzoleni S, Brambillasca CS, Parigi SM, Grioni M, et al. Tenascin-C Protects Cancer Stem-like Cells from Immune Surveillance by Arresting T-cell Activation. *Cancer Res*. 15 mai 2015;75(10):2095-108.
- Jahoor F, Badaloo A, Reid M, Forrester T. Protein metabolism in severe childhood malnutrition. *Ann Trop Paediatr*. juin 2008;28(2):87-101.
- Jiang H, Fu D, Bidgoli A, Paczesny S. T Cell Subsets in Graft Versus Host Disease and Graft Versus Tumor. *Front Immunol*. 5 oct 2021;12:761448.
- Jiang W, Li T, Guo J, Wang J, Jia L, Shi X, et al. Bispecific c-Met/PD-L1 CAR-T Cells Have Enhanced Therapeutic Effects on Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol*. 2021;11:546586.
- Jones BS, Lamb LS, Goldman F, Di Stasi A. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Front Pharmacol*. 2014;5:254.
- Jousse C, Bruhat A, Ferrara M, Fafournoux P. Physiological concentration of amino acids regulates insulin-like-growth-factor-binding protein 1 expression. *Biochem J*. 15 août 1998;334(Pt 1):147-53.
- Juillerat A, Marechal A, Filhol JM, Valton J, Duclert A, Poirot L, et al. Design of chimeric antigen receptors with integrated controllable transient functions. *Sci Rep*. 11 janv 2016;6:18950.
- June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*. 23 mars 2018;359(6382):1361-5.
- June CH, Sadelain M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med*. 5 juill 2018;379(1):64-73.
- Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol Biol Cell*. 1 avr 2009;20(7):1992-2003.
- Kasakovski D, Xu L, Li Y. T cell senescence and CAR-T cell exhaustion in hematological malignancies. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 4 juill 2018;11:91.
- Kedzierska K, Koutsakos M. The ABC of Major Histocompatibility Complexes and T Cell Receptors in Health and Disease. *Viral Immunol*. avr 2020;33(3):160-78.

Kilberg MS, Shan J, Su N. ATF4-DEPENDENT TRANSCRIPTION MEDIATES SIGNALING OF AMINO ACID LIMITATION. *Trends Endocrinol Metab TEM*. nov 2009;20(9):436-43.

Kishton RJ, Sukumar M, Restifo NP. Metabolic regulation of T cell longevity and function in tumor immunotherapy. *Cell Metab*. 5 juill 2017;26(1):94-109.

Koneru M, Purdon TJ, Spriggs D, Koneru S, Brentjens RJ. IL-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in vivo. *Oncoimmunology*. mars 2015;4(3):e994446.

Krenciute G, Prinzing BL, Yi Z, Wu MF, Liu H, Dotti G, et al. Transgenic Expression of IL15 Improves Antiglioma Activity of IL13R α 2-CAR T Cells but Results in Antigen Loss Variants. *Cancer Immunol Res*. juill 2017;5(7):571-81.

Lee JI, Dominy JE, Sikalidis AK, Hirschberger LL, Wang W, Stipanuk MH. HepG2/C3A cells respond to cysteine deprivation by induction of the amino acid deprivation/integrated stress response pathway. *Physiol Genomics*. avr 2008;33(2):218-29.

Leiba M, Cahalon L, Shimoni A, Lider O, Zanin-Zhorov A, Hecht I, et al. Halofuginone inhibits NF-kappaB and p38 MAPK in activated T cells. *J Leukoc Biol*. août 2006;80(2):399-406.

Lerner L, Tao J, Liu Q, Nicoletti R, Feng B, Krieger B, et al. MAP3K11/GDF15 axis is a critical driver of cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. sept 2016;7(4):467-82.

Levings MK, Roncarolo MG. Phenotypic and functional differences between human CD4⁺CD25⁺ and type 1 regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;293:303-26.

Ligtenberg MA, Mougiakakos D, Mukhopadhyay M, Witt K, Lladser A, Chmielewski M, et al. Coexpressed Catalase Protects Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Cells as well as Bystander Cells from Oxidative Stress-Induced Loss of Antitumor Activity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 janv 2016;196(2):759-66.

Locafaro G, Andolfi G, Russo F, Cesana L, Spinelli A, Camisa B, et al. IL-10-Engineered Human CD4⁺ Tr1 Cells Eliminate Myeloid Leukemia in an HLA Class I-Dependent Mechanism. *Mol Ther*. 4 oct 2017;25(10):2254-69.

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*. juin 2015;21(6):581-90.

Lynn RC, Weber EW, Sotillo E, Gennert D, Xu P, Good Z, et al. c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. *Nature*. déc 2019;576(7786):293-300.

Ma S, Li X, Wang X, Cheng L, Li Z, Zhang C, et al. Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. *Int J Biol Sci*. 7 sept 2019;15(12):2548-60.

MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:259-83.

Majzner RG, Mackall CL. Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov*. 1 oct 2018;8(10):1219-26.

- Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, et al. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood*. 24 juill 2014;124(4):638-44.
- Masson GR. Towards a model of GCN2 activation. *Biochem Soc Trans*. 31 oct 2019;47(5):1481-8.
- Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. févr 2018;378(5):439-48.
- Maurin AC, Jousse C, Averous J, Parry L, Bruhat A, Cherasse Y, et al. The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab*. avr 2005;1(4):273-7.
- Mei H, Li C, Jiang H, Zhao X, Huang Z, Jin D, et al. A bispecific CAR-T cell therapy targeting BCMA and CD38 in relapsed or refractory multiple myeloma. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 9 oct 2021;14(1):161.
- Mestermann K, Giavridis T, Weber J, Rydzek J, Frenz S, Nerretter T, et al. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells. *Sci Transl Med*. 3 juill 2019;11(499):eaau5907.
- Midwood KS, Chiquet M, Tucker RP, Orend G. Tenascin-C at a glance. *J Cell Sci*. 1 déc 2016;129(23):4321-7.
- Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol*. mars 2013;34(3):137-43.
- Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*. mai 2005;22(5):633-42.
- Nakamura A, Nambu T, Ebara S, Hasegawa Y, Toyoshima K, Tsuchiya Y, et al. Inhibition of GCN2 sensitizes ASNS-low cancer cells to asparaginase by disrupting the amino acid response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 août 2018;115(33):E7776-85.
- Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 28 déc 2017;377(26):2531-44.
- Noyan F, Zimmermann K, Hardtke-Wolenski M, Knoefel A, Schulde E, Geffers R, et al. Prevention of Allograft Rejection by Use of Regulatory T Cells With an MHC-Specific Chimeric Antigen Receptor. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. avr 2017;17(4):917-30.
- Parmar S, Liu X, Tung SS, Robinson SN, Rodriguez G, Cooper LJN, et al. Third Party Umbilical Cord Blood-Derived Regulatory T cells Prevent Xenogenic Graft-versus-Host Disease. *Cytotherapy*. janv 2014;16(1):90-100.

Passerini L, Mel ER, Sartirana C, Foustieri G, Bondanza A, Naldini L, et al. CD4+ T Cells from IPEX Patients Convert into Functional and Stable Regulatory T Cells by FOXP3 Gene Transfer. *Sci Transl Med.* 11 déc 2013;5(215):215ra174-215ra174.

Pietrobon V, Todd LA, Goswami A, Stefanson O, Yang Z, Marincola F. Improving CAR T-Cell Persistence. *Int J Mol Sci.* 7 oct 2021;22(19):10828.

Platten M, von Knebel Doeberitz N, Oezen I, Wick W, Ochs K. Cancer Immunotherapy by Targeting IDO1/TDO and Their Downstream Effectors. *Front Immunol.* 2014;5:673.

Poorebrahim M, Melief J, Pico de Coaña Y, L. Wickström S, Cid-Arregui A, Kiessling R. Counteracting CAR T cell dysfunction. *Oncogene.* 2021;40(2):421-35.

Rashidi A, Miska J, Lee-Chang C, Kanojia D, Panek WK, Lopez-Rosas A, et al. GCN2 is essential for CD8+ T cell survival and function in murine models of malignant glioma. *Cancer Immunol Immunother* CII. janv 2020;69(1):81-94.

Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:413-41.

Rautenberg C, Germing U, Haas R, Kobbe G, Schroeder T. Relapse of Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Prevention, Detection, and Treatment. *Int J Mol Sci.* 8 janv 2019;20(1):228.

Ravindran R, Khan N, Nakaya HI, Li S, Loebbermann J, Maddur MS, et al. Vaccine activation of the nutrient sensor GCN2 in dendritic cells enhances antigen presentation. *Science.* 17 janv 2014;343(6168):313-7.

Ravindran R, Loebbermann J, Nakaya HI, Khan N, Ma H, Gama L, et al. The amino acid sensor GCN2 controls gut inflammation by inhibiting inflammasome activation. *Nature.* 24 mars 2016;531(7595):523-7.

Ren W, Liu G, Yin J, Tan B, Wu G, Bazer FW, et al. Amino-acid transporters in T-cell activation and differentiation. *Cell Death Dis.* 2 mars 2017;8(3):e2655.

Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov.* mars 2019;18(3):175-96.

Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood.* 15 févr 2007;109(4):1568-73.

Romano M, Tung SL, Smyth LA, Lombardi G. Treg therapy in transplantation: a general overview. *Transpl Int.* 2017;30(8):745-53.

Rossi Fanelli F, Afeltra A, Caccavo D, Muscaritoli M, Mitterhofer AP, Laviano A, et al. Comparative effects of arginine and other amino acid deprivation on in vitro expression of lymphocyte activation markers. *Clin Nutr Edinb Scotl.* avr 1994;13(2):75-8.

Saavedra-García P, Roman-Trufero M, Al-Sadah HA, Blighe K, López-Jiménez E, Christoforou M, et al. Systems level profiling of chemotherapy-induced stress resolution in cancer cells reveals druggable trade-offs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27 avr 2021;118(17):e2018229118.

Sadeqi Nezhad M, Seifalian A, Bagheri N, Yaghoubi S, Karimi MH, Adbollahpour-Alitappeh M. Chimeric Antigen Receptor Based Therapy as a Potential Approach in Autoimmune Diseases: How Close Are We to the Treatment? *Front Immunol.* 26 nov 2020;11:603237.

Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak Ö, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med.* 28 déc 2017;377(26):2545-54.

Settembre C, Zoncu R, Medina DL, Vetrini F, Erdin S, Erdin S, et al. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* 7 mars 2012;31(5):1095-108.

Shekib LA. Nutritional improvement of lentils, chick pea, rice and wheat by natural fermentation. *Plant Foods Hum Nutr.* oct 1994;46(3):201-5.

Sicard A, Lamarche C, Speck M, Wong M, Rosado-Sánchez I, Blois M, et al. Donor-specific chimeric antigen receptor Tregs limit rejection in naive but not sensitized allograft recipients. *Am J Transplant.* 2020;20(6):1562-73.

Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. In: *Advances in Immunology* [Internet]. Elsevier; 2006 [cité 2 août 2022]. p. 1-50. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065277606900017>

Song Y, Wang N, Chen L, Fang L. Tr1 Cells as a Key Regulator for Maintaining Immune Homeostasis in Transplantation. *Front Immunol.* 26 avr 2021;12:671579.

Steentoft C, Migliorini D, King TR, Mandel U, June CH, Posey AD. Glycan-directed CAR-T cells. *Glycobiology.* 1 sept 2018;28(9):656-69.

Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J.* 6 avr 2021;11(4):69.

Sun S, Hao H, Yang G, Zhang Y, Fu Y. Immunotherapy with CAR-Modified T Cells: Toxicities and Overcoming Strategies. *J Immunol Res.* 17 avr 2018;2018:2386187.

Sundrud MS, Koralov SB, Feuerer M, Calado DP, Kozhaya AE, Rhule-Smith A, et al. Halofuginone inhibits TH17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response. *Science.* 5 juin 2009;324(5932):1334-8.

Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res.* janv 2017;27(1):109-18.

Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood.* 15 mai 2002;99(10):3493-9.

Teng MWL, Galon J, Fridman WH, Smyth MJ. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J Clin Invest.* sept 2015;125(9):3338-46.

Terme M, Tanchot C. Système immunitaire et tumeurs. *Ann Pathol.* févr 2017;37(1):11-7.

- Tsalikis J, Croitoru DO, Philpott DJ, Girardin SE. Nutrient sensing and metabolic stress pathways in innate immunity. *Cell Microbiol.* oct 2013;15(10):1632-41.
- Usuki F, Fujimura M, Yamashita A. Endoplasmic reticulum stress preconditioning modifies intracellular mercury content by upregulating membrane transporters. *Sci Rep.* 28 sept 2017;7:12390.
- Van de Velde LA, Guo XZJ, Barbaric L, Smith AM, Oguin TH, Thomas PG, et al. Stress Kinase GCN2 Controls the Proliferative Fitness and Trafficking of Cytotoxic T Cells Independent of Environmental Amino Acid Sensing. *Cell Rep.* 22 2016;17(9):2247-58.
- Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 août 2004;101(31):11269-74.
- Volk A, Hartmann S, Muik A, Geiß Y, Königs C, Dietrich U, et al. Comparison of three humanized mouse models for adoptive T cell transfer. *J Gene Med.* 2012;14(8):540-8.
- Voynova E, Kovalovsky D. From Hematopoietic Stem Cell Transplantation to Chimeric Antigen Receptor Therapy: Advances, Limitations and Future Perspectives. *Cells.* 22 oct 2021;10(11):2845.
- Walls J, Sinclair L, Finlay D. Nutrient sensing, signal transduction and immune responses. *Semin Immunol.* oct 2016;28(5):396-407.
- Wang M, Munoz J, Goy A, Locke FL, Jacobson CA, Hill BT, et al. Three-Year Follow-Up of KTE-X19 in Patients With Relapsed/Refractory Mantle Cell Lymphoma, Including High-Risk Subgroups, in the ZUMA-2 Study. *J Clin Oncol* [Internet]. 4 juin 2022 [cité 10 oct 2022]; Disponible sur: <https://ascopubs.org/doi/pdf/10.1200/JCO.21.02370>
- Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, et al. The Transcription Factor Myc Controls Metabolic Reprogramming upon T Lymphocyte Activation. *Immunity.* déc 2011;35(6):871-82.
- Wang Y, Ning Y, Alam GN, Jankowski BM, Dong Z, Nör JE, et al. Amino Acid Deprivation Promotes Tumor Angiogenesis through the GCN2/ATF4 Pathway. *Neoplasia.* août 2013;15(8):989-97.
- Warda W, Larosa F, Neto Da Rocha M, Trad R, Deconinck E, Fajloun Z, et al. CML Hematopoietic Stem Cells Expressing IL1RAP Can Be Targeted by Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells. *Cancer Res.* 1 févr 2019;79(3):663-75.
- Webster B, Xiong Y, Hu P, Wu D, Alabanza L, Orentas RJ, et al. Self-driving armored CAR-T cells overcome a suppressive milieu and eradicate CD19+ Raji lymphoma in preclinical models. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 1 sept 2021;29(9):2691-706.
- Wei C, Lin M, Jinjun B, Su F, Dan C, Yan C, et al. Involvement of general control nonderepressible kinase 2 in cancer cell apoptosis by posttranslational mechanisms. Luo K, éditeur. *Mol Biol Cell.* 15 mars 2015;26(6):1044-57.
- Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* juin 2011;12(6):492-9.

- Whilding LM, Halim L, Draper B, Parente-Pereira AC, Zabinski T, Davies DM, et al. CAR T-Cells Targeting the Integrin $\alpha\beta 6$ and Co-Expressing the Chemokine Receptor CXCR2 Demonstrate Enhanced Homing and Efficacy against Several Solid Malignancies. *Cancers*. 14 mai 2019;11(5):E674.
- Wilkie S, van Schalkwyk MCI, Hobbs S, Davies DM, van der Stegen SJC, Pereira ACP, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J Clin Immunol*. oct 2012;32(5):1059-70.
- Wu CY, Roybal KT, Puchner EM, Onuffer J, Lim WA. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science*. 16 oct 2015;350(6258):aab4077.
- Xu D, Dai W, Kutzler L, Lacko HA, Jefferson LS, Dennis MD, et al. ATF4-Mediated Upregulation of REDD1 and Sestrin2 Suppresses mTORC1 Activity during Prolonged Leucine Deprivation. *J Nutr*. mai 2020;150(5):1022-30.
- Yafour N, Beckerich F, Bulabois CE, Chevallier P, Daguindau É, Dumesnil C, et al. Stratégies préventives et thérapeutiques de la rechute après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer (Paris)*. déc 2017;104(12):S84-98.
- Yan Y, Zhang GX, Gran B, Fallarino F, Yu S, Li H, et al. IDO Upregulates Regulatory T Cells via Tryptophan Catabolite and Suppresses Encephalitogenic T Cell Responses in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. 15 nov 2010;185(10):5953-61.
- Yang X, Xia R, Yue C, Zhai W, Du W, Yang Q, et al. ATF4 Regulates CD4⁺ T Cell Immune Responses through Metabolic Reprogramming. *Cell Rep*. 8 mai 2018;23(6):1754-66.
- Yang Y, Kohler ME, Chien CD, Sauter CT, Jacoby E, Yan C, et al. TCR engagement negatively affects CD8 but not CD4 CAR T cell expansion and leukemic clearance. *Sci Transl Med*. 22 nov 2017;9(417):eaag1209.
- Zhang C, Bai N, Chang A, Zhang Z, Yin J, Shen W, et al. ATF4 is directly recruited by TLR4 signaling and positively regulates TLR4-triggered cytokine production in human monocytes. *Cell Mol Immunol*. janv 2013;10(1):84-94.
- Zhang H, Gao L, Liu L, Wang J, Wang S, Gao L, et al. A Bcma and CD19 Bispecific CAR-T for Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *Blood*. 13 nov 2019;134(Supplement_1):3147.
- Zhang RY, Wei D, Liu ZK, Yong YL, Wei W, Zhang ZY, et al. Doxycycline Inducible Chimeric Antigen Receptor T Cells Targeting CD147 for Hepatocellular Carcinoma Therapy. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:233.
- Zhang Y, Li Y, Cao W, Wang F, Xie X, Li Y, et al. Single-Cell Analysis of Target Antigens of CAR-T Reveals a Potential Landscape of “On-Target, Off-Tumor Toxicity”. *Front Immunol*. 16 déc 2021;12:799206.
- Zhong S, Cui Y, Liu Q, Chen S. CAR-T cell therapy for lung cancer: a promising but challenging future. *J Thorac Dis*. août 2020;12(8):4516-21.

Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun.* déc 2019;10(1):1523.

Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89.



ANNEXES



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	1000507658	
Application number	EP22306008.8	
File No. to be used for priority declarations	EP22306008	
Date of receipt	05 July 2022	
Your reference	BET 22P1045/BKKT	
Applicant	Nutritheragene	
Country	FR	
Title	CONTROLLED EXPRESSION OF A TRANSGENE IN HUMAN T OR NK CELLS FOR USE IN CELLULAR IMMUNOTHERAPY	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdf\BET 22P1045_Filed patent application.pdf (21 p.) SEQLTXT.txt\BET 22P1045_Filed sequence listing ST25 .txt	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SPECEPO-2.pdf\BET 22P1045_Filed drawings (2).pdf (9 p.) f1002-1.pdf (1 p.)
Submitted by	CN=Bertrand Domenego 1830	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	05 July 2022, 18:04:58 (CEST)	
Official Digest of Submission	66:70:22:94:AA:87:38:46:BA:B6:35:39:CA:E3:D4:C9:38:3E:45:BB	

/INPI, section dépôt/

Form 1002 - 1: Public inventor(s)

Designation of inventor

User reference: BET 22P1045/BKKT
Application No:

Public

Inventor	Name: Bruhat, M. Alain Address: 63450 CHANONAT France The applicant has acquired the right to the European patent: As employer
Inventor	Name: DOUGÉ, Mrs. Aurore Address: 63115 MEZEL France The applicant has acquired the right to the European patent: As employer
Inventor	Name: ROUZAIRE, M. Paul Address: 63450 CHANONAT France The applicant has acquired the right to the European patent: As employer

Signature(s)

Place: Paris
Date: 05 July 2022
Signed by: Bertrand Domenego 1830
Association: Lavoix
Representative name: Bertrand DOMENEGO
Capacity: (Representative)

CONTROLLED EXPRESSION OF A TRANSGENE IN HUMAN T OR NK CELLS FOR USE IN CELLULAR IMMUNOTHERAPY

5 The present invention concerns a human T cell or NK cell comprising a nucleic acid construct which comprises a transgene which is placed under the control of a regulatory polynucleotide inducible by a deficiency in at least one essential amino acid, and cellular immunotherapy employing said human T cell or NK cell.

10 Cellular immunotherapy is currently expanding. For instance, in oncology, this therapeutic approach is using immune cells to rebalance the impaired anti-tumor immunosurveillance. This principle is widely used in the treatment of hematological malignancies, with old cell therapies such as allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). Allo-HSCT basically involves replacing a patient's diseased bone marrow with healthy bone marrow collected from an HLA-matched donor. It represents
15 a powerful cell therapy strategy, allowing bone marrow and immune system reconstitution but also anti-tumor effect of donor lymphocytes (Graft-versus-Leukemia or GvL effect). Unfortunately, this procedure also exhibits high toxicity such as graft versus host disease (GvHD) and infections, which limit the indications for curative strategies. These complications represent a major cause of morbidity and mortality, poor quality of life and an
20 additional economic cost, due in particular to the expensive therapies to treat them and the increased hospitalization time for patients.

More recently, CAR-T (Chimeric Antigen Receptor-T) cells therapy represents a new approach for cancer treatment. CAR-T cells are autologous T cells collected from the patient and modified ex vivo to express a chimeric antigen receptor (CAR) specific for a tumor
25 antigen of interest. The CAR is composed by (i) an antigen-binding domains (a single-chain variable fragment scFv derived from an antibody), (ii) signaling domains of the T-cell receptor (TCR), and (iii) additional costimulatory domains. These lymphocytes are then re injected into the patient, and will be able to self-activate upon recognition of their target antigen, and directly kill the tumor cells carrying this antigen. For example, anti-CD19 CAR-
30 T cells have obtained Marketing Authorization for several years in the treatment of certain haematological malignancies in relapse or refractory to conventional chemotherapy treatments, and the global development of CAR-T cells is booming, including for the treatment of solid tumors. However, this innovative therapeutic strategy has points for improvement, particularly in terms of efficacy since a significant percentage of patients will
35 see their CAR-T cells become less competent over time following, for example, a CAR exhaustion phenomenon. Additionally, where CAR-T cell toxicity develops (e.g. with onset

of symptoms of cytokine release syndrome or central nervous system toxicity), it may be needed to curb activity of CAR-T cells in a reversible manner, for example by making the CAR-T cell "exhausted" so that it is reversibly braked rather than irreversibly destroyed.

Another recent major cellular therapy strategy is TCR transgenic T cells. Similarly to CAR-T cells, TCR transgenic T cells are modified to express a receptor specific for a tumor antigen, but this time, the TCR looks like endogen TCR and recognizes tumor antigen presented by Major Histocompatibility Complex (MHC), allowing TCR recognition of more antigens than CAR-T cells since CAR-T recognize only surface antigens. This strategy is particularly expanding in the treatment of solid tumors.

Still another recent antitumoral approach consists in the use of primary NK cells or modified CAR-NK cells infusion, with promising results in the field of hematological malignancies or solid tumors. This last option needs a careful tuning to avoid issues highlighted in CAR-T cells.

Cellular immunotherapy consists also in promising approaches in all pathologies where T cells are involved, and numerous trials are ongoing in auto-immune or allergic diseases or graft rejection using either CAR-T cells or TCR transgenic T cells.

However, to date there are still many difficulties in controlling these cells once reinjected into the patient, either to increase their therapeutic action or to limit their toxicity. It therefore appears important to be able to provide a flexible and easily reversible gene expression regulation system to control the effects of these cells as simply as possible.

The present invention highlights a new use of a gene expression regulatory technology disclosed in the international patent application published as WO 2013/068096, herein called NUTRIREG. In mammals, essential amino acids (EAAs) are not synthesized by the body and must therefore be provided by food. In case of lack, the organism must absolutely adapt, which is why it activates a specific signaling pathway, the GCN2-ATF4 pathway, leading to the overexpression of a transcription factor (ATF4) present in all the cells of the organism. This transcription factor will then bind to the DNA at the level of the promoter of specific target genes (Amino Acid Responsive - AARE sequences) and activate their transcription. These genes play a key role in the adaptation process to nutritional stress. This GCN2-ATF4 signaling pathway was therefore used to develop a system for regulating the expression of a transgene. The NUTRIREG system is based on the association (i) of an artificial promoter (based on AARE sequences) strongly inducible by a deficiency in one EAA which controls the expression of a transgene (AARE-Gene) with (ii) a food deficient in an EAA which leads to a sharp drop in the blood concentration of the limiting EAA and allows the induction of the GCN2-ATF4 signaling pathway. After having delivered the AARE-Gene plasmid to the target tissue using a viral vector, the expression

of the transgene can thus be induced after the consumption of a diet deficient in one EAA (Figure 1). Interestingly, this pathway can be quickly turned-off via the consumption of the missing EAA, which offers an easily reversible regulation system, and devoid of adverse effects since it involves a physiological nutritional pathway. Proof of the functionality of this system has already been provided in mice, in different organs (liver, pancreas, brain, eye), but also in glioblastoma tumor cells thanks to the use of a pro-apoptotic gene (Chaveroux et al, Nat Biotechnol, 2016, 34, 746–751).

The NUTRIREG technology is used in this invention to control the cDNA expression of a protein having a therapeutic application in cellular immunotherapy. This construction, inserted in a viral vector, can be directly integrated into donor T or NK cells, or into modified T or NK cells, before reinjection into the patient. Using an essential amino acid-deficient mixture will allow expression of the peptide drug on demand when needed. The use of NUTRIREG in cellular immunotherapy opens up numerous preventive or curative therapeutic possibilities, depending on the drug gene expressed, and the time at which it is expressed, whether to curb toxicity or, on the contrary, to stimulate the efficacy of the cell therapy studied.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention relates to a human T cell or NK cell comprising a nucleic acid construct which comprises:

i) a regulatory polynucleotide comprising a minimal promoter and at least one AARE (amino acid response element) nucleic acid sequence, said regulatory polynucleotide being activated in a subject upon consumption of a diet deficient in at least one essential amino acid; and

ii) a transgene which is placed under the control of the said regulatory polynucleotide.

The invention further relates to said human T cell or NK cell for use for cellular immunotherapy.

A method for preparing a human T cell or NK cell according to the invention is also provided, wherein a human T or NK cell is transfected or transduced with a vector comprising a nucleic acid construct which comprises:

i) a regulatory polynucleotide comprising a minimal promoter and at least one AARE (amino acid response element) nucleic acid sequence, said regulatory polynucleotide being activated in a subject upon consumption of a diet deficient in at least one essential amino acid; and

ii) a transgene which is placed under the control of the said regulatory polynucleotide.

DETAILED DESCRIPTION

5 The GCN2-ATF4 signaling pathway is ubiquitous in cells but, depending on the tissue or organ, the pathway may not be activated by the nutritional modulation system. For instance, EAA deprivation cannot induce activation of the GCN2-ATF4 pathway in muscles in mice. The inventors demonstrated that the GCN2-ATF4 pathway is inducible by an EAA starvation in human T cells, but initial *in vitro* experiments failed as the inventors also found that activation of the human T lymphocyte is essential for the activation of GCN2 kinase. 10 These results are expected to be transposable to human NK cells, since a NK cell is basically a cytotoxic T cell without a TCR.

NUTRIREG T-cells or NK-cells

15 The invention relates to a human T-cell or NK cell that comprises a nucleic acid construct, which comprises:

- i) a regulatory polynucleotide comprising a minimal promoter and at least one AARE (amino acid response element) nucleic acid sequence, said regulatory polynucleotide being activated in a subject upon consumption of a diet deficient in at least one essential amino acid; and
- 20 ii) a transgene which is placed under the control of the said regulatory polynucleotide.

Human T cells or NK cells, and transgenes

25 According to some embodiments, the human T-cell of the invention is a chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell (which includes CAR-Tregs), or a T cell receptor (TCR) transgenic T cell.

In these embodiments, the transgene is selected so as to stimulate efficacy of cellular immunotherapy with said CAR-T cell or transgenic TCR T cell, or to curb toxicity induced by said CAR-T cell, or transgenic TCR T cell. In particular, the transgene is a transgene that prevents CAR-T cell exhaustion.

30 Suitable transgenes that stimulate efficacy of cellular immunotherapy with CAR-T cell or transgenic TCR T cell include, according to recent promising studies, c-JUN, T-bet, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23 (to reverse or delay T-cell exhaustion or to stimulate those modified T cells) (Poorebrahim, et al., *Oncogene* 40.2 (2021): 421-435; Pietrobon et al., *International Journal of Molecular Sciences* 22.19 (2021): 10828).

35 Suitable transgenes that curb toxicity induced by CAR-T cell or transgenic TCR T cell include inhibitory receptors (such as PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3), or immunosuppressive

factors (such as IL-35, IL-10, TGF- β , FoxP3, IDO, TOX, Eomes) (Poorebrahim, et al., *Oncogene* 40.2 (2021): 421-435 ; Pietrobon et al., *International Journal of Molecular Sciences* 22.19 (2021): 10828).

5 These human T-cells according to the invention are in particular intended for the treatment of cancers, such as hematological malignancies or solid cancers.

According to some embodiments, the human T-cell of the invention is intended for allogeneic transplantation, or for treating a hematologic cancer.

10 In a first aspect of these embodiments, the transgene is selected so as to promote human T cell differentiation into regulatory T cells (Treg), or in type 1 regulatory T (Tr1) cells.

Suitable transgenes that promote human T cell differentiation into (i)Tr1 include a transgene encoding a cytokine such as IL-10, TGF- β , IFN- α , or IL-6 (Roncarolo et al., *Immune-Mediated Diseases, Immunity*, Volume 49, Issue 6, 2018), or (ii) Treg include 15 mainly FoxP3. Preferably, the transgene that promotes human T cell differentiation into Tr1 is a transgene encoding IL-10.

According to this aspect, expression of the transgene is to be induced when signs of GvHD are detected, in order to inhibit or control GvHD.

20 According to a second aspect of these embodiments, the human T-cell which is intended for use for treatment of a hematologic cancer by allogeneic transplantation comprises a transgene that stimulates efficacy of cellular immunotherapy with an individual, i.e. a human or a non-human mammal. For instance, the transgene encodes a stimulatory cytokine such as IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-7, IL-15 (Ringdén, et al., *British journal of haematology* 147.5 (2009): 614-633).

25

According to some embodiments, the human T-cell of the invention is intended for controlling allograft rejection of solid organ transplant, or for use for treating an autoimmune disease. In these embodiments, the human T-cell is a human CAR-Treg, more particularly an antigen-specific CAR-Treg, wherein the antigen is a transplant-specific alloantigen, or 30 an auto-antigen associated with the auto-immune disease.

Antigen-specific human CAR-Tregs can be generated by isolating polyclonal Tregs (from peripheral blood of an individual) and transducing them with an antigen-specific CAR construct, or by cotransducing CD4⁺ or CD3⁺ T cells with antigen-specific CAR constructs and FoxP3 cDNA (Arjomandnejad et al. *Biomedicines* 2022, 10(2), 287).

In these embodiments, the transgene is selected so as to stimulate CAR-Treg efficacy and/or prevent CAR-Treg exhaustion, and includes c-JUN, T-bet, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, as already mentioned above.

5 According to some embodiments, the human cell that comprises the nucleic acid construct, including the regulatory polynucleotide and transgene, is a human NK cell. As used herein the term NK cell includes NK cells and modified NK cells, such as CAR-NK cell.

10 In these embodiments, the transgene is selected so as to stimulate efficacy of cellular immunotherapy with said human NK cell or CAR-NK cell of the invention. In particular, the transgene is a transgene that enhances activation or proliferation of NK cells, or CAR-NK cells.

Suitable transgenes include NKG2D, IL-12, IL-15, or IL-18 (Shimasaki N, et al., Nat Rev Drug Discov. 2020 Mar;19(3):200-218; Daher M. et al., Blood. 2021 Feb 4;137(5):624-15 636; Wang X. et al., Blood Adv. 2020 May 12;4(9):1950-1964.).

These human NK cells or CAR-NK cells according to the invention are in particular intended for the treatment of hematological malignancies or solid tumors.

Nucleic acid construct and regulatory polynucleotide

20 The nucleic acid construct comprises:

i) a regulatory polynucleotide comprising a minimal promoter and at least one AARE (amino acid response element) nucleic acid sequence, said regulatory polynucleotide being activable or activated in a subject upon consumption of a diet deficient in at least one essential amino acid; and

25 ii) a transgene which is placed under the control of the said regulatory polynucleotide.

Such a nucleic acid construct has been described in the international patent applications published as WO 2013/068096 A1 and WO2017/207744 A1 that are herein incorporated in their entirety.

30 The regulatory polynucleotide comprises a minimal promoter and at least one AARE (amino acid response element) nucleic acid sequence.

As used herein, a "minimal promoter" is intended to mean a promoter including all the required elements to properly initiate transcription of a gene of interest positioned downstream. The expressions "minimal promoter" and "core promoter" are considered as equivalent expressions. A skilled in the art understands that the "minimal promoter" includes
35 at least a transcription start site, a binding site for a RNA polymerase and a binding site for general transcription factors (TATA box).

Suitable minimal promoters are known for a skilled artisan.

In some embodiments, a minimal promoter is selected from the group consisting of the promoter of the thymidine kinase (TK), the promoter of the β -globin, the promoter for cytomegalovirus (CMV), the SV40 promoter and the like.

5 As used herein, an "AARE" or "amino acid response element" denotes a nucleic acid sequence which is bound by the activating transcription factor 4 (ATF4), after activation of the GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway by deficiency in an essential amino acid (EAA), and thereby induce expression of a target gene driven by the AARE.

10 In mammals, after consumption of a diet deficient in one EAA, the blood concentration of the limiting EAA decreases rapidly and greatly, triggering an ubiquitous adaptive process referred to as the amino-acid response pathway. The initial step of this pathway is the activation of the mammalian GCN2 protein kinase by uncharged tRNAs. GCN2 then phosphorylates the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) on serine 51, leading to upregulation of the translation of the ATF4. Once induced, ATF4 activates transcription
15 of specific target genes through binding to the AARE. The GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway can be rapidly turned off by the administration of the missing EAA.

According to some embodiments, the amino acid response element (AARE) nucleic acid sequence is selected in the group consisting of the nucleic acid sequences SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 and SEQ ID NO: 5.

20 The regulatory polynucleotide which comprises at least one AARE may include at least 2, at least 3, at least 4 or at least 5 AARE nucleic acid sequences. The expression "at least one AARE nucleic acid sequence" thus includes e.g. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20 AARE nucleic acid sequences.

25 In certain embodiments, the regulatory polynucleotide comprises at least two AARE nucleic acid sequences. In some other embodiments, the regulatory polynucleotide comprises from 1 to 20 AARE nucleic acid sequences, preferably from 1 to 10 AARE nucleic acid sequences. In certain embodiments, the regulatory polynucleotide comprises from 2 to 6 AARE nucleic acid sequences.

30 In some embodiments, the regulatory polynucleotide comprises 2 AARE nucleic acid sequences selected from the group consisting of the nucleic acid sequences SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 4. In some embodiments, the regulatory polynucleotide comprises 6 AARE nucleic acid sequences of sequence SEQ ID NO: 1.

In certain embodiments, the at least two AARE nucleic acid sequences may be identical or distinct.

According to an embodiment, the regulatory polypeptide comprises the Thymidine kinase (Tk) minimal promoter and six copies of the AARE nucleic acid sequence from the TRIB3 gene, and comprises or consists of a sequence as shown in SEQ ID NO: 6.

5 The regulatory polynucleotide construct thus comprises at least one AARE nucleic acid sequence placed immediately upstream of the minimal promoter which controls the expression of the transgene placed downstream.

The regulatory polynucleotide is activated in an individual upon consumption of a diet deficient in at least one essential amino acid.

10 The individual is a human or a non-human mammal, preferably a human. In some embodiments, the non-human mammal is selected from the group consisting of a mouse, a rat and the like; a primate such as a chimp, a monkey, and the like.

In mammals, nine EAAs must be supplied in the diet, and a lack of any one of them can induce the AARE-driven expression system.

15 As used herein, an "essential amino acid" includes histidine (His, H), isoleucine (Ile, I), leucine (Leu, L), Lysine (Lys, K), methionine (Met, M), phenylalanine (Phe, F), threonine (Thr, T), tryptophan (Trp, W) and valine (Val, V).

20 As used herein, a "diet deficient in at least one essential amino acid" is intended to mean a diet deficient in 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9 essential amino acid(s). According to some embodiments, the diet is deficient in Leucine.

Activation of the regulatory polynucleotide

For activation of the regulatory peptide, a diet deficient in at least one essential amino acid is administered to the individual, i.e. human or non-human mammal as defined above.

25 According to preferred embodiments, the individual has been starved before the diet deficient in at least one essential amino acid is administered.

Cellular immunotherapy with NUTRIREG T cells or NK cells

30 The human T cell or NK cell according to the invention is for use for cellular immunotherapy.

It is also provided a method of cellular immunotherapy of an individual in need thereof, which comprises administering said individual with a T cell or NK cell according to the invention.

35 The cellular immunotherapy is intended for an individual that is a human or a non-human mammal, preferably a human. In some embodiments, the non-human mammal is

selected from the group consisting of a mouse, a rat and the like; a primate such as a chimp, a monkey, and the like.

In some embodiments, the T cell or NK cell is autologous to the human individual. In some embodiments, the T cell or NK cell is allogenic to the human individual.

5 The cellular immunotherapy non limitatively includes treating cancer, controlling allograft rejection of solid transplant, or treating an auto-immune disease.

The cancer may be a solid cancer or a hematologic cancer.

10 At some point(s) in time, the individual who/that is administered with the human T cell or NK cell further receives a diet deficient in at least one essential amino acid to induce transgene expression.

15 It is an advantage of the human cells according to the invention, especially the human T cells according to the invention, that transgene expression is induced by EAA deprivation (or activation of AARE nucleic acids) only in those human cells, especially T cells, that are activated.

20 This enables expression of the transgene only where needed, by exposing the human T cells or NK cells of the invention to EEA deficiency. Indeed, in addition to be induced by an endogenous signalling pathway (GCN2-ATF4) which is food inducible, one of the major advantages of the NUTRIREG-T cell or NK cell system is the possibility of On/Off modulation of the transgene expression, with control of this expression over time.

25 A first application for the human T cells of the invention is in the context of allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) which is the treatment of choice of many haematological malignancies. Allogeneic donor T cells recognize minor histocompatibility antigens (minor H antigens) which results in elimination of leukaemic cells, a phenomenon called the graft *versus* leukaemia (GvL) effect. Because many minor H antigens are expressed ubiquitously, the GvL effect is often accompanied by the destruction of a patient's normal tissues, the graft *versus* host disease (GvHD), which is a major side-effect of allo-SCT.

30 A preventive or curative control of GvHD could be achieved with a human T cell of the invention comprising a transgene promoting the expansion of human T lymphocytes with an anti-inflammatory profile, to slow down the cytotoxic response responsible for GvHD. In this aspect, donor T cells (present in allo-stem cells to be grafted in an individual in need thereof, or in the form of Donor Lymphocytes Injection) are genetically modified *ex vivo* with the NUTRIREG system including a Treg or Tr1-inducing transgene, before reinjection into
35 the individual. This allows, by simple consumption for a few hours of a diet deficient in an EAA, (i) to express this Treg or Tr1-inducing transgene (usually an anti-inflammatory

cytokine) in activated T cells (which are responsible of GvHD), and (ii) to promote the polarization of the T response towards a T regulatory phenotype (Treg or Tr1).

Conversely, in order to regain the graft versus leukemia (GvL) effect in the event of a relapse of the hematologic disease in the individual, one could also consider rebooting the donor T lymphocytes using a stimulatory cytokine transiently expressed under the dependence of EEA deprivation.

Hence, according to some embodiments, the human NUTRIREG T-cell is for use for treating cancer, in particular a hematologic cancer by allogeneic transplantation. The hematologic cancer is in particular leukemia, lymphoma, or multiple myeloma.

In some aspects, the transgene promotes human T cell differentiation into regulatory T cells (Treg or Tr1); for instance the transgene encodes a cytokine such as IL-10, TGF- β , IFN- α , and IL-6 or a transcription factor such as FoxP3. Expression of the transgene that promotes human T cell differentiation into Treg or Tr1 prevents or treats graft versus host disease (GvHD). In this aspect, a repeated induction of the transgene that promotes human T cell differentiation into Treg or Tr1 is intended by intermittent consumption of a diet deficient in one EAA.

In the context of controlling the cytotoxic response of GvHD, the On/Off modulation enabled by the NUTRIREG-T cell system is a key asset since the consumption of the missing EAA will stop the expression of the transgene that promotes human T cell differentiation into Treg or Tr1, such as an anti-inflammatory cytokine, in due time. NUTRIREG system is thus highly advantageous because it allows transient expression of the transgene thus preserving anti-tumoral effect of the graft, which is not possible with the immunosuppressive drugs currently used. Another advantage is that the transgene will be expressed only in activated T cells since the GCN2-ATF4 pathway cannot be induced in quiescent T cells, which represents an essential safety control.

In other aspects, the transgene stimulates efficacy of cellular immunotherapy with said human T-cell, to regain GvL effect; for instance the transgene encodes stimulatory cytokines such as IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-7, IL-15. Expression of the transgene that stimulates efficacy of cellular immunotherapy with said human T-cell induces or stimulates GvL effect. In this aspect, a repeated induction of the transgene that stimulates efficacy of cellular immunotherapy with said human T-cell is intended by intermittent consumption of a diet deficient in one EAA, when it is suspected that a relapse of the hematologic disease occurs in the individual.

A second application concerns the therapeutic strategy of human CAR-T cells or TCR transgenic T cells of the invention, either with the aim of limiting their toxicity using a

transgene encoding an inhibitory receptor (such as PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3), or immunosuppressive factor (such as IL-35, IL-10, TGF- β , FoxP3, IDO, TOX, Eomes), or on the contrary to stimulate their activity. Human CAR-T cells or TCR transgenic T cells according to the invention could allow transient expression of a gene of interest in preventing the exhaustion of the T cells. Encouraging results have been described in the literature regarding c-JUN, which when overexpressed makes the CAR-T cells resistant to exhaustion (Lynn et al., *Nature* 576, 293–300 (2019)). A transient and repeated expression of c-JUN under the dependence of NUTRIREG in the CAR-T cell TCR transgenic T cell could thus make it resistant to exhaustion and promote the maintenance of its efficacy over time. Some results are also promising with T-bet, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, to reverse or delay T-cell exhaustion or to stimulate modified T cells (Poorebrahim, et al., *Oncogene* 40.2 (2021): 421-435; Pietrobon et al., *International Journal of Molecular Sciences* 22.19 (2021): 10828).

Similarly, therapeutic strategies can use human NK cells, or CAR-NK cells according to the invention, with the aim of stimulating their activity by enhancing activation or proliferation with transgenes such as NKG2D, IL-12, IL-15, or IL-18.

In the context of CAR-T cells TCR transgenic T cells, NK cells or CAR-NK cells, the On/Off modulation enabled by the NUTRIREG system is also very important to allow both (i) to have the beneficial effect of the transiently expressed gene and (ii) to limit its potentially toxic effect if it is expressed for too long (example of cJUN, which may have an oncogenic effect).

Accordingly, in some embodiments, the cellular immunotherapy with the human CAR-T cells or TCR transgenic T cells, or human NK cells or CAR-NK cells of the invention is for treating cancer, in particular a solid cancer.

For cancer therapy, the skilled person will select in particular a human CAR-T cell, TCR transgenic T or CAR-NK cell that is specific for a tumor antigen of the individual having cancer.

In these aspects, the transgene stimulates efficacy of cellular immunotherapy with said human CAR-T cell, transgenic TCR T cell, NK cell or CAR-NK cell, or curbs toxicity induced by said CAR-T cell or transgenic TCR T cell. In particular, the transgene prevents CAR-T cell exhaustion or transgenic TCR T cell exhaustion.

In some other embodiments, the cellular immunotherapy with the human CAR-T cells or TCR transgenic T cells of the invention is for treating an auto-immune disease. In particular, for an auto-immune disease caused by the production of autoantibodies, the human CAR-T cells or TCR transgenic T cells will target auto-antibodies producing B cells.

For an auto-immune disease caused by cytotoxic T cells (such as in colitis, multiple sclerosis, or type 1 diabetes), the human CAR-T cells or TCR transgenic T cells of the invention will target the pathogenic autoimmune T cells.

5 According to these aspects, the human T-cell is a chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell or a T cell receptor (TCR) transgenic T cell. Depending on the therapeutic use, the CAR-T cell or TCR transgenic T cell is specific for an auto-antibody, or a pathogenic auto-immune T-cell. In these aspects, the transgene stimulates efficacy of cellular immunotherapy with said CAR-T cell or transgenic TCR T cell, or curbs toxicity induced by said CAR-T cell or transgenic TCR T cell. In particular, the transgene prevents CAR-T cell
10 exhaustion or transgenic TCR T cell exhaustion.

In some embodiments, the cellular immunotherapy is for controlling allograft rejection of solid transplant.

15 Furthermore, cell therapy with ex vivo–expanded autologous Tregs is one of the most promising approaches to regulate alloimmunity and reduce immunosuppression. Preclinical studies have shown that the potency of Treg therapy can be markedly enhanced by the use of Tregs specific for donor alloantigens (i.e. donor-specific (ds) Tregs). The CAR-Treg technology was used to generate dsCAR-Tregs, and these cells were found to suppress humoral immunity, and delay allograft rejection in unsensitized, immunocompetent recipients (Sicard et al., Am J Transplant. 2020;20:1562–1573). Accordingly, in some
20 embodiments, the cellular immunotherapy is for controlling allograft rejection with human CAR-T cells or TCR transgenic T cells according to the invention that are specific for donor alloantigen(s). In some aspects, the transgene extends lifespan of said donor specific CAR-T cell or donor specific transgenic TCR T cell, and in particular prevents dsCAR-T cell
25 exhaustion or transgenic dsTCR T cell exhaustion, as already described above.

Method of preparing NUTRIREG T cell or NK cell

It is provided a method of preparing a human T cell or NK cell according to the invention, wherein a human T cell or NK cell is transfected or transduced with a vector
30 comprising a nucleic acid construct which comprises:

- i) a regulatory polynucleotide comprising a minimal promoter and at least one AARE (amino acid response element) nucleic acid sequence, said regulatory polynucleotide being activated in a subject upon consumption of a diet deficient in at least one essential amino acid; and
- 35 ii) a transgene which is placed under the control of the said regulatory polynucleotide.

The vector be a synthetic vector (cationic lipids, polymer liposomes, etc.), a plasmid, or a viral vector.

5 If desired, it may be combined with one or more substances that improve the vector's transfection efficacy and/or stability. These substances are widely documented in the literature available to a person skilled in the art (see, e.g., Felgner et al., 1987, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115-121; Hodgson and Solaiman, 1996, Nature Biotechnology 14, 339-342; Remy et al., 1994, Bioconjugate Chemistry 5, 647-654). By way of non limiting illustration, they may be polymers, cationic lipids, liposomes, nuclear proteins, or neutral lipids. These substances may be used alone or in combination. One possible combination is a recombinant plasmid vector combined with cationic lipids (DOGS, DC-CHOL, spermine-
10 chol, spermidine-chol, etc.) and neutral lipids (DOPE).

A wide selection of plasmids can be used in the context of the present invention. They may be cloning and/or expression vectors. In general, they are known in the art, and a number of them are commercially available, but it is also possible to construct or modify
15 them using genetic manipulation techniques. By way of examples, we may mention the plasmids derived from pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagene), pREP4, pCEP4 (Invitrogene), or p Poly (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201). Preferably, a plasmid implemented in the present invention contains a replication origin that ensures the start of replication in a producer cell and/or a host cell (for example, the ColEI origin will
20 be used for a plasmid to be produced in E. coli, and the oriP/EBNA1 system will be used if it is to be self-replicative in a mammal host cell, Lupton and Levine, 1985, Mol. Cell. Biol. 5, 2533-2542; Yates et al., Nature 313, 812-815). It may also include a selection gene for selecting or identifying the transfected cells (complementation of an auxotrophic mutation, gene coding for resistance to an antibiotic, etc.). It may also include additional elements
25 that improve its maintenance and/or its stability in a given cell.

When a viral vector is involved, it may be a vector derived from an adenovirus, a lentivirus, a retrovirus, an adenovirus-associated virus (AAV), a herpes virus, an alphavirus, a parvovirus, a poxvirus (fowlpox, canarypox, vaccinia viruses, in particular of the MVA (Modified Virus Ankara) or Copenhagen strains, etc.) or a foamy virus. Preferably, a non
30 replicative and, optionally, non integrative vector is used. Retroviruses have the property of infecting and becoming predominantly integrated into dividing cells and are therefore especially well-suited to an application in anticancer therapy. A suitable retroviral vector for the implementation of the present invention comprises LTR (Long Terminal Repeat) terminal sequences and an encapsidation region. It may derive from a retrovirus of any
35 origin (murine, primate, feline, human, etc.) and, in particular, may derive from a retrovirus selected from the group including MoMuLV (Moloney Murine Leukemia Virus), MVS (Murine

Sarcoma Virus), or Friend Murine Retrovirus (Fb29). It is propagated in an encapsidation line that is able to provide in trans the gag, pol, and/or env viral polypeptides needed for the constitution of a viral particle. These types of lines are described in the literature (PA317, Psi CRIP GP+Am-12, etc.). The retroviral vector of the invention may comprise
 5 modifications, in particular at the LTRs (replacement of the promoter region by a eukaryote promoter) or at the encapsidation region (replacement by a heterologous encapsidation region, e.g., of the VL30 type).

In a preferred embodiment of the invention, the vector is a lentiviral vector, an adenoviral vector, or a vector derived from an adenovirus-associated virus (AAV).

10 According to an advantageous embodiment, the viral vector used according to the invention may be in the form of a DNA vector or of an infectious viral particle.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples.

15 **FIGURES**

Figure 1 : General principle of NUTRIREG.

Figure 2: Conditions of inducibility of a target gene (TRB3) on the GCN2-ATF4 pathway in human T cells following an EAA starvation.

20 Figure 3: Induction of the expression of the luciferase transgene under the control of NUTRIREG. NT cells: non-transduced cells; LT AARE-TK-LUC: T cells transduced with the 2xAARE-TK-LUC construct.

Figure 4: Induction of the expression of the GFP transgene under the control of NUTRIREG. NT cells: non-transduced cells; LT AARE-TK-eGFP: T cells transduced with the 2xAARE-TK-eGFP construct.

25 Figure 5: Co-expression analyzes of T cells and eGFP protein activation markers in flow cytometry.

Figure 6: Principle of the use of NUTRIREG to induce the expression of IL-10 in T cells.

30 Figure 7: Induction of mRNA (A) and protein (B) expression of the IL-10 transgene under the control of NUTRIREG. NT cells: non-transduced cells; LT AARE-BG-IL10: T cells transduced with the 2xAARE-BG-IL10 construct.

Figure 8: Reversibility of NUTRIREG-mediated induction of IL-10 transgene mRNA (A) and protein (B) expression.

35 Figure 9: Effect of NUTRIREG-dependent IL-10 expression on mRNA expression of cytokines characteristics of type 1 regulatory T cells (Tr1).

EXAMPLES

Example 1: Validation of GCN2-ATF4 pathway inducibility in human T cells following an EAA starvation (Figure 2)

In order to subsequently be able to use NUTRIREG in human T cells, we first validated that the GCN2-ATF4 pathway is inducible by an EAA starvation in this cell type. Data from the literature previously highlighted the activation of this signaling pathway in mice T cells in response to IDO (Indoleamine 2,3-Dioxygenase), halofuginone, or asparaginase (Munn et al., *Immunity* 2005, Vol. 22, 633–642; Van de Velde et al., *Cell reports* 17.9 (2016): 2247-2258; Sundrud et al., *Science* 324.5932 (2009): 1334-1338. ; Bunpo et al., *Journal of Nutrition* 2010, 140, 2020-2027), but only a few data was available on GCN2-ATF4 pathway activation in response to AA deficiency in human T cells.

We have thus carried out in vitro experiments with human T cells purified from “buffy coat” from the French Blood Establishment, intended for research. We cultured these cells in control medium or in leucine-deficient medium.

We demonstrated that (Figure 2):

(1) The expression of a known target gene (TRB3) of the GCN2-ATF4 pathway can be significantly induced by a 6h EAA starvation (leucine or any other EAA) in T cells.

(2) The induction of the GCN2-ATF4 pathway by a short-time leucine starvation is rapidly reversible in T cells, from 16 hours after the addition of leucine in the starved medium.

(3) Importantly, the activation of T cells (by anti-CD3 and CD28 antibodies, in the presence of IL-2) is essential for the induction of the GCN2-ATF4 pathway in response to EAA starvation. The fact that the activation of the T lymphocyte is essential for the activation of GCN2 kinase, had been described in mice T cells following culture in a tryptophan-deficient medium.(Munn et al., *Immunity* 2005, Vol. 22, 633–642; Van de Velde et al., *Cell reports* 17.9 (2016): 2247-2258), but no information was available for human T lymphocytes.

(4) The induction of the expression of TRB3, a target gene of the GCN2-ATF4 pathway, in response to a short-time leucine starvation is fully dependent on the GCN2 kinase; this was demonstrated via the use of a pharmacological inhibitor of GCN2.

Example 2: Validation of NUTRIREG functionality in human T cells with the luciferase reporter gene (Figure 3).

We then assessed the functionality of NUTRIREG in human T cells using two reporter genes. The first reporter gene used was the luciferase gene, inserted into a 2xARE-TK-LUC construct and transduced through a lentiviral vector. Transduction was performed 24

hours after activation of T cells by magnetic beads loaded with anti-CD2/CD3/CD28 antibodies, in the presence of IL-2. The cells were then deprived of leucine 8 days after their activation, followed by a measurement of the luciferase activity.

We thus demonstrated that a 16h leucine starvation does indeed induce the expression of the luciferase transgene via NUTRIREG in T cells, in comparison to (i) the transduced T cells cultured in a control medium, and (ii) the non-transduced T cells deprived for leucine for 16 hours. This induction is detectable from 3 hours of leucine deficiency with an increase in the expression of the transgene when the duration of the EAA deficiency increases (6h, 9h) (Figure 3).

Example 3: Validation of NUTRIREG functionality in human T cells in vitro with the eGFP reporter gene (Figures 4-5).

The second reporter gene evaluated was the eGFP gene, inserted into a 2xAARE-TK-eGFP construct and transduced through a lentiviral vector. Transduction was performed 24 hours after activation of T lymphocytes by magnetic beads loaded with anti-CD2/CD3/CD28 antibodies, in the presence of IL-2. The cells were then deprived of leucine 8 days after their activation, with measurement of the fluorescence emitted by the eGFP protein by flow cytometry.

We demonstrated that a 16h leucine starvation does indeed induce the expression of the eGFP transgene via NUTRIREG in T cells, in comparison to (i) the transduced T cells cultured in a control medium, and (ii) the non-transduced T cells deprived for leucine for 16 hours. This induction is not possible on shorter leucine starved times, probably due to a problem of stability of the eGFP protein (Figure 4).

In addition, analyzes of the co-expression of T cells activation markers (CD69 as early activation marker and CD25 as later activation marker) and of the eGFP protein in flow cytometry enabled us to confirm the key role of T cells activation to induce the expression of the transgene under the control of NUTRIREG. Indeed, the non-activated cells (CD25⁻ CD69⁻) do not express eGFP, those moderately activated (CD69⁻ CD25⁺ or CD69⁺ CD25⁻) express it weakly, and the strongly activated cells (CD69⁺ CD25⁺) are those which express the most eGFP protein (Figure 5).

Example 4: NUTRIREG-T cells application with the Interleukin-10 (IL-10) therapeutic gene (Figures 6-9).

With the aim of using the NUTRIREG technology for therapeutic purposes in a model of treatment or prevention of GvHD (Graft versus Host disease), we designed a 2xAARE-BG-IL10 construct in which is inserted the Interleukin-10 (IL-10) cDNA placed downstream

the minimum Beta-globin (BG) promoter and the 2XAARE sequence (Figure 6). Indeed, it has been demonstrated in the literature that the transduction of T cells with an IL-10 lentivirus allows to (i) direct the immune response towards a Tr1 type anti-inflammatory response (T regulatory type 1) and (ii) prevent the appearance of GvHD in mouse models (Andolfi et al., *Molecular Therapy* 2012, vol. 20, 1778-1790; Locafaro et al., *Molecular Therapy* 25.10 (2017): 2254-2269).

There are also early phase human clinical trials aimed at directing the immune response towards a Tr1 phenotype for the purpose of preventing GvHD. To this end, donor T cells are made anergic towards host cells by culturing these donor T cells with host CD3-depleted mononuclear cells (PBMC), in the presence of IL-10. Anergic T cells are then re injected to the recipient a few weeks after the allogeneic hematopoietic stem cell transplant (Bacchetta et al., *Frontiers in immunology* 5 (2014): 16.). These type 1 regulatory T cells (Tr1) have a specific cytokine profile since they strongly express IL-10, and to a lesser extent TGF β , GZMb, IFN γ and IL-22. On the other hand, they do not express IL-2, IL4 and IL17, nor the FoxP3 transcription factor (Gregori et al., *Frontiers in immunology* 6 (2015): 593.).

In our experiments, transduction with the lentivirus carrying the 2xAARE-BG-IL-10 construct was carried out 24 hours after the activation of the T cells by magnetic beads loaded with anti-CD2/CD3/CD28 antibodies, in the presence of IL-2. The cells were then deprived of leucine 8 days after their activation, with measurement of the expression of (i) the IL-10 mRNA by RT-qPCR, (ii) the IL-10 protein by ELISA or flow cytometry, and (iii) the different cytokines of the Tr1 phenotype by RT-qPCR (Figure 6).

We have thus demonstrated that a 16h leucine starvation does indeed induce the mRNA and protein expression of the IL-10 transgene via NUTRIREG, in comparison to (i) the transduced T cells cultured in control medium, and (ii) the non-transduced T cells starved for leucine (Figure 7A-B).

We also checked that the addition of leucine in the culture medium following the starvation indeed stop the transgene expression in the transduced T cells, at 24 h for the expression of mRNA and at 48 h for the expression of the IL-10 protein (Figure 8A-B).

Finally, we were able to show that a transient expression of the IL-10 transgene via NUTRIREG allows to direct the immune response towards a Tr1 type response as shown by the cytokine and transcription factors profile (mRNA) : IL-10⁺⁺ GZMb⁺ IL22⁺ IFN γ ⁺ FoxP3⁻ IL4⁻ (Figure 9).

CLAIMS

1. A human T cell or NK cell comprising a nucleic acid construct which comprises:

5 i) a regulatory polynucleotide comprising a minimal promoter and at least one AARE (amino acid response element) nucleic acid sequence, said regulatory polynucleotide being activated in a subject upon consumption of a diet deficient in at least one essential amino acid; and

10 ii) a transgene which is placed under the control of the said regulatory polynucleotide.

2. The human T cell or NK cell according to claim 1, which is a human T cell and wherein the human T-cell is a chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell or a T cell receptor (TCR) transgenic T cell.

15 3. The T cell or NK cell according to claim 1, which is a human NK cell or a human CAR-NK cell.

4. The human T cell or NK cell according to claim 2 or 3, wherein the transgene stimulates efficacy of cellular immunotherapy with said CAR-T cell, transgenic TCR T cell, 20 NK cell or CAR-NK cell, or the transgene curbs toxicity induced by said CAR-T cell or transgenic TCR T cell.

5. The human T cell or NK cell according to claim 2 or 4, which is a human CAR-T cell or transgenic TCR T cell and wherein the transgene reverses or delays CAR-T 25 cell exhaustion or transgenic TCR T cell exhaustion, or encodes an inhibitory receptor or immunosuppressive factor.

6. The human T cell or NK cell according to claim 1, which is a human T-cell intended for allogeneic transplantation or for controlling allograft rejection of solid transplant.

30 7. The human T cell according to claim 6, wherein the transgene promotes human T cell differentiation into regulatory T cells (Treg or Tr1).

8. The human T cell according to claim 6, wherein the human T-cell is intended 35 for allogeneic transplantation and the transgene stimulates efficacy of cellular immunotherapy with said human T-cell.

9. The human T cell or NK cell according to any one of claims 1-8, wherein:

5 a) the amino acid response element (AARE) nucleic acid sequence is selected in a group consisting of sequences SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 and SEQ ID NO: 5; and/or

b) the regulatory polynucleotide comprises at least two AARE nucleic acid sequences.

10 10. The human T cell or NK cell according to any one of claims 1-9, for use for cellular immunotherapy.

11. The human T cell or NK cell for use according to claim 10, wherein the cellular immunotherapy is for treating cancer, for controlling allograft rejection of solid transplant, or for treating an auto-immune disease.

15 12. The human T cell or NK cell for use according to claim 10 or 11, wherein the human T cell or NK cell is as defined in any one of claims 1-9 and is for use for treating cancer.

20 13. The human T cell or NK cell for use according to claim 10 or 11, which is a human T cell is for use for treatment of a hematologic cancer by allogeneic transplantation, or for controlling allograft rejection of solid transplant, and the human T cell is as defined in any one of claims 5-9.

25 14. The human T cell or NK cell for use according to claim 12 or 13, which is a human T cell for use for treatment of a hematologic cancer by allogeneic transplantation, and wherein expression of the transgene promotes human T cell differentiation into Treg or Tr1 prevents or treats graft versus host disease (GvHD), or expression of the transgene stimulates efficacy of cellular immunotherapy with said human T-cell induces or stimulates
30 graft versus leukemia (GvL) effect.

15. The human T cell or NK cell for use according to claim 10, 11 or 13, which is a human CAR-Treg for use for controlling allograft rejection of solid transplant, or for treating an auto-immune disease.

35 16. The human T cell or NK cell for use according to any one of claims 10 to 15, wherein the individual administered with the T cell or NK cell further receives a diet deficient

in at least one essential amino acid to induce transgene expression in human T cells or NK cells that are activated.

5 17. A method of preparing a human T cell or NK cell as defined in any one of claims 1 to 9, wherein a human T cell or NK cell is transfected or transduced with a vector comprising a nucleic acid construct which comprises:

10 i) a regulatory polynucleotide comprising a minimal promoter and at least one AARE (amino acid response element) nucleic acid sequence, said regulatory polynucleotide being activated in a subject upon consumption of a diet deficient in at least one essential amino acid; and

 ii) a transgene which is placed under the control of the said regulatory polynucleotide.

**CONTROLLED EXPRESSION OF A TRANSGENE IN HUMAN T OR NK CELLS FOR
USE IN CELLULAR IMMUNOTHERAPY**

ABSTRACT

The present invention concerns a human T cell or NK cell comprising a nucleic acid construct which comprises a transgene which is placed under the control of a regulatory polynucleotide inducible by a deficiency in at least one essential amino acid, and cellular immunotherapy employing said human T cell or NK cell.

Figure: none

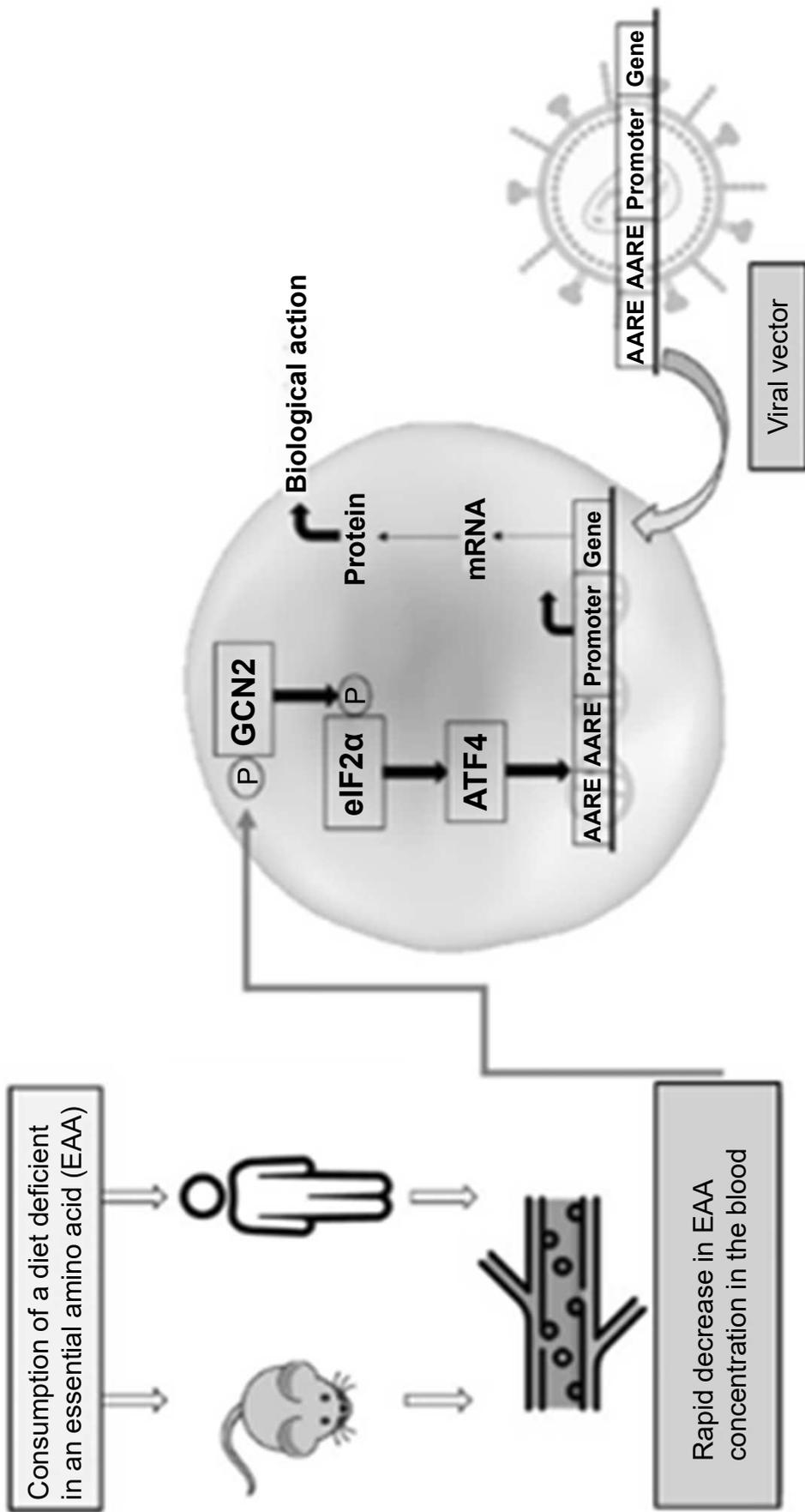


FIG.1

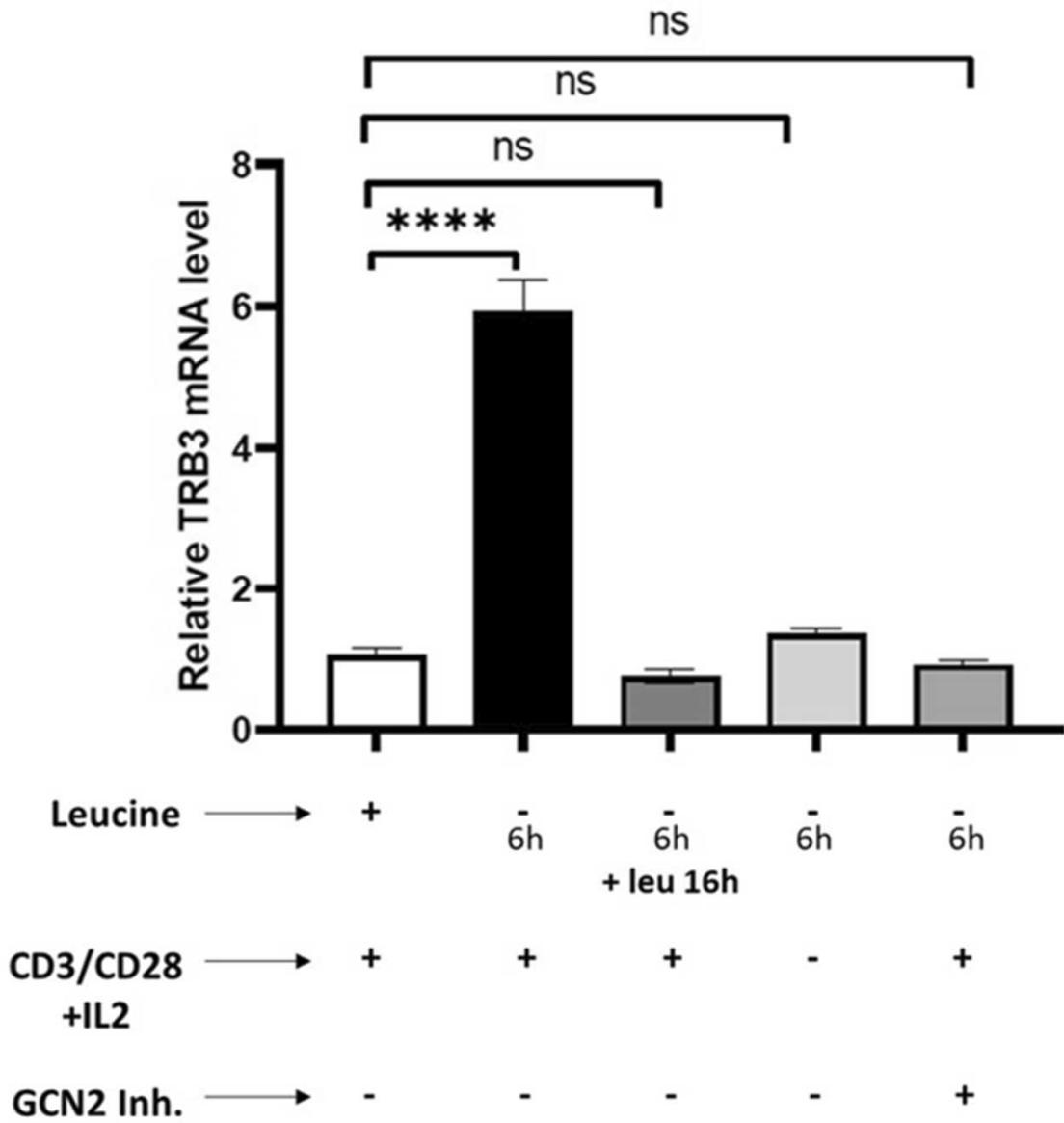


FIG.2

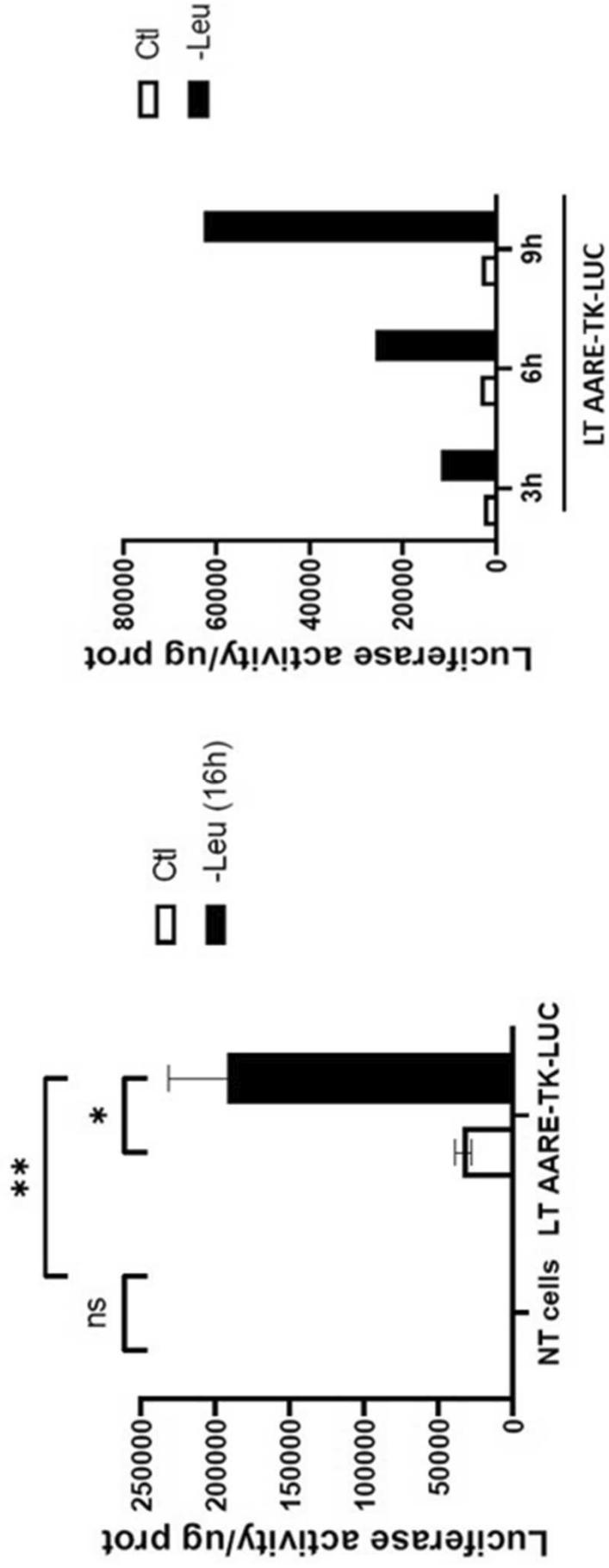


FIG.3

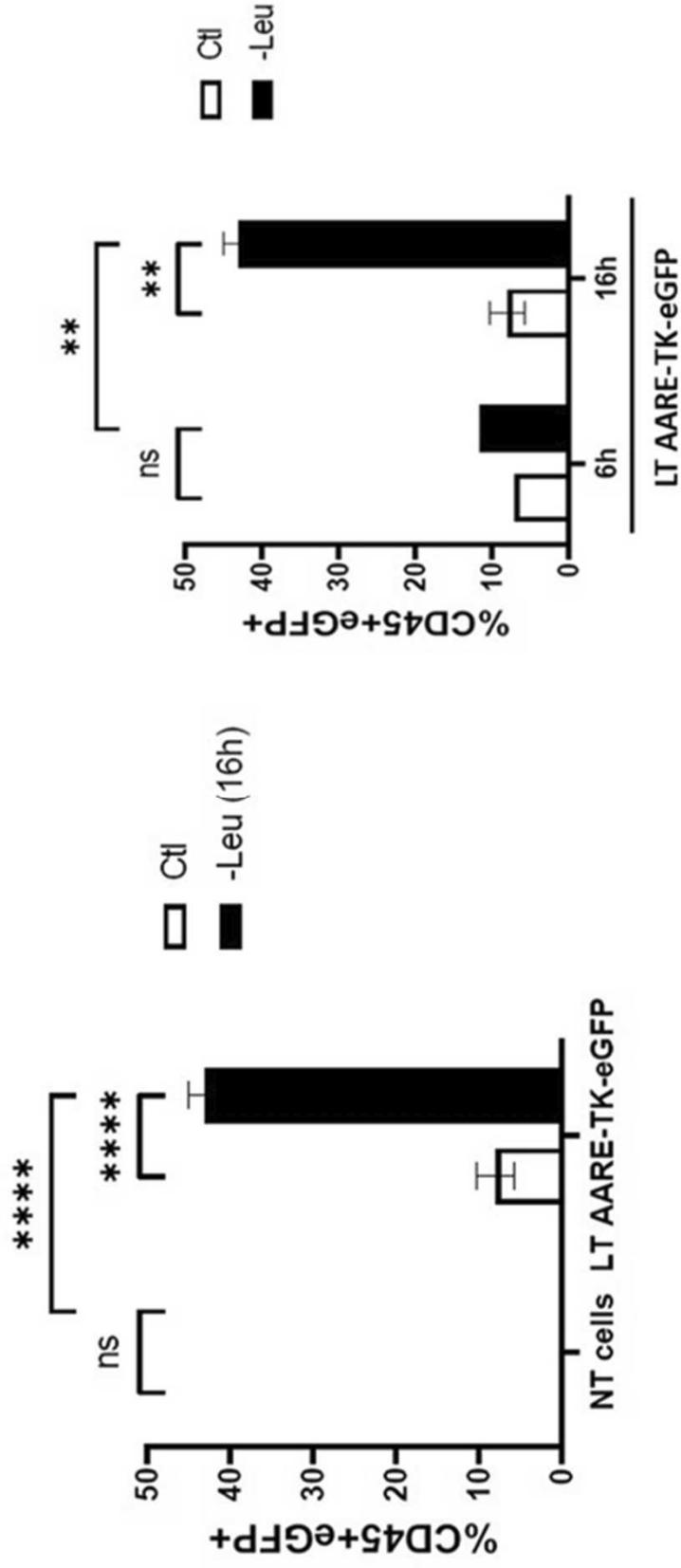


FIG.4

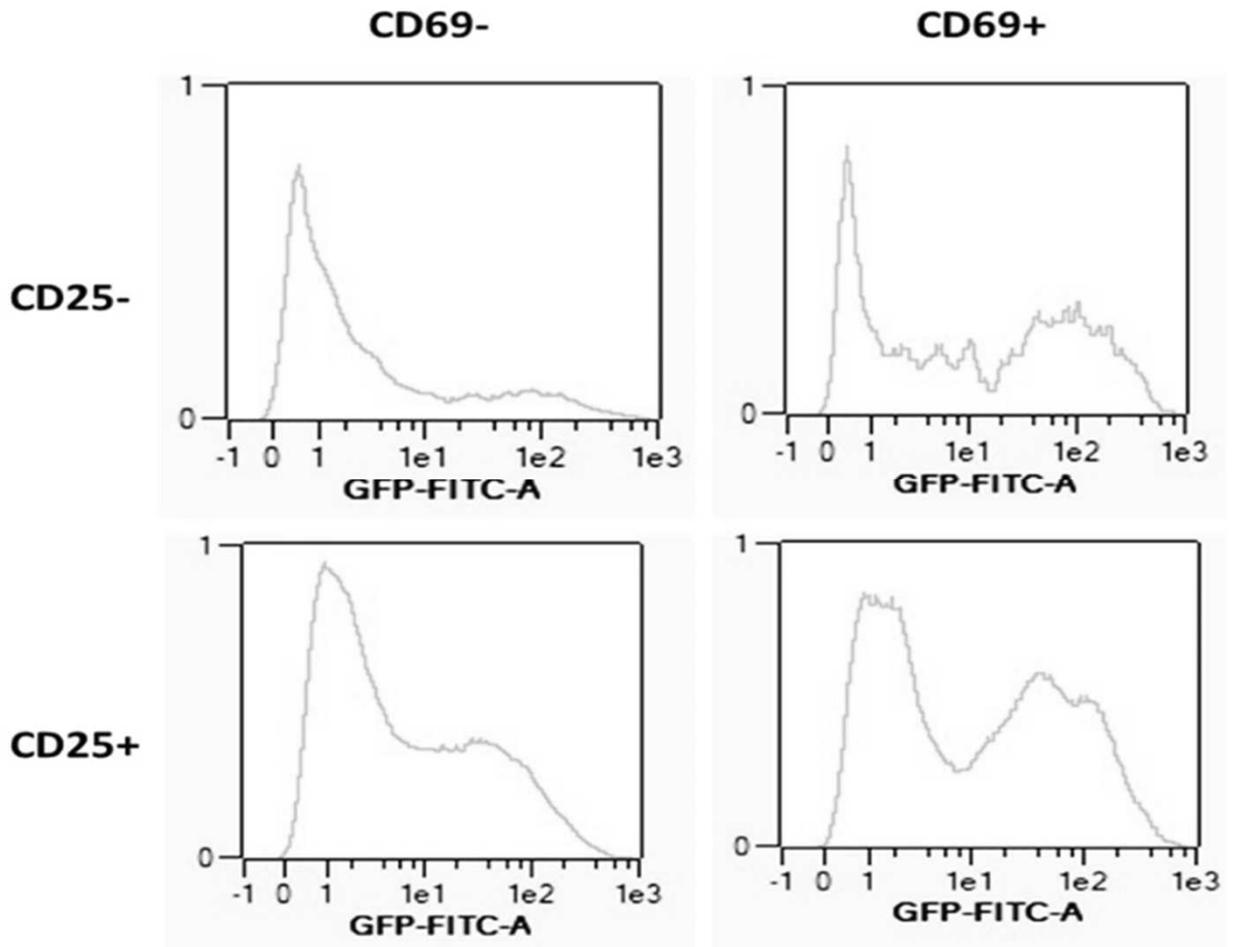


FIG.5

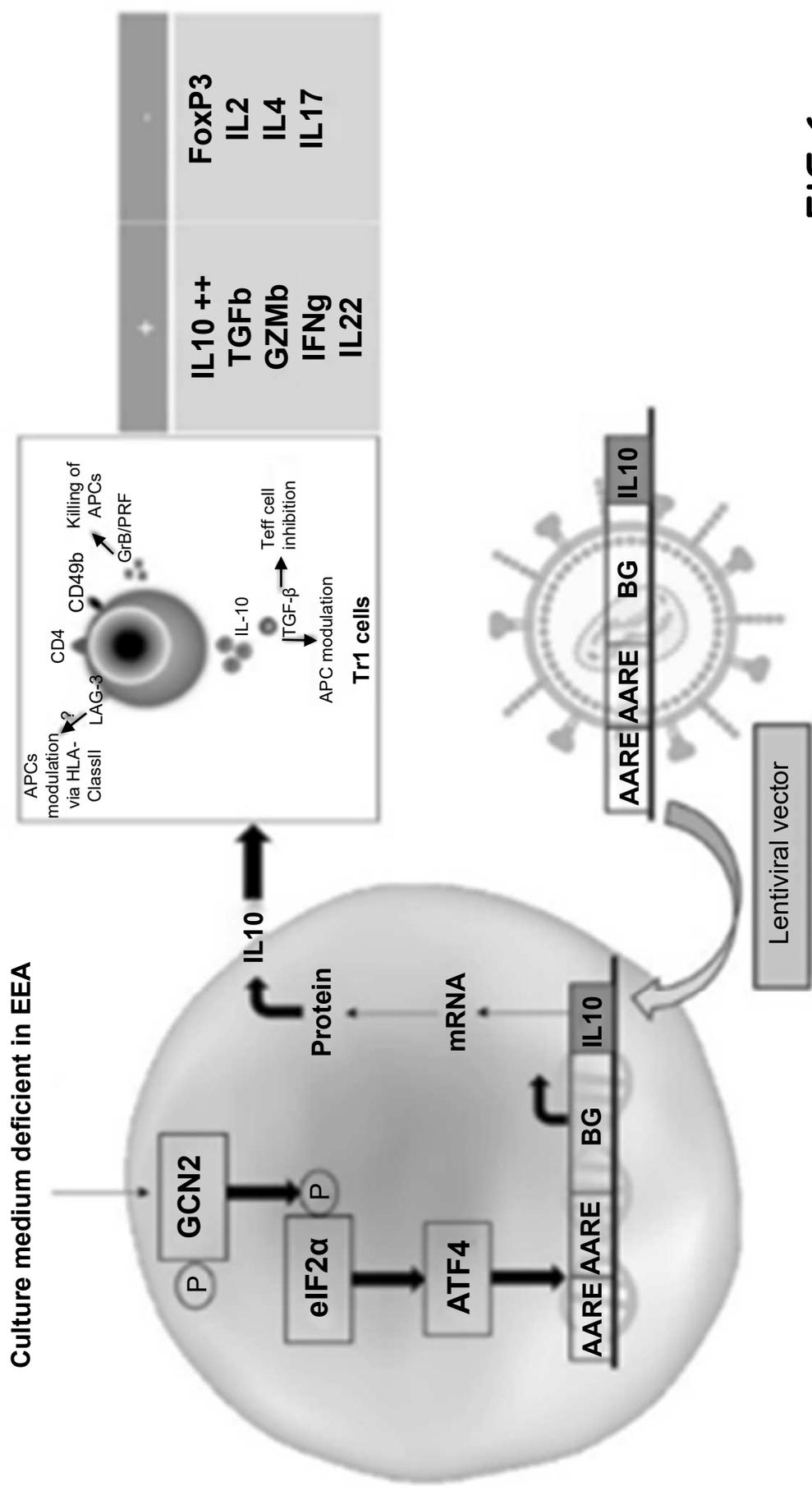


FIG.6

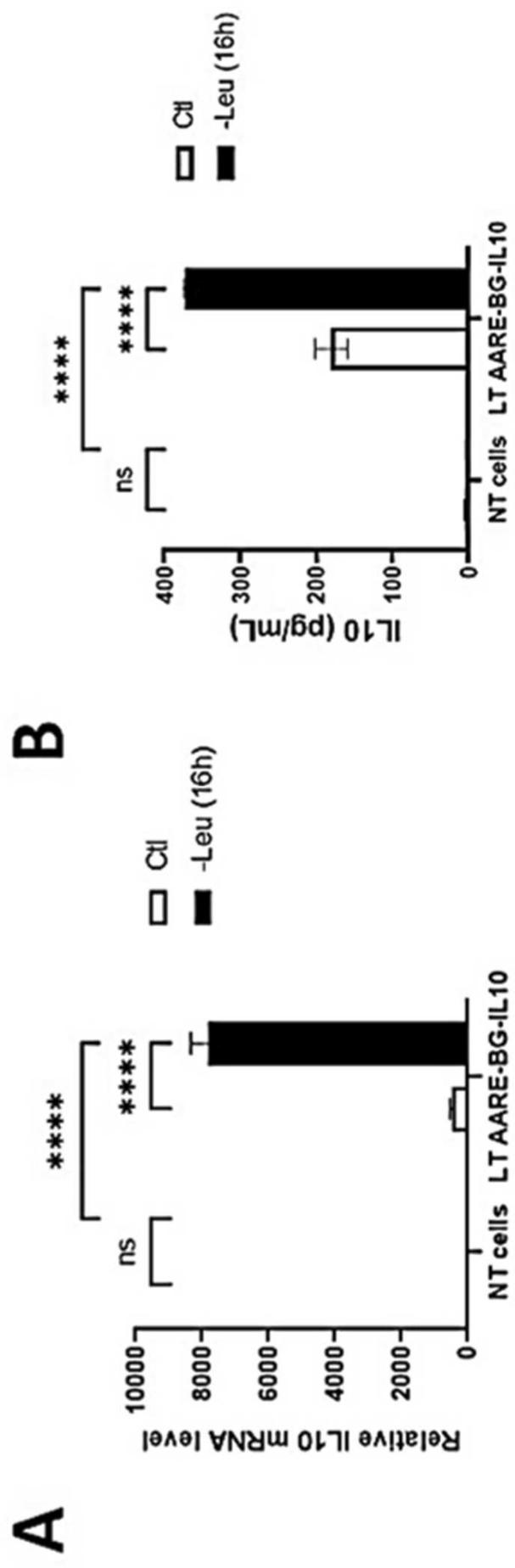


FIG. 7

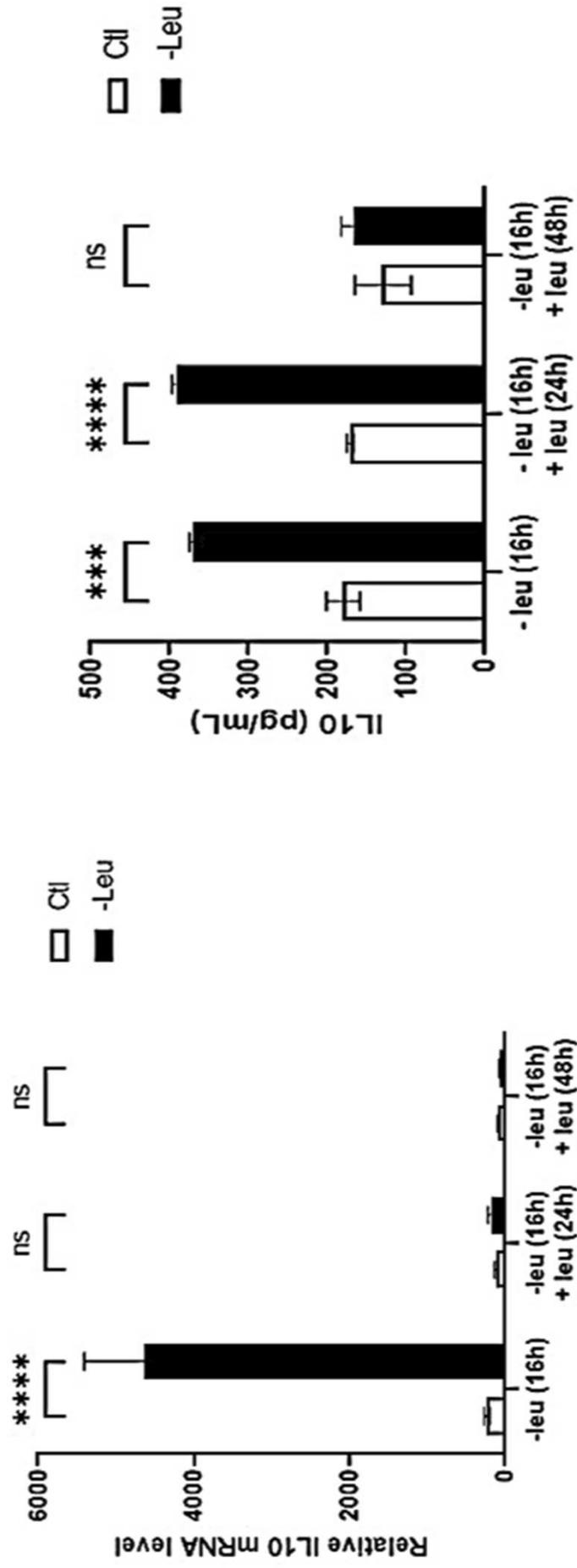


FIG.8

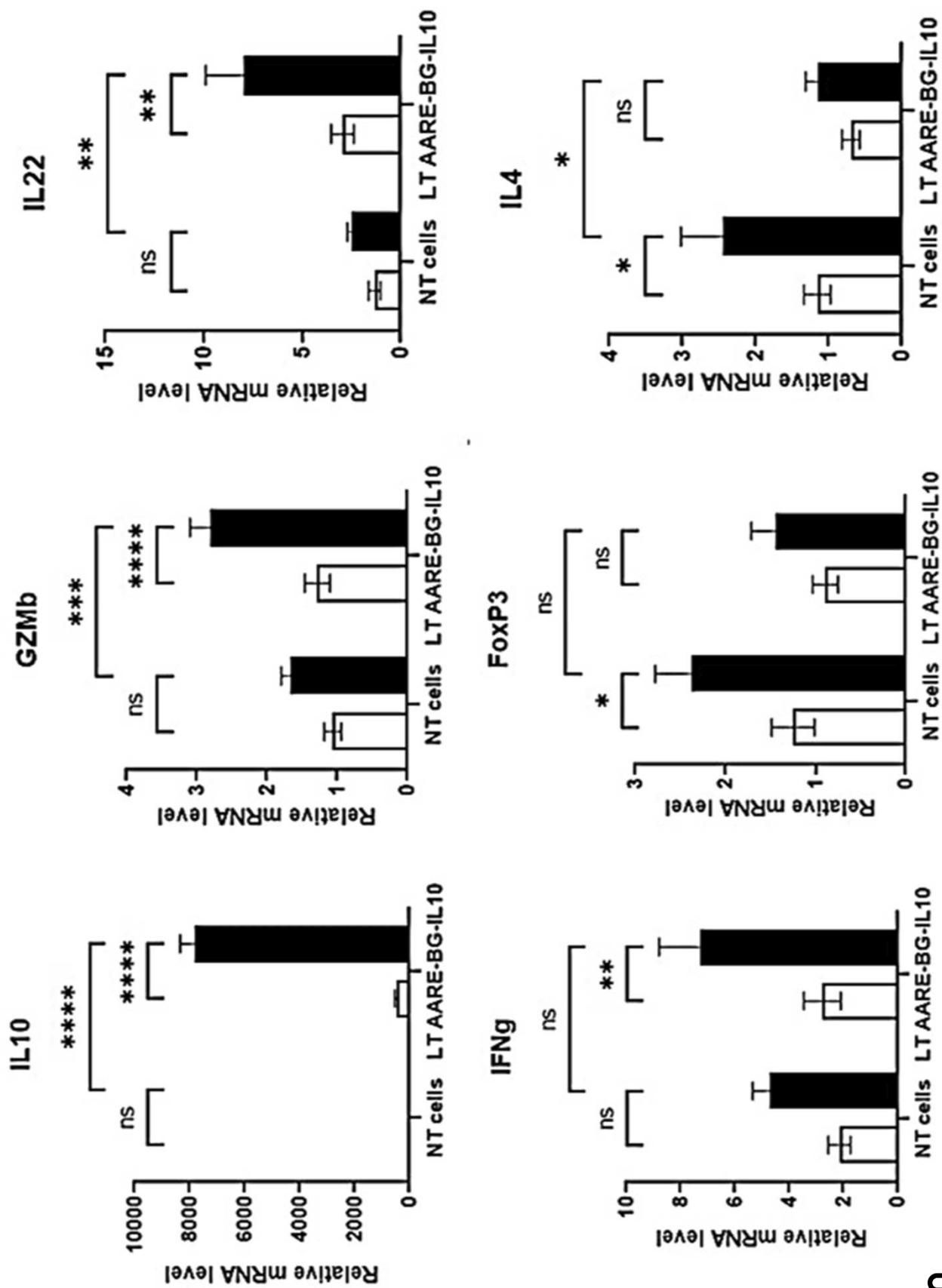


FIG.9

RESUME : L'immunothérapie cellulaire est actuellement en pleine expansion en oncologie, comprenant par exemple l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ou encore l'injection de cellules CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor-T*), plus récemment introduite. Ces deux stratégies de thérapie cellulaire sont certes efficaces, mais il existe à ce jour de nombreuses difficultés pour contrôler les cellules une fois réinjectées au malade, soit pour majorer leur action thérapeutique, soit pour limiter leur toxicité. Nous nous sommes ainsi intéressés à la technologie NUTRIREG, qui utilise les propriétés de la voie de signalisation GCN2-ATF4 pour induire l'expression transitoire d'un transgène suite à la consommation d'un régime carencé en un Acide Aminé Indispensable (AAI). Les objectifs de ce travail étaient (i) de décrire les conditions optimales d'activation de la voie GCN2-ATF4 par une carence en un AAI dans les Lymphocytes T (LT) humains, puis (ii) d'établir une preuve de concept *in vitro* de la fonctionnalité de NUTRIREG dans ce type cellulaire, et enfin (iii) d'évaluer la fonctionnalité de cette technologie innovante dans des LT humains injectés chez la souris. Nous avons ainsi démontré que la voie GCN2-ATF4 peut être induite par une carence en AAI, dès 4 heures de carence, et ce quel que soit l'AAI manquant. Cette induction de la voie nécessite cependant que le LT soit activé. Nous avons ensuite démontré qu'il est possible de contrôler l'expression d'un gène rapporteur ou d'un gène à orientation thérapeutique tel que l'IL-10 dans des LT humains *in vitro*, permettant pour ce dernier d'orienter la différenciation du LT vers un phénotype régulateur Tr1. Enfin, nous avons démontré qu'il est possible d'induire l'expression du transgène IL-10 sous la dépendance de NUTRIREG dans des LT humains injectés à des souris immunodéficientes. Ces premières preuves de concept de la fonctionnalité de la technologie NUTRIREG dans les lymphocytes T humains ouvrent la voie vers de nombreuses stratégies préventives ou curatives dans le domaine de l'immunothérapie cellulaire.

Mots clés : Immunothérapie cellulaire, allo-CSH, expression transitoire d'un transgène, voie GCN2-ATF4, carence en acides aminés indispensables, IL-10, GvH, CAR-T

ABSTRACT: Cellular immunotherapy is currently expanding in oncology, including allogeneic stem cell transplantation or more recently CAR-T (Chimeric Antigen Receptor-T) cells therapy. These two strategies are effective, but there are many difficulties to date in controlling the cells once re injected into the patient, either to increase their therapeutic action or to limit their toxicity. In this context, we have deepened the use of the NUTRIREG technology, that exploits the physiological GCN2-ATF4 signaling pathway to induce a transgene transient expression after the consumption of a diet deficient in an Essential Amino Acid (EAA). The objectives of this work were (i) to describe the optimal conditions for induction of the GCN2-ATF4 pathway in response to a deprivation of an EAA in human T cells, (ii) to establish an *in vitro* proof of concept of the functionality of NUTRIREG in this cell type, and (iii) to evaluate the functionality of this innovative technology in human T cells injected in mice. We demonstrated that GCN2-ATF4 pathway can be induced by EAA deprivation, as early as 4 hours after deprivation, regardless of the missing EAA. However, this induction requires T cell activation. We then demonstrated that it is possible to control *in vitro* the expression of a reporter gene or a gene of therapeutic interest such as IL-10 in human T cells, this latter being able to shape the T cell differentiation towards a Tr1 regulatory phenotype. Finally, we demonstrated that it is possible to induce the expression of the IL-10 transgene under the dependence of NUTRIREG in human T cells injected to immunodeficient mice. These first proofs of concept of the functionality of the NUTRIREG technology in human T cells open the way to numerous preventive or curative strategies in the field of cellular immunotherapy.

Key words : cellular immunotherapy, allo-HSCT, transient expression of a transgene, GCN2-ATF4 pathway, essential amino acid deficiency, IL-10, GvH, CAR-T cells