



HAL
open science

Etude de l'effet des lignes de traitement sur l'activité des CAR T dans le myélome multiple

Audrey Abecassis

► **To cite this version:**

Audrey Abecassis. Etude de l'effet des lignes de traitement sur l'activité des CAR T dans le myélome multiple. Hématologie. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP7308 . tel-04093729

HAL Id: tel-04093729

<https://theses.hal.science/tel-04093729>

Submitted on 10 May 2023

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

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

Université de Paris

Ecole doctorale 561 : Hématologie Oncogénèse et Biothérapie

**Laboratoire U976 équipe 5 : Différenciation lymphocytaire et
désordres lymphoïdes**

Etude de l'effet des lignes de traitement sur l'activité des CAR T dans le Myélome Multiple

Par Audrey ABECASSIS

Thèse de doctorat
Spécialité Hématologie

Dirigée par le Dr. Jean-Christophe BORIES

Présentée et soutenue publiquement le 08 Mars 2021

Devant un jury composé de :

Pr. Stéphanie Nguyen-Quoc	PU-PH, Sorbonne Université, rapporteur
Dr. Salomon Manier	MCU-PH, Université de Lille, rapporteur
Pr. Jérôme Larghero	PU-PH, Université de Paris, examinateur
Pr. Danièle Bensoussan	PU-PH, Université de Nancy, examinateur
Dr. Jill Core	PU-PH, Université de Toulouse, examinateur
Dr. Mike Burbridge	Encadrant industriel, Laboratoire Servier
Dr. Jean-Christophe Bories	DR Inserm, Université de Paris, directeur de thèse

Résumé

Le Myélome Multiple (MM) est une hémopathie maligne qui touche environ 5000 nouveaux patients par an en France. Les traitements de référence associant les Immunomodulateurs, les inhibiteurs du Protéasome et plus récemment les anticorps monoclonaux comme le Daratumumab (Anti-CD38), ont permis une amélioration de la prise en charge des malades. Cependant, le MM reste à ce jour incurable, avec un taux de survie de 50% à 5 ans, nécessitant l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi elles, l'utilisation de lymphocytes T (LyT) autologues exprimant un récepteur antigénique chimérique (CAR-T), permettant la reconnaissance et l'élimination de cellules cancéreuses exprimant un antigène choisi, a été validée dans différentes hémopathies lymphoïdes en ciblant l'antigène CD19. Dans le MM, les CAR-T ciblant le *B Cell Maturation Antigen* (BCMA) induisent de bonnes réponses chez des patients ayant reçu plusieurs lignes de chimiothérapie. Mais la rémission reste limitée et les malades rechutent dans l'année, ce qui contraste avec ce qui a été observé pour les CAR-T CD19. Ces résultats laissent penser que les traitements de première ligne, administrés aux patients du MM, pourraient impacter l'efficacité de la thérapie par CAR-T. Dans ce travail, nous proposons une caractérisation phénotypique des T de patients au diagnostic (n=26), en rechute de chimiothérapie (n=23), sous Daratumumab (n=30) mais également en rechute de Daratumumab (n=10). Par ailleurs, nous avons transduit ces cellules avec des CAR anti-CS1 et anti-BCMA, surexprimés sur les plasmocytes tumoraux, afin d'étudier leurs propriétés fonctionnelles (n=10). Nos résultats montrent que les LyT des patients en rechute présentent des défauts phénotypiques majeurs tels que l'inversion du ratio CD4/CD8, la diminution du phénotype naïf (CD62+CD45RO-), du marqueur lié à l'activation (CD25) et l'augmentation du marqueur d'épuisement (PD1). Ils montrent également *in vitro* que les CAR-T anti-CS1 issus de ces patients ont des capacités prolifératives diminuées en réponse à l'antigène et une capacité lytique antitumorale altérée. Par ailleurs, nous observons également que les capacités fonctionnelles des CAR T produites à partir de cellules de patients traités par Daratumumab sont réactivées. Des résultats similaires sont obtenus avec des CAR-T anti-BCMA, indiquant que les défauts sont indépendants de l'antigène ciblé. Ces données montrent que les cellules T des patients en rechute présentent des caractéristiques d'épuisement pouvant réduire leur capacité thérapeutique. L'ensemble de ces résultats ouvre de nouvelles perspectives dans l'optimisation de la stratégie thérapeutique par CAR T dans le MM.

Mots Clés : Myélome Multiple, CAR T, CS1, BCMA, Rechute, Daratumumab

Abstract

Multiple Myeloma (MM) is the second most important hematologic disorder represented by 5000 new cases each year in France. Standards of care as Immunomodulators, Proteasom inhibitors or more recently monoclonal antibodies like Daratumumab (anti-CD38), allowed an improvement in patient care. Despite these advances, MM still incurable with an overall survival close to 50% at 5 years, needing new strategies. The use of autologous T cells expressing a chimeric receptor (CAR T), targeting CD19⁺ cells, have been validated in the treatment of lymphoid blood diseases like LLA and lymphoma. In MM, CAR T anti-BCMA had good responses on relapsed/refractory patients but still limited, having relapse after 1 year. These results could mean that therapeutic first lines impact CAR T cells efficiency. Here, we propose to characterize T cell phenotype from patients at diagnosis (n=26), at relapse (n=23), under treatment with Daratumumab (n=30) or at relapse after Daratumumab (n=10). We also transduced cells with anti-CS1 and anti-BCMA CARs, overexpressed antigens on tumoral plasma cells, to analyze their functional capacities (n=10). Our results show that T cells from patients at relapse had phenotypic dysfunctions like CD4/CD8 inversion ratio, naïve phenotype decreased (CD62⁺CD45RO⁻), activation marker (CD25) decreased and exhaustion marker (PD1) increased. *In vitro*, they also show that CAR T anti-CS1 from patient at relapse had reduced functional capacities. Furthermore, CAR T cells functions from patient under Daratumumab are revived. Similar results are obtained with CAR T anti-BCMA, showing that there is no relation between dysfunctions and the targeted antigen. Our results indicate that T cells from patient at relapse have exhausted properties, which probably reduce their therapeutic effect. This data opens new horizon on the CAR T cells optimizations for MM treatment.

Keywords : Multiple Myeloma, CAR T, CS1, BCMA, Relapse, Daratumumab

Remerciements

Dans la vie, certaines personnes sont déterminantes dans la trajectoire que nous prenons et je tiens à remercier toutes les personnes qui ont d'une manière ou d'une autre contribué aux décisions que j'ai pu prendre et qui m'ont emmenée jusqu'ici.

Au Docteur **Jean-Christophe Bories**,

De m'avoir accueillie et encadrée au cours de ces trois années de Thèse.

En m'acceptant comme étudiante dans votre unité vous m'avez donné accès à un enrichissement professionnel et personnel inestimable. Avec toute votre discrétion et votre pudeur, merci pour l'affection que vous portez à chacun des membres de votre équipe. Je vous souhaite de concrétiser tous les projets qui vous tiennent à cœur, qu'ils soient en mer ou au labo.

Au Docteur **Mike Burbridge**,

Les mots me manquent pour vous dire à quel point je vous suis reconnaissante de m'avoir fait confiance ce fameux mois de décembre 2015 lorsque vous m'avez permis d'intégrer l'équipe de recherche translationnelle oncologie. Depuis ce jour, vous avez eu à cœur de me manager et de me challenger avec beaucoup de bienveillance et de douceur tout en me poussant au-delà de ce que je pensais être capable de faire. Ce projet de Thèse Cifre vous y avez cru et vous l'avez porté avec moi et je suis très heureuse aujourd'hui de vous faire partager ce travail qui m'a passionné ces trois dernières années. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Au Professeur **Stéphanie Nguyen** et au Docteur **Salomon Manier**,

Je suis extrêmement honorée que vous ayez accepté d'être les rapporteurs de mon travail et de le juger au cours de cette dernière année. J'espère que la lecture de ce manuscrit vous passionnera autant que ce projet m'a passionné.

Aux membres du jury, le Docteur **Jill Core** et le Professeur **Danièle Bensoussan**,

D'avoir accepté de juger mon travail et d'y apporter la lumière de vos connaissances et de vos expertises.

Au Professeur **Jérôme Larghero**,

Je garde en mémoire que c'est grâce à vos conseils que j'ai contacté Jean-Christophe en 2017, alors je suis heureuse de partager avec vous la finalité de ce beau projet.

A l'ensemble de l'équipe clinique : **Stéphanie Harel**, **Camille Villesuzanne**, **Bruno Royer** et tous les internes, qui ont permis que ce travail puisse se concrétiser, en me permettant notamment d'accéder aux prélèvements sanguins. Je tiens tout particulièrement à remercier **Bertrand Arnulf** et **Alexis Talbot** pour leur implication et leur aide.

Aux patients, qui en acceptant de donner un peu d'eux même, participent à l'avancée de la recherche. Je souhaite de tout mon cœur que ce travail contribue à trouver une solution durable pour les patients atteints de Myélome Multiple. Et j'adresse tout mon soutien aux malades du cancer et à leurs familles.

A l'ensemble des membres de la plateforme technologique, **Niclas, Sophie, Christelle, Simon, Antonio et Claire**, qui non seulement nous permettent à tous de nous former et de travailler avec des technologies de pointe, mais qui par leur humanité et leur générosité m'ont permis de partager avec eux des sourires, des conversations sur la science, l'écologie, la vie et qui ont reçu avec toute leur bienveillance mes doutes et mes joies du quotidien.

A Véronique Montcuquet,

La grande gardienne des souris, merci pour ta gentillesse.

A Elisabeth Nelson dite Babeth,

La reine des productions virales et du L3 ! Merci pour tout ce que tu m'as appris en viro et en bactériologie ! Une chose est sûre c'est que le labo ne serait pas aussi vivant sans toi !

A Carolina Martínez-Cingolani,

J'ai pour toi une extrême reconnaissance. Tu as su me donner avec beaucoup de patience, de bienveillance et de gentillesse toutes les clés pour lancer ce magnifique projet. Ton éternelle bonne humeur et ton sourire ont marqué à jamais les cœurs et les mémoires de ceux dont tu as croisé la route sois en assurée. Merci mille fois d'avoir fait de moi un bébé chercheur.

A Caroline Choisy,

Véritable soutien moral de l'équipe, toujours droite, juste, bienveillante, prête à aider dans les coups durs et présente pour les moments heureux. Merci pour ton énergie et ton affection.

A Nathalie Roders,

Ma Nathaloché, « ma post doc », merci pour tout ce que tu m'as apporté dans le professionnel et dans le personnel. Constante dans ton humeur, toujours souriante et d'un dynamisme à toute épreuve ! A très vite j'espère pour un verre à l'apostrophe ou au cabaret !

A Maxime Fayon,

Mon cher CoDoc, voilà trois ans se sont, déjà, écoulés...Merci pour ton accueil, ta bienveillance, pour ces discussions sur le développement personnel, ces brainstormings sur la science, pour ta complicité, bref merci d'avoir été mon binôme ! Je te souhaite le meilleur dans ta nouvelle vie industrielle !

A Lydie Gama,

Ma petite Lydie, la voix de la raison et de la sagesse ! Je n'oublierai pas nos petites discussions sur la vie dans la salle de culture. Je te souhaite une très belle fin de thèse !

A Christelle Freitas,

Ma Chrichri, merci pour ta présence, ton écoute et ta sensibilité qui m'ont touché.

A Antoine David,

Antoooo, quel Plaisir d'avoir partagé ces deux années avec toi au labo... Merci pour ta joie de vivre, ta bonne humeur et ta spontanéité !

A Simone Zocchi,

"Grazie mille" for your energy, I wish you a wonderful thesis

A David Garrick,

It was a pleasure to meet you, thanks a lot for your kindness and all your advices regarding Australia or the thesis. I wish you the best.

A Nana Talvard-Balland,

Ma Nana Bella pour tous ces moments de bonheur partagés. Je te souhaite une magnifique carrière dans la recherche.

A Emna Chabaane,

Emna, toute en réserve et en observation, merci pour ta douceur et ta gentillesse.

A Seydou Keita,

Merci Seysey pour ton « peps ». Je te souhaite de passer une superbe thèse.

A Laetitia,

Ma Laeti, quel plaisir de t'avoir rencontrée, déjà parce que maintenant je découvre que j'ai une sœur jumelle (merci les cheveux bouclés), mais aussi parce qu'on a vécu de super moments ensemble ! (Le sport, le match France-Argentine de Coupe du Monde et cette mémorable beer shower caniculaire et ce fabuleux « second poteau Pavard ! » et tant d'autres...)

Bienvenue à **Cécilia Nakid** et **Fabio Raineri**, je vous souhaite un bel avenir dans les CAR T !

Je tiens également à remercier chaleureusement mes anciens collègues et amis industriels :

A Valérie Cattan,

Merci de m'avoir soutenue dans mes premiers pas dans le translationnel et de m'avoir encouragée à réaliser une thèse de science. Tout ça c'est un peu grâce à toi ! Merci de continuer à veiller sur moi.

A Sandra Dupouy,

Merci de m'avoir lancé dans les CAR T, avec toute ta gentillesse et ta bienveillance.

A Blandine Puvion,

Merci pour ton accueil, ta gentillesse, ta générosité et ta bonne humeur ! Tant de discussions inachevées sur la musique, la vie, l'écologie, le Nord... J'espère à très vite.

A Stéphanie Giraudet,

Merci Stéphanie de ta bienveillance lors de mon passage éclair dans l'équipe.

A Ibtissam Marchiq,

Merci pour tes conseils bienveillants, je les garde précieusement !

A Laura Xuereb,

Merci pour ta gentillesse et ton aide lors de mes questionnements bio statistiques.

Merci à l'ensemble des personnes formidables que j'ai pu rencontrer lors de mon expérience industrielle, et qui ont également participé à leur façon à ma construction personnelle et professionnelle.

Un grand merci à tous les amis qui m'ont soutenue toutes ces années de fac, de travail et de thèse...

A la famille Piou,

Anso, Aude, Amina, Yo, Flo, je crois que vous savez déjà ce que je pense de chacun d'entre vous, mais j'en profite pour vous dire merci une nouvelle fois pour tout votre amour et votre folie. J'ai hâte de voir ce que la vie nous réserve tous ensemble.

Au **club des 5**,

Je suis fière de ce que nous sommes devenus et de cette belle amitié que nous avons su conserver malgré les années. Vous m'avez accompagné depuis si longtemps... Collège, Lycée, Fac, je n'imagine pas la vie sans vous !

Aux **Figous**,

Merci de veiller sur moi, pour votre amour et votre générosité.

A **Flora**,

Toujours là malgré les années qui passent. Tu es un soutien à toute épreuve et une amie formidable, merci pour tout.

A **Fanny et Barbara**,

Mes « girlygirls », merci pour votre présence, vos conseils et votre amour. Sans aucun doute de nombreux week-ends et vacances nous attendent.

A **Caro et Lisa S.**,

Mes Divas préférées, merci d'être là...

A **Camille, Aurélie, Bérengère, Elodie, Lisa B, Manon et Gwen**, tellement de bons moments avec vous... J'espère que cette année sera plus favorable à nos retrouvailles.

Pardonnez-moi si je ne vous cite pas tous, mais sachez, mes chers amis, que je vous ai dans mon cœur.

Je ne peux terminer cette partie sans remercier ma famille :

A mes parents,

La vie n'a pas toujours été simple ces dernières années et malgré toutes les épreuves, nous avançons ensemble, plus soudés que jamais... Merci pour votre présence à mes côtés.

Je vous souhaite d'être profondément heureux et que nous partagions de nombreuses années de bonheur ensemble. Vous avez mon éternelle reconnaissance.

A mes grands-parents,

Les personnes les plus incroyables que je connaisse. Merci pour votre générosité et votre amour. Cette année un peu particulière, vous m'avez étonnée et surtout vous m'avez fait rire.

Merci pour ces merveilleux moments par visio. (Distanciation sociale oblige !)

Je vous aime de tout mon cœur.

A mes tantes et mes oncles,

Qui veillent au bonheur de notre famille. Vous formez les piliers de ma vie...

A mes petits cousins,

Rémy, Nat et Dany, suivez toujours ce que votre cœur vous dit.

Nelson Mandela a dit : « Je ne perds jamais. Soit je gagne, soit j'apprends ».

A mes cousins,

Merci pour le « confinement en famille » qui a su animer cette année de confinement, avec tous ces échanges et moments de vie. Chaque moment avec vous qu'il soit réel ou virtuel est un vrai moment de bonheur.

A Jean-Luc,

Merci de veiller sur ma maman, je la vois s'épanouir à tes côtés et cela me comble de bonheur.

A mes beaux-parents Catherine et Richard,

Merci pour le soutien et l'affection que vous m'offrez avec tellement de gentillesse et de bienveillance.

A Stef, Chris et Flo,

Ma belle-sœur et mes beaux-frères, merci pour votre gentillesse et votre écoute.

A François,

Il est difficile d'exprimer avec des mots tout ce que je ressens pour toi...

Comme tu le dis souvent, la thèse s'immisce beaucoup dans notre vie, et pourtant lorsqu'elle a finalement « débarqué » dans notre salon en mars 2020, tu as montré tellement de patience, de compréhension et de bienveillance... Alors je te dis un immense merci pour ta présence à mes côtés, dans les bons moments, comme dans les moments de doute. Tu as accueilli toutes mes émotions sans les juger et en les illuminant par un simple sourire... J'ai hâte de découvrir ce que la vie nous réserve...

Table des matières

RESUME	2
ABSTRACT	3
REMERCIEMENTS	4
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION	15
PARTIE 1 DEVELOPPEMENT DU SYSTEME LYMPHOÏDE	16
I. Hématopoïèse précoce	16
II. La lignée lymphoïde	17
1. L'Ontogenèse T.....	17
1.1. Différenciation précoce des cellules T.....	17
1.2. Activation et Différenciation T périphérique.....	18
1.3. Régulation de la réponse T.....	21
2. L'Ontogenèse B.....	21
2.1. Différenciation précoce des cellules B.....	21
2.2. Différenciation terminale des cellules B sécrétrices.....	24
2.3. Structure des Immunoglobulines.....	24
III. Classification des hémopathies	25
1. Hémopathies myéloïdes.....	26
2. Hémopathies lymphoïdes B.....	26
PARTIE 2 LE MYELOME MULTIPLE	27
I. Définition	27
II. Epidémiologie	27
III. Facteurs de risques du MM	27
IV. Physiopathologie du MM	28
1. Signes cliniques.....	28
2. Paramètres Biologiques.....	28
2.1. Perte osseuse et hypercalcémie.....	29
2.2. Anémie.....	30
2.3. Insuffisances rénales.....	30
2.4. Infections.....	31
V. Anomalies cytogénétiques	31

1.	Evènements primaires	31
1.1.	Hyper diploïdies	31
1.2.	Non Hyper diploïdies	32
2.	Evènements secondaires	33
2.1.	La Translocation de MYC	33
2.2.	Les altérations chromosomiques	33
VI.	Diagnostic et Classification.....	33
1.	Critères biologiques	34
2.	Critères diagnostic	34
3.	Classification par le Durie-Salmon staging system (DSS)	35
4.	Classification par l'International staging system (ISS)	36
VII.	Traitements du MM.....	37
1.	Les molécules de Chimiothérapies	37
1.1.	Les agents Alkylants	37
1.2.	Les Corticoïdes	38
1.3.	Les Immunomodulateurs (IMiDs)	38
1.4.	Les inhibiteurs de protéasome (IP)	39
1.5.	Les nouvelles classes	39
2.	Stratégie thérapeutique chez les Patients au diagnostic	39
2.1.	Protocole chez les patients de moins de 65 ans éligibles à l'autogreffe	40
2.2.	Protocoles chez les patients de plus de 65 ans inéligibles à l'autogreffe	40
3.	Évaluation de la réponse	41
4.	Stratégie thérapeutique chez les Patients à la rechute	42
PARTIE 3 IMMUNOTHERAPIES ET THERAPIE CELLULAIRE		43
I.	Généralités sur l'Immunothérapie anticancéreuse.....	43
1.	L'immunothérapie passive	43
1.1.	Les Anticorps Monoclonaux	43
1.2.	Les Anticorps Monoclonaux conjugués	44
1.3.	Les Anticorps Bispécifiques	44
2.	L'immunothérapie Active	45
II.	Immunothérapie adoptive et cellules T	45
1.	Transfert adoptif de Cellules T	46
1.1.	Les TILs	46
1.1.	Les TCRs	46
1.2.	Les Récepteurs chimériques des Ly T	46
2.	Les Récepteurs Antigéniques Chimériques (CAR T)	46
2.1.	Structure.....	46
2.2.	Génération.....	47
2.3.	La production des CAR T.....	48
III.	CAR T en Oncohématologie.....	49
1.	CD19, l'antigène de référence	49
1.1.	Kymriah®-Tisagenlecleucel (Novartis)	50
1.2.	Yescarta®- Axicabtagene (Gilead).....	50
1.3.	Tecartus®- Brexucabtagene autoleucel (Gilead)	50
2.	Tolérance des CAR T	51
2.1.	Syndrome de relargage cytokinique (CRS)	51
2.2.	Toxicité neurologique.....	52
2.3.	Aplasie B.....	52
3.	Rechutes	52
3.1.	Rechutes CD19+	52

3.2.	Rechutes CD19-	53
IV.	Indications dans les tumeurs solides	54
PARTIE 4 IMMUNOTHERAPIES DANS LE MM.....		55
I.	CS1.....	55
1.	La cible	55
2.	Les Immunothérapies anti-CS1	56
2.1.	Anticorps monoclonaux	56
2.2.	Anticorps Bi spécifiques	57
2.3.	CAR T anti-CS1	57
II.	CD38	58
1.	La cible	58
2.	Les Immunothérapies anti-CD38	59
2.1.	Anticorps monoclonaux	59
2.2.	Anticorps associé à de la chimiothérapie (ADC).....	62
2.3.	Anticorps Bi spécifiques	62
2.4.	CAR T anti-CD38	62
III.	B Cell Maturation Antigen.....	63
1.	La cible	63
2.	Les Immunothérapies anti-BCMA	66
2.1.	ADC.....	66
2.2.	Bi spécifiques.....	66
2.3.	CAR T anti-BCMA	67
2.4.	CAR T anti-BCMA associé à de la chimiothérapie.....	74
2.5.	Combinaison de CARs anti-CD19 et anti BCMA.....	74
2.6.	CARs anti BCMA bispécifiques.....	76
IV.	Les autres cibles	77
1.	CD19.....	77
2.	CD138.....	78
2.1.	Anticorps conjugué	78
2.2.	CAR T cells	78
3.	G Protein coupled class C group 5-member D (GPRC5D)	79
3.1.	Anticorps Bi spécifique anti-CD3/GPRC5D	80
3.2.	CAR T cells	80
4.	Immunoglobulin Light Chain	80
4.1.	Anticorps monoclonaux	80
4.2.	CAR T cells	81
5.	CD56.....	81
5.1.	Anticorps conjugué	81
5.2.	CAR T cells	82
6.	CD44v6.....	82
7.	CD70.....	83
8.	CD229 (Ly9) ou SLAMF3.....	83
9.	NKG2DL.....	83
10.	Lewis Y	84
11.	NY-ESO-1.....	84
OBJECTIFS DE LA THESE		86
RESULTATS		88

I.	Etude de la fonctionnalité des CAR T chez des Patients MM à différents stades de la pathologie	88
II.	Etude d'un nouvel anticorps bispécifique anti-CD38/CD3	102
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		103
I.	Discussion	103
II.	Perspectives pour améliorer l'efficacité des T en clinique	106
1.	Étudier le génome de ces patients	106
2.	Utiliser des T plus précoces	106
3.	CAR T Allogéniques	107
III.	Perspectives pour améliorer l'efficacité des CAR en clinique.....	109
1.	Améliorer l'expression du CAR à la surface	109
2.	Adapter le domaine de Costimulation en fonction du stade de la pathologie	109
3.	Associer les stratégies.....	109
3.1.	CAR T anti-BCMA/Checkpoint inhibitors	110
3.2.	CAR T anti-BCMA/Daratumumab	110
4.	CAR anti-BCMA NK.....	110
5.	CAR de 4 ^{ème} génération dans le MM ?	111
CONCLUSION.....		112
ANNEXES.....		113
BIBLIOGRAPHIE		130

Liste des Figures

Figure 1 Hématopoïèse	16
Figure 2 Différenciation et maturation de la lignée T	17
Figure 3 Structure et Signalisation du TCR (Brownlie, 2013)	19
Figure 4 Synapse immunologique entre une cellule T et une cellule dendritique	19
Figure 5 Différenciation mémoire des LyT	20
Figure 6 Locus des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines	21
Figure 7 Différenciation et maturation de la lignée B	22
Figure 8 Structure d'une Immunoglobuline	25
Figure 9 Différenciation B et Hémopathies malignes	26
Figure 10 Interactions entre le plasmocyte tumoral et son environnement médullaire (Palumbo, 2011)	29
Figure 11 Evolution cytogénétique du Myélome Multiple (Manier, 2017)	32
Figure 12 Différents types d'immunothérapies anti-cancéreuses	43
Figure 13 Mécanismes d'action des Immunothérapies passives	45
Figure 14 Composition d'un CAR (Adapté de Maude, 2015)	47
Figure 15 Structure des différentes générations de CARs	48
Figure 16 Cycle de production des cellules CAR T	49
Figure 17 Survie sans progression ELOQUENT 2 (Ritchie, 2017)	56
Figure 18 Représentation schématique de l'activité de CD38 chez l'Homme (Deaglio, 2008)	59
Figure 19 Survie sans progression étude CASTOR (Palumbo, 2016)	60
Figure 20 Survie sans progression étude POLLUX (Dimopoulos, 2016)	61
Figure 21 TNF Récepteurs et ligands (Mackay, 2003)	64
Figure 22 Interactions de BAFF et BCMA en situation normale et pathologique	65
Figure 23 Survie sans progression des patients sous bb2121 (Raje, 2019)	68
Figure 24 Application du PiggyBac™ (Poseida)	71
Figure 25 Liaison du sparX à l'antigène (Arcellx)	72

Liste des Tableaux

Tableau 1 Critères diagnostiques du MGUS, SMM et MM	35
Tableau 2 Classification selon Durie-Salmon (Durie, 1975)	36
Tableau 3 International Staging System (Greipp, 2005)	36
Tableau 4 ISS révisé dans le Myélome Multiple (Rajkumar, 2016)	37
Tableau 5 Critères d'évaluation de la réponse thérapeutique	41
Tableau 6 Données cliniques des CAR T commerciaux	51
Tableau 7 ADC anti- BCMA développés en clinique	66
Tableau 8 Bi spécifiques anti-BCMA développés en clinique	67
Tableau 9 CAR anti-BCMA développés par Celgène	73
Tableau 10 CAR anti-BCMA	74

Liste des Abréviations

AcMo <i>Anticorps Monoclonaux</i>	LLA <i>Leucémie Lymphoïde Aigue</i>
ADC <i>antibody drug conjugate</i>	MDSCs <i>myeloid-derived suppressors cells</i>
ADCC <i>cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps</i>	MGUS <i>monoclonal gammopathy of undetermined significance</i>
AMM <i>autorisation de mise sur le marché</i>	MM <i>Myélome Multiple</i>
APRIL <i>A proliferation inducing ligand</i>	MRD <i>minimal residual disease</i>
BAFF <i>B cell activating factor belonging to the TNF family</i>	NHEJ <i>Non Homologous end joining</i>
BCMA <i>B Cell Maturation Antigen</i>	NK : <i>Natural Killer</i>
BCR <i>B Cell receptor</i>	ORR <i>Overall Response Rate</i>
CAR <i>Récepteurs Antigéniques Chimériques</i>	PCT <i>Plasmocyte Tumoral</i>
CDC <i>Cytotoxicité dépendante du complément</i>	PD <i>Maladie en progression</i>
CMH <i>Complexe majeur d'histocompatibilité</i>	PFS <i>Progression Free Survival</i>
CPAs <i>cellules présentatrices de l'antigène</i>	PR <i>Réponse partielle</i>
CR <i>Réponse complète</i>	RAG <i>Recombination Activating Gene</i>
CRs <i>Réponse complète stringente</i>	RSS <i>Recombinant Signal Sequence</i>
CRS . <i>Syndrome de relargage cytokinique</i>	SAP <i>SLAM associated protein</i>
CSH <i>Cellule souche Hématopoïétique</i>	SD <i>Maladie stable</i>
FISH <i>hybridation in situ en fluorescence</i>	SI <i>système immunitaire</i>
Ig <i>Immunoglobuline</i>	SLAM <i>Signaling lymphocytic activation molécule</i>
IMiDs <i>Immunomodulateurs</i>	SMM <i>Smoldering multiple myeloma</i>
IMWG <i>International Myeloma Working Group</i>	TACI <i>Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor</i>
IP <i>Inhibiteurs du protéasome</i>	TALEN <i>Transcription Activator-like Effector Nucleases</i>
ITAMs <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>	TCR <i>T cell Receptor</i>
ITSMs <i>Immunoreceptor tyrosine-based switch motifs</i>	Th <i>LyT helper</i>
LCL <i>Leucémie Lymphoïde Chronique</i>	TIL <i>Tumor Infiltrating Lymphocyte</i>
	Treg <i>T régulateurs</i>
	VEGF <i>vascular endothelial growth factor</i>
	VGPR <i>Très bonne réponse partielle</i>

Introduction

De tout temps les maladies cancéreuses ont touché l'Homme, et la découverte de Papyrus de l'Égypte antique détaillant des tumeurs et ulcères du sein en atteste. A cette époque, la médecine s'entremêle avec la magie et il faut attendre Hippocrate pour que les premières notions de cancérologie voient le jour. L'épidémiologie montre aujourd'hui un net accroissement des taux de cancers, ce qui fait de lui l'une des premières causes de mortalité dans le monde. Avec près de 9.6 millions de décès enregistrés en 2018, soit une hausse de 17% par rapport à 2012, le cancer est indiscutablement un problème de santé publique. Baptisé Globocan 2018, le rapport du centre international de recherche sur le cancer, donne une liste des cancers les plus fréquemment diagnostiqués. Il apparaît que les hémopathies malignes représentent 12% de l'ensemble des cancers, soit 1.2 millions d'individus.

Dans le cadre de cette Thèse, nous allons plus particulièrement nous intéresser au Myélome Multiple (MM)) et à ses traitements, qui se composent principalement de chimiothérapie à base d'Immunomodulateurs, d'inhibiteurs du Protéasome et de Corticoïdes. Avec un taux de survie de 50% à 5 ans et une espérance de vie post diagnostic de 7 à 8 ans, sa prise en charge reste un des enjeux majeurs de notre époque. Au cours de ces 10 dernières années, des avancées remarquables dans les techniques d'Immunothérapie, de Thérapie Cellulaire et Thérapie Génique ont permis une meilleure appréhension des processus tumoraux, mais également, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur les Anticorps Monoclonaux, les Anticorps Bispécifiques ou encore les cellules T thérapeutiques. Malgré tout, le MM reste incurable et l'objectif principal de ce travail est d'étudier l'impact des lignes de traitement antérieures sur l'efficacité des stratégies utilisant le système immunitaire du malade.

Nous allons donc dans un premier temps aborder l'aspect physiopathologique des hémopathies malignes et plus spécifiquement du MM, pour aborder ensuite les Immunothérapies développées dans ce contexte. Dans un deuxième temps, nous détaillerons le travail expérimental effectué au cours de ces trois ans, avant d'ouvrir sur les perspectives d'optimisation.

Partie 1 Développement du système lymphoïde

I. Hématopoïèse précoce

L'hématopoïèse définit l'ensemble des mécanismes mis en place par l'organisme pour produire les cellules du sang. Ce processus se déroule dans la moëlle osseuse et débute par la différenciation de la Cellule Souche Hématopoïétique (CSH) en deux progéniteurs engagés dans les lignées Lymphoïde ou Myéloïde. *Figure 1 Hématopoïèse* (Pitte, 2019)

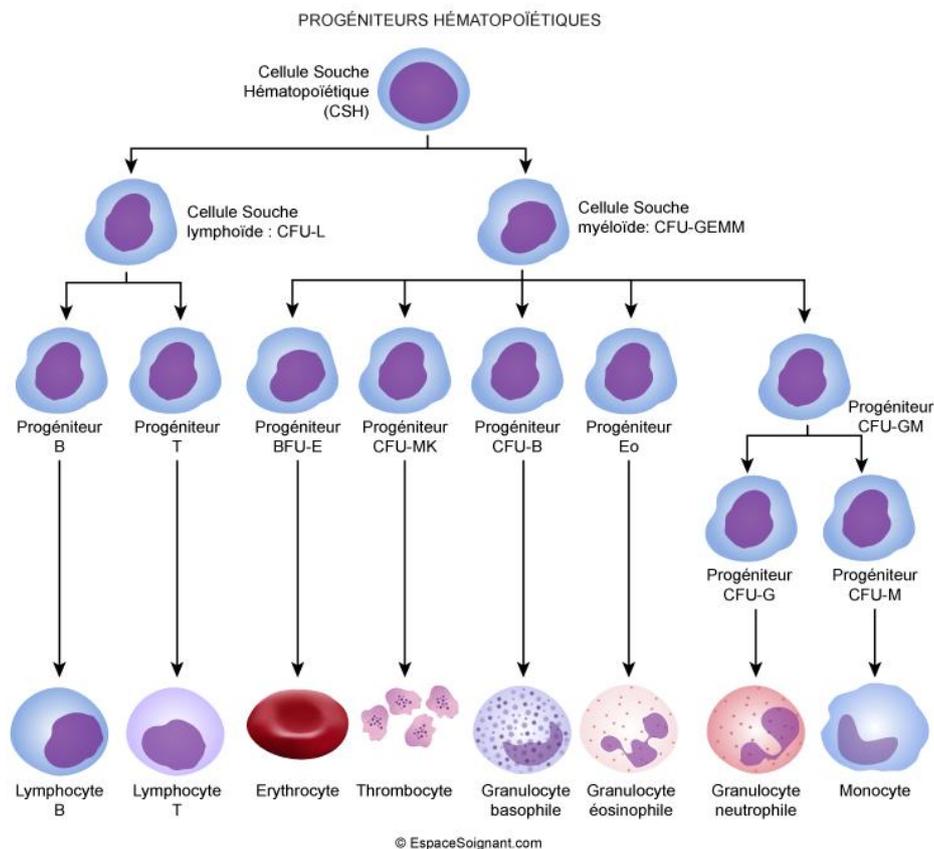


Figure 1 Hématopoïèse

La lignée Lymphoïde, comprenant les lymphocytes B, T mais également les cellules Natural Killer (NK) et les lymphocytes innés (ILC), est associée au système immunitaire destiné spécifiquement à défendre l'organisme.

La lignée Myéloïde quant à elle est composée par une multitude de cellules allant du globule rouge permettant l'oxygénation de l'organisme, aux thrombocytes essentiels dans les mécanismes de coagulation, en passant par les granulocytes et des monocytes ayant eux aussi un rôle majeur dans la défense de l'organisme.

II. La lignée lymphoïde

La différenciation de la lignée lymphoïde débute dans le foie fœtal dans les six premiers mois de vie *in utero*, à partir de la cellule souche hématopoïétique. Elle migre ensuite, avant la naissance, dans la moëlle où les progéniteurs lymphoïdes s'engagent dans la lignée B ou dans la lignée T, dont la maturation se fera dans le thymus.

1. L'Ontogenèse T

1.1. Différenciation précoce des cellules T

Les lymphocytes T participent à la réponse immunitaire acquise, appelée dans ce cas précis « Réponse Immunitaire Cellulaire » grâce à leurs capacités à éliminer les agents pathogènes. Leur développement débute à partir de la colonisation thymique d'un précurseur médullaire n'exprimant pas le récepteur T (TCR), qui s'engage alors dans un processus de différenciation.

Figure 2 Différenciation et maturation de la lignée T

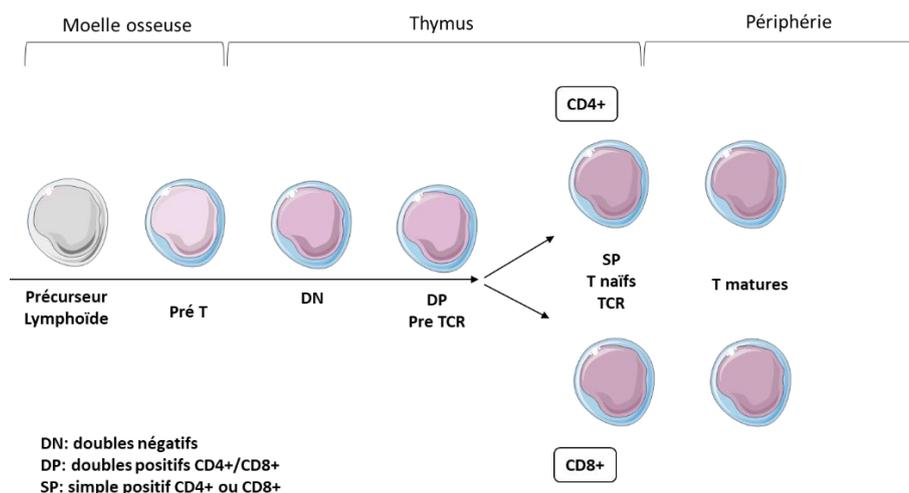


Figure 2 Différenciation et maturation de la lignée T

A ce stade précoce, la cellule n'exprime ni le TCR, ni les clusters de différenciation CD3, CD4 et CD8, on parle de cellules « doubles négatives ».

Le processus de différenciation T débute par le réarrangement des gènes codant pour le TCR, puis une fois acquis, le processus se poursuit par une série de sélections visant à éliminer les cellules T dites « auto-réactives », reconnaissant le soi et se liant au Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) avec trop d'affinité. Il s'agit également de garder les cellules reconnaissant les antigènes exogènes présentés par le CMH I ou II. Il faut noter qu'à ce stade, les cellules T sont dites « double positives » et expriment CD4⁺ si le TCR interagit avec un

CMH de classe II et CD8⁺ s'il interagit avec un CMH de classe I. (Singer, 2008) C'est ici que la nature du signal délivré par l'interaction TCR/CMH-II et l'environnement des thymocytes contribueront à produire la sous-population des LyT CD4⁺ régulateurs (Treg), impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire et certains processus d'échappement tumoral. (Josefowicz, 2012) Enfin, c'est sous forme « simple positive » que les lymphocytes seront sélectionnés pour quitter le thymus sous leur forme mature, TCR⁺/CD3⁺/CD4⁺ pour les T auxiliaires ou TCR⁺/CD3⁺/CD8⁺ pour les T cytotoxiques. (Viville, 1992) En périphérie, les lymphocytes T continuent leur maturation au grès de leurs rencontres avec les antigènes du « non soi ».

1.2. Activation et Différenciation T périphérique

Activation des Lymphocytes T périphériques

Lors de l'intrusion d'un pathogène dans l'organisme, les cellules présentatrices de l'antigène (CPAs) le rencontrent, s'activent et acquièrent la capacité à exprimer à leur surface, le peptide antigénique dans le contexte des molécules du CMH, des signaux de costimulation mais également à produire un ensemble de cytokines. *Figure 4 Synapse immunologique entre une cellule T et une cellule dendritique*

La réponse immunitaire médiée par les LyT débute lors de la reconnaissance du complexe CMH/peptide antigénique des CPAs par le TCR, qui est composé de deux chaînes extracellulaires α et β cf *Figure 3 Structure et Signalisation du TCR*. (Harris, 2016) Un signal d'activation induit alors la phosphorylation de plusieurs résidus du domaine CD3, en commençant par l'hétérodimères $\epsilon\delta$ et $\epsilon\gamma$, puis les chaînes ζ intracellulaires, possédant des motifs ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Ces phosphorylations déclenchent alors une cascade d'activation en commençant par la protéine ZAP-70 et les kinases Src, Lck et Fyn, permettant ainsi la mise en place des voies de signalisation NF κ B, RAS/MAPK, PI3K/AK, responsables l'activation précoce des LyT. (Mariuzza, 2020) (Salmond, 2009)*Figure 3 Structure et Signalisation du TCR* En parallèle, des signaux de costimulation complètent les signaux issus du TCR et empêchent l'induction de l'anergie. (Bandyopadhyay, 2007)

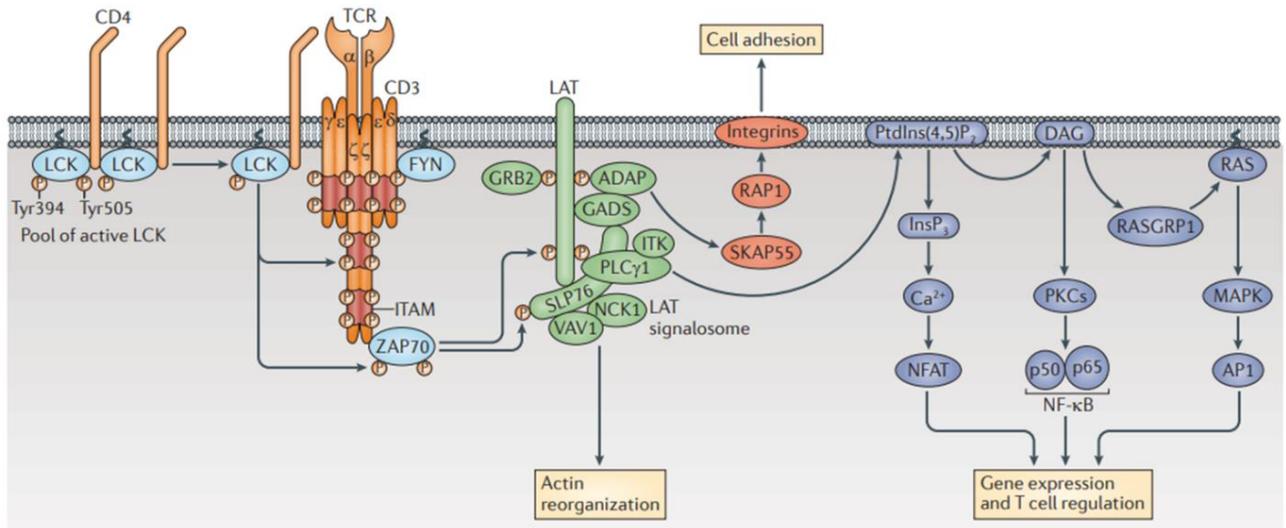


Figure 3 Structure et Signalisation du TCR (Brownlie, 2013)

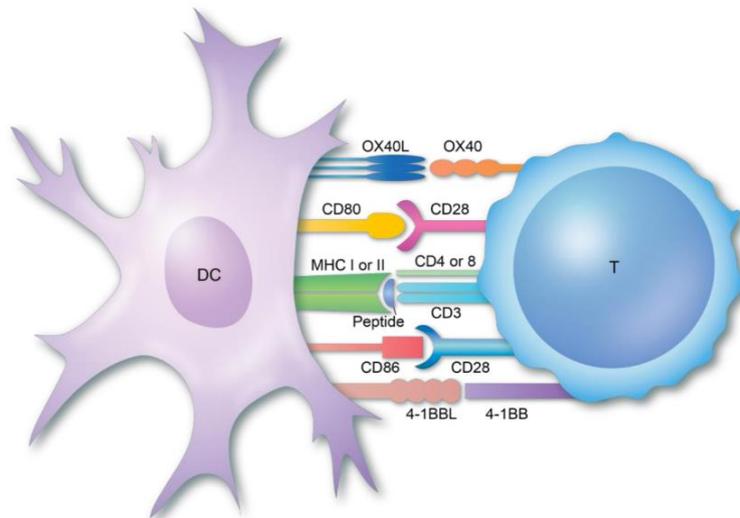


Figure 4 Synapse immunologique entre une cellule T et une cellule dendritique

Les principaux récepteurs de costimulation des LyT sont CD28 et ICOS, membres de la superfamille des Igs, et exprimés de manière constitutive sur les LyT naïfs. Ils possèdent chacun deux ligands, B7-1/B7-2 pour CD28 et CD80/CD86 pour ICOS, tous exprimés sur les CPAs matures cf *Figure 4 Synapse immunologique entre une cellule T et une cellule dendritique*. Un second groupe comprend les membres de la famille des récepteurs du TNF, comme CD27, 4-1BB et OX-40, dont l'engagement favorise la progression du cycle cellulaire, la survie et l'acquisition de fonctions effectrices des LyT. L'expansion et la fonction des LyT peuvent également être impactés par les cytokines inflammatoires produites par les CPAs activées (l'IL-12 ou l'IFN), mais également par l'IL-2, l'IL-4 ou le TGF sécrétés au niveau de la synapse immunologique.

Différenciation des Lymphocytes T périphériques

L'activation des LyT et ces signaux cytokiniques sont essentiels à l'expansion clonale et leur orientation vers des fonctions spécifiques. Les LyTCD4⁺ naïfs vont ainsi se différencier en T helpers (Th) 1, Th2, Th17 ou en Tregs et sont caractérisés par différents profils cytokiniques, aux propriétés pro- ou anti-inflammatoires.

La rencontre avec l'Ag va également provoquer la transformation des cellules T naïves en T effectrices, capables de migrer vers le lieu de l'infection et possédant une durée de vie faible. Plusieurs modèles de générations de cellules effectrices existent, mais il semblerait que la différenciation des LyTCD8⁺ soit linéaire et comprenne des stades intermédiaires tels que les T centrales mémoires (CM), T effecteur mémoire (EM) ou T effecteur (E), alors que celle des LyTCD4⁺ serait plus complexe présentant des ramifications allant d'un stade à l'autre.

De façon générale, des marqueurs de surface permettent de mettre en avant les stades de différenciation, comme le CD62L, les CD45RO et RA ou le CCR7 comme dans la *Figure 5 Différenciation mémoire des LyT*.

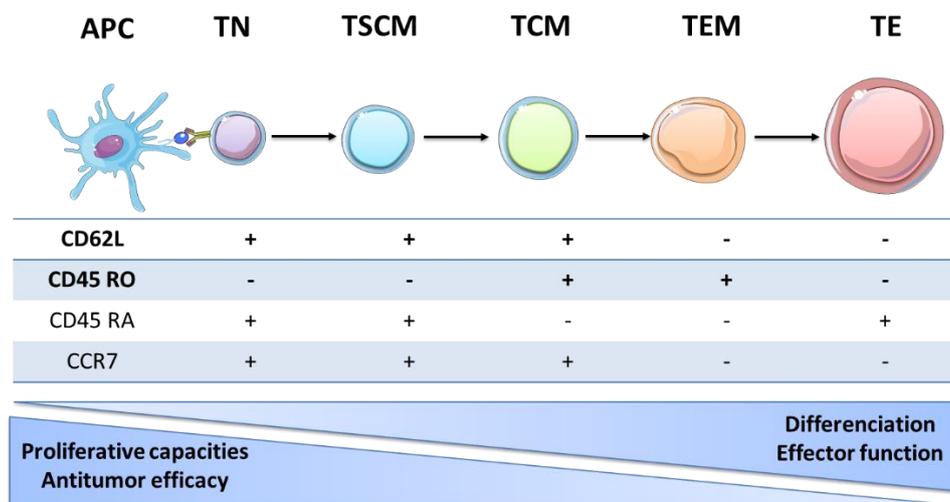


Figure 5 Différenciation mémoire des LyT

Adapté de (Gattinoni, 2012) (Restifo, 2014) (Golubovskaya, 2016)

Il faut noter que les cellules mémoires ont une longue durée de vie et ont la propriété de se réactiver et de proliférer très rapidement en cas de re exposition à l'antigène, ce qui confère à l'organisme une bonne protection immunologique. Il faut également préciser que le stock de cellules T_{CM} s'acquiert au cours de la vie, pour atteindre un plateau autour de 40 ans et qu'au-delà de 60 ans, leurs propriétés sont altérées par des mécanismes d'immunosénescence pouvant être associés à des dérégulations de l'immunité. (Farber, 2014)

1.3. Régulation de la réponse T

Afin de réguler la réponse des LyT, des processus de contrôles s'opposent signaux d'activation. Ainsi, l'inhibition de la prolifération des LyT peut être induite, par l'engagement du récepteur CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) ou PD-1. (Pentcheva-Hoang, 2009) Ces deux récepteurs appartiennent à la famille de CD28 et transmettent des signaux inhibiteurs lors de la fixation des ligands respectifs B7-1 et B7-2. Par ailleurs, PD-1 a deux ligands, PDL-1 (B7-H1) fortement exprimé et retrouvé sur la plupart des cellules et PDL-2 (B7-DC), qui est exprimé de manière restreinte et retrouvé sur les CPAs activées. Ainsi, la combinaison de signaux d'activation, de costimulation et d'inhibition régulent la réponse immunitaire des LyT. Rappelons ici que l'expression des récepteurs inhibiteurs est un processus impliqué dans l'échappement tumoral et que son inhibition représente une stratégie thérapeutique antitumorale efficace.

2. L'Ontogenèse B

2.1. Différenciation précoce des cellules B

Le lymphocyte B, de par sa propriété à sécréter des immunoglobulines est responsable d'une partie importante de la réponse immunitaire adaptative, appelée « Réponse Immunitaire Humorale ». Dans la moelle, les précurseurs lymphoïdes s'engagent dans le lignage lymphoïde B sous l'action de signaux spécifiques, notamment l'IL-7, qui coopèrent pour promouvoir la recombinaison des gènes des Immunoglobulines (Ig). Ce processus catalysé par les protéines RAG 1 et RAG2 (Recombination Activating Gene) est essentiel pour l'acquisition de la diversité du répertoire B issue de la combinaison des variables (V), de diversité (D), de jonction (J) ou encore constantes (C). *Figure 6 Locus des chaînes lourdes et légères*

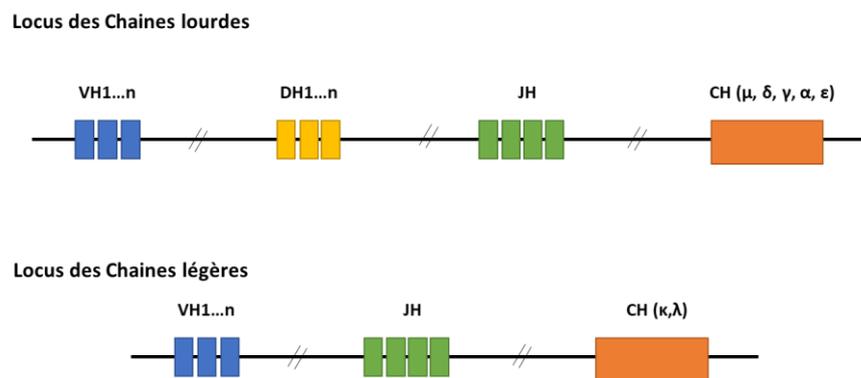


Figure 6 Locus des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines

Les réarrangements du gène des chaînes lourdes (IgH) interviennent au stade pro-B et marquent l'engagement définitif dans la lignée B. A la suite d'un réarrangement productif, la chaîne

lourde μ va s'associer à des chaînes légères de substitution, appelées pseudo-chaînes légères, composée des protéines λ -like ($\lambda 5$) et Vpré-B. Il faut noter qu'à ce stade les segments codant la chaîne légère n'ont pas encore été réarrangés. Ce complexe va ensuite être exprimé à la surface des cellules pré-B en association avec les molécules de transduction $Ig\alpha/Ig\beta$, codées par les gènes CD79a et CD79b, pour former le pré-BCR. L'expression du pré-BCR va permettre le réarrangement séquentiel des gènes des chaîne légères (IgL), en commençant par le locus κ , puis, si le réarrangement n'est pas productif, par le locus λ . Le lymphocytes B exprime alors une immunoglobuline de surface IgM ou récepteur des cellules B (BCR). (Winkler, 2018)

Mais avant qu'il ne puisse remplir sa fonction face à l'antigène, plusieurs étapes vont se succéder afin de l'optimiser. Effectivement, lors de son développement le lymphocyte B va suivre un processus de sélection positive pour éliminer les cellules qui reconnaissent les antigènes du soi et éviter ainsi les maladies auto-immunes. *Figure 7 Différenciation et maturation de la lignée B*

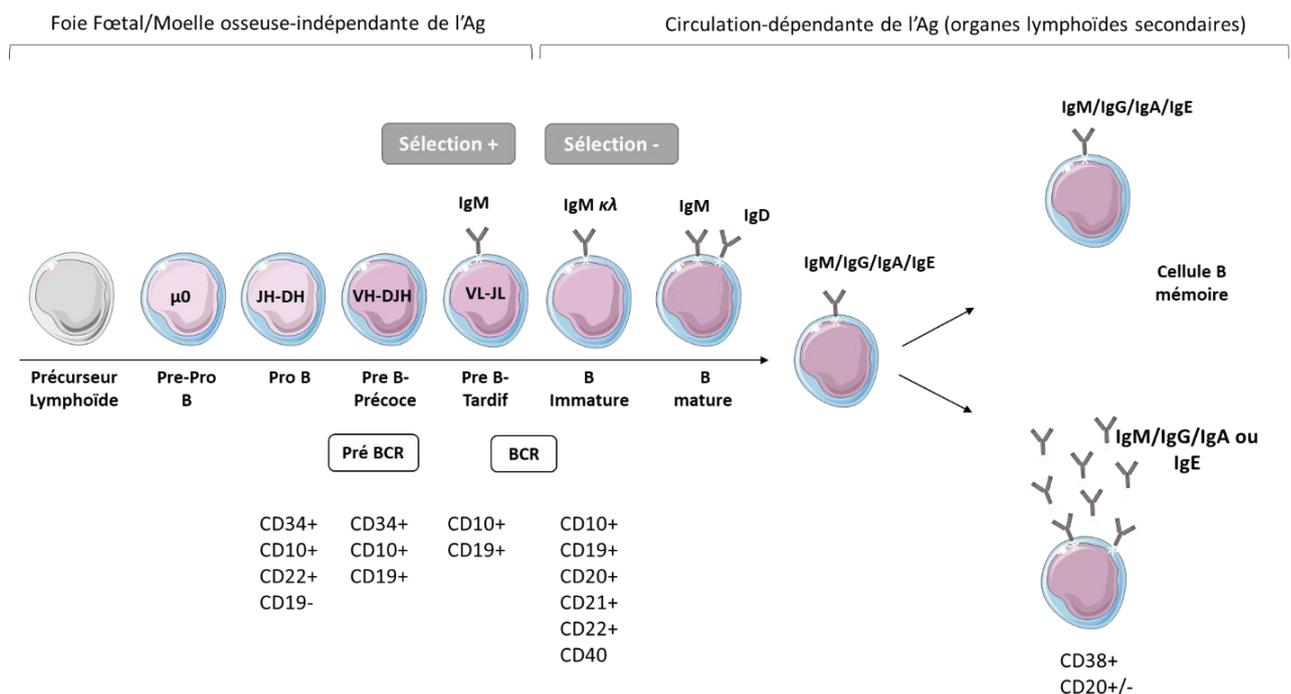


Figure 7 Différenciation et maturation de la lignée B

Une fois la cellule immunocompétente sélectionnée, celle-ci va rejoindre les organes lymphoïdes secondaires, notamment la rate et les ganglions, pour y acquérir un phénotype mature, exprimant les IgM et les IgD. En périphérie, les LB matures naïfs peuvent générer différents types de cellules en fonction de la nature de la stimulation antigénique et de leur environnement. Ils peuvent se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps à courte durée de

vie, appelée plasma blastes (PB), en cellules productrices d'anticorps à longue durée de vie appelée plasmocytes (PC), ou encore en LB mémoires.

On distingue deux types de réponses immunitaires B, la réponse **thymo-indépendante** (TI) tout d'abord, qui est dirigée contre des antigènes multivalents/polymérisés et ne nécessite pas l'action des LyT CD4⁺. Elle concerne principalement les cellules B1 (LyB1) et les LyB de la Zone Marginale, activés via les Toll-like Receptors (TLRs) ou les BCRs (IGM). Ces cellules sont donc capables de répondre en développant une réponse rapide en générant des plasma blastes, sécrétant de grandes quantités d'IgM poly-réactives de faible affinités. Par ailleurs, il existe également la réponse **thymo-dépendante** (TD), faisant intervenir les LyT CD4⁺ et générée suite à la reconnaissance d'un antigène soluble. Effectivement, lors de la réponse extra-folliculaire, les LyT, préalablement activés, présentent une augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD40-L et de ICOS (l'inducible T-cell costimulator). De leur côté, les LyB folliculaires de la zone B, vont internaliser le complexe antigène/BCR, permettant la présentation de l'antigène par le CMH-II et la surexpression des molécules de costimulation CD40 et CD80/86. Ainsi, les LyB activés vont présenter le peptide antigénique au LyT via le complexe antigène/CMH-II, mais également par la liaison CD40-L (LyT) / CD40 (LyB), ICOS / ICOS-L et CD28 / CD80/86. Ces réactions, appuyées par la sécrétion de cytokines par les LyT, vont favoriser la survie, la prolifération et la maturation germinative des LyB.

La réaction du centre germinatif (CG) a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires, grâce à l'activité de l'enzyme AID (Activation-induced Deaminase) et provoque l'engagement des LyB folliculaires dans 2 mécanismes génétiques différents aboutissant à la modification des Immunoglobulines. Il s'agit d'une part de l'hyper-mutation somatique (HMS), qui est un processus mutagène intervenant sur les gènes des chaînes lourdes et légères des Ig et qui permet de modifier l'affinité des Ig pour l'antigène. Et d'autre part, de la commutation de classe des Ig, qui permet le remplacement d'une des régions constantes par une autre. Elle est composée de quatre étapes comprenant la transcription germinale des séquences « switch » et de leurs régions constantes associées, le recrutement de AID sur ces régions, la cassure des doubles brins d'ADN induite par cette enzyme au niveau des séquences RSS (Recombination Signal Sequence) non codantes bordant les segment VDJ. Et enfin, la réparation des brins par le complexe de réparation des extrémités non homologues (NHEJ : non homologous end joining).

C'est principalement lors de ces étapes que des mutations pourront intervenir, optimisant la diversité de la réponse humorale, lorsque le cadre de lecture est respecté, ou entraînant une pathologie de type lymphoïde dans le cas contraire.

2.2. Différenciation terminale des cellules B sécrétrices

Comme décrit plus haut, les LyB activés peuvent se différencier en trois types cellulaires différents. On trouve ainsi les LyB mémoires, quiescentes mais conservant une capacité d'activation en cas de réapparition du pathogène. Mais aussi les cellules sécrétrices d'anticorps, se divisant en plasma blastes à durée de vie courte ou en plasmocytes à durée de vie longue.

Plusieurs facteurs de transcription interviennent dans la régulation de cette différenciation, formant ainsi un programme transcriptionnel, composé de PAX5 et BCL6, responsables du développement des cellules B mémoires, et du facteur de transcription Blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1) qui contribue à l'engagement des B vers le stade plasmocyte.

Une fois exprimé, Blimp-1 renforce sa propre expression, induit l'IRF4 (interferon regulatory factor 4) qui assure la survie des plasmocytes, et inhibe celle de PAX5 et BCL6. (LeBien, 2017) (Tarlinton, 2008) Blimp-1 réprime également CXCR5, nécessaire à la rétention des cellules dans les follicules. Une fois générés, ces plasmocytes vont donc quitter les organes lymphoïdes secondaires et se diriger vers des niches médullaires grâce à CXCR4, où ils sécréteront des immunoglobulines. Il faut noter que les plasmocytes expriment également à leur surface des molécules d'adhésion comme VLA-4/CAM1 leur permettant de rester dans la moelle.

Ce microenvironnement médullaire, constitué par les cellules stromales, les neutrophiles ou les précurseurs myéloïdes, aura également un impact sur le devenir de ces PC en libérant de nombreux facteurs solubles. Nous pouvons notamment citer les cytokines APRIL et BAFF, qui permettent la différenciation et la survie des plasmocytes via leur liaison au récepteur BCMA (B Cell Maturation Antigen), ou l'IL6 qui assure leur survie via la surexpression de protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-xL. (Schroeder, 2008)

2.3. Structure des Immunoglobulines

Les anticorps ou Immunoglobulines (Ig) sont de petites protéines pouvant être exprimées à la surface du Lymphocyte B (Récepteur des cellules B : BCR) ou synthétisées par les plasmocytes sous forme soluble. Ces molécules sont constituées de deux chaînes lourdes (IGH) identiques, composées de trois domaines constants (CH) et deux domaines variables (VH). Et sont

associées à deux chaînes légères (IGL) plus petites, comprenant un domaine constant (CL) et un domaine variable (VL). *Figure 8 Structure d'une Immunoglobuline*

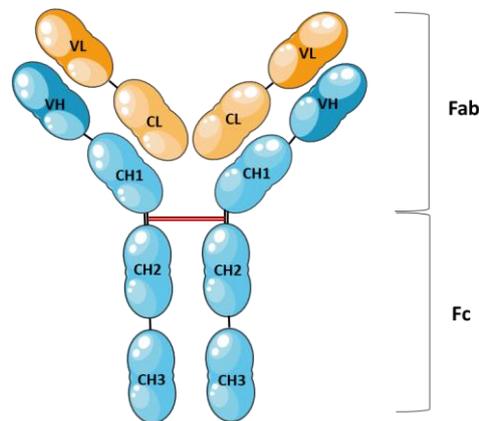


Figure 8 Structure d'une Immunoglobuline

Les fragments variables des chaînes lourdes et légères ont respectivement trois domaines hypervariables (ou région déterminant la complémentarité) dont l'association constitue le site de fixation à l'antigène ou **paratope**. Par ailleurs, les parties constantes des chaînes lourdes ont également une activité effectrice dont la spécificité est dépendante de l'isotype.

Les **isotypes** sont des variations dans le domaine constant des Ig, leur donnant des fonctions spécifiques. Ainsi nous pouvons distinguer chez l'Humain 9 isotypes différents :

Les **IgM**, responsables de la réponse primaire et de l'activation de la voie du complément. Les **IgD**, exprimés par les lymphocytes B au même moment que les IgM et sont impliqués dans leur différenciation. Les **IgG** (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4), isotype le plus représenté dans l'organisme, ont la capacité d'induire les réactions de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps et/ou à activer le complément. Les **IgA** (IgA1, IgA2), dont le rôle est d'assurer l'immunité des muqueuses. Ou encore les **IgE**, impliquées dans les défenses anti parasitaires et/ou d'hypersensibilité.

III. Classification des hémopathies

Les hémopathies malignes ou cancers du sang, sont des pathologies impactant le processus de l'hématopoïèse, dont la classification se fait généralement selon le type cellulaire engagé, les caractéristiques cellulaires mais également le type de prolifération tumoral. Ainsi nous pouvons distinguer les hémopathies myéloïdes et les lymphoïdes.

1. Hémopathies myéloïdes

Elles se divisent en 3 groupes, les **leucémies aiguës myéloblastiques** (LAM) où les cellules immatures de la lignée myéloïde se multiplient de façon anormale. Les **syndromes myéloprolifératifs** qui touchent les cellules matures et regroupent notamment les *leucémies myéloïdes chroniques*, la *maladie de Vaquez*, la *thrombocytémie essentielle* ou la *myélofibrose primitive*. Enfin, les **syndromes myélodysplasiques**, caractérisés par des dysfonctionnements de l'hématopoïèse menant à des anomalies morphologiques et/ou numériques (cytopénies).

2. Hémopathies lymphoïdes B

Les hémopathies lymphoïdes B touchent l'ensemble des stades de la différenciation des lymphocytes B, et donnent naissance à différentes pathologies. *Figure 9 Différenciation B et Hémopathies malignes*

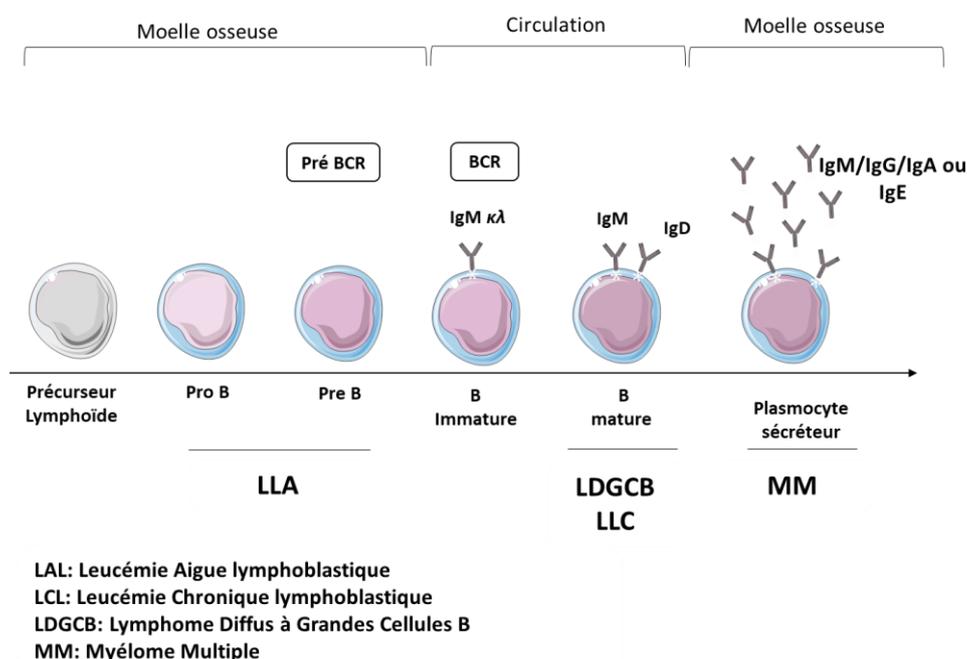


Figure 9 Différenciation B et Hémopathies malignes

Les plus fréquentes de ces pathologies sont les **lymphomes non Hodgkinien**, qui comprennent notamment les lymphomes de Burkitt, les lymphomes à cellules du manteau ou encore les lymphomes diffus à grandes cellules B. (Institut National du Cancer, 2019)

Les Leucémies, composées des **leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)** très répandues chez les enfants et les **leucémies chroniques lymphoblastiques (LCL)** touchant majoritairement les personnes âgées. Mais la pathologie qui nous intéressera pour la suite de ce travail est le **Myélome Multiple (MM)** associé à la prolifération clonale du stade terminal de la différenciation des lymphocytes B. (Institut de Cancérologie Privé, 2017)

Partie 2 Le myélome multiple

I. Définition

Comme décrit plus haut, le MM ou maladie de Kahler, est une hémopathie maligne hétérogène caractérisée par la prolifération anormale d'un plasmocyte clonal, dans la moelle osseuse.

Les principaux signes cliniques associés sont regroupés sous l'acronyme **CRAB** faisant référence à une hyperCalcémie, une insuffisance Rénale, une Anémie et à des lésions osseuses (Bones). Ces symptômes sont principalement dus à l'invasion médullaire des plasmocytes, définis par au moins 10% d'infiltrat, et à la synthèse d'une protéine monoclonale (M-protein) retrouvée dans le sang ou l'urine du patient. Par ailleurs, le MM est toujours précédé d'un stade asymptomatique d'évolution plus ou moins lente comme le **MGUS** (monoclonal gammopathy of undetermined significance) présentant une progression en MM symptomatique de 1% par an, ou le **SMM** (Smoldering multiple myeloma) ayant quant à lui une progression de 10% par an les 5 premières années. (Kyle, 2004) (The International Myeloma Working Group, 2003) (Moreau, 2013)

II. Epidémiologie

Le MM est la 2^{ème} Hémopathie maligne la plus fréquente avec 10 à 15% des cancers du sang et moins de 2% de l'ensemble des Cancers, tous types confondus. (Kazandjian, 2016) (InfoCancer, 2020) En 2018, le nombre de nouveaux cas de MM en France était de 5442 avec une incidence légèrement plus élevée chez l'homme (52%) que chez la femme. Par ailleurs, il s'agit d'une pathologie plus répandue chez les individus de plus de 60 ans, avec un âge médian au diagnostic de 70 ans et un pic d'incidence entre 65 et 84 ans. (Institut national du cancer, 2019) Le taux de survie à 5 ans, est d'environ 50% et la survie médiane d'environ 7 à 8 ans contre 3 à 4 ans il y a une dizaine d'années. (Nijhof, 2018)

III. Facteurs de risques du MM

Des éléments environnementaux comme les infections virales chroniques, des radiations ionisantes ou l'exposition aux herbicides pourraient favoriser le MM. Par ailleurs, une étude montre que l'implication de facteurs héréditaires existe mais reste limitée. (Manier, 2017)

IV. Physiopathologie du MM

Le premier cas de MM est documenté en 1844, il s'agit d'une femme de 39 ans souffrant d'asthénie, de douleurs osseuses et de multiples fractures dont l'autopsie révélera 4 ans plus tard une invasion de la moëlle osseuse par une substance rouge. A l'époque, Solly avait déjà évoqué le fait que la substance osseuse disparaissait au profit d'une autre et qu'elle était potentiellement excrétée par l'urine. (Solly, 1844) C'est au cours du siècle suivant, que l'implication des plasmocytes, l'hyper-protéïnémie et la protéinurie seront mis en évidence. C'est également à cette époque que des critères cliniques communs pourront être référencés, avec notamment l'apparition de fractures osseuses, la présence de la protéine de Bence Jones dans les urines, d'une anémie mais également d'une atteinte rénale chronique. (Kyle, 2008)

1. Signes cliniques

Le MM est actuellement caractérisé par la prolifération clonale d'un plasmocyte tumoral, sécrétant une Ig monoclonale. Cette accumulation de plasmocytes mais également de protéines, engendre de nombreux troubles caractérisés par une altération de l'état général du patient et des signes cliniques comme une anémie dans 70% des cas, des douleurs osseuses 58% avec potentiellement des fractures spontanées dans 30% des cas, une grande fatigue 32%, une perte de poids 25%, une dégradation de la fonction rénale environ 20% ou une hypercalcémie dans 10 à 19% des patients. (Manier, 2019) (Gerecke, 2016) (Brigle, 2017) Par ailleurs, les patients peuvent également développer des états infectieux à répétition ou persistants.

2. Paramètres Biologiques

Le plasmocyte est le stade effecteur de la lignée B, capable de synthétiser les anticorps correspondant aux antigènes détectés. (Anderson, 2011) Ainsi, comme son homologue sain, le Plasmocyte Tumoral (PCT) est présent dans la moëlle osseuse où il va recevoir des signaux de survie de la part de son micro-environnement via la sécrétion de cytokines, chimiokines ou facteurs de croissance. Il peut aussi être impacté via l'interaction avec d'autres cellules, comme les cellules myéloïdes, les lymphocytes T, les NK et/ou les ostéoblastes/clastes. (Brigle, 2017)

Figure 10 Interactions entre le plasmocyte tumoral et son environnement médullaire

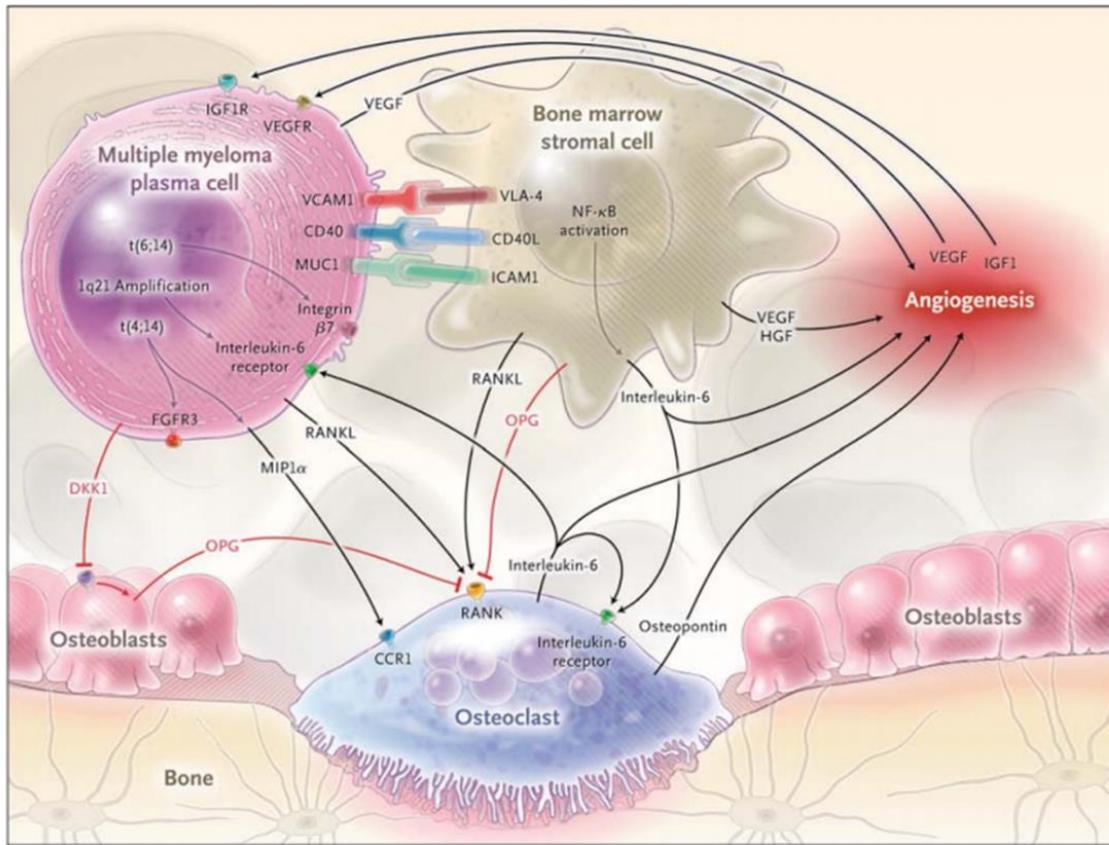


Figure 10 Interactions entre le plasmocyte tumoral et son environnement médullaire (Palumbo, 2011)

Ainsi, le PCT prolifère et se lie aux cellules Stromales via les molécules d'adhésion VCAM1 et VLA4. Cette interaction entraîne une augmentation de la synthèse d'IL6, qui est importante dans l'augmentation de VEGF, facteur de croissance clé dans l'angiogenèse, responsable notamment de la vascularisation et migration de la « tumeur ». Mais le rôle de l'IL6 est multiple dans l'histoire de la maladie.

2.1. Perte osseuse et hypercalcémie

Effectivement, l'IL6 a notamment une place importante dans le déséquilibre du remodelage osseux, responsable des lésions dont les patients souffrent. Elle favorise la fabrication d'ostéoclastes via l'axe RANK/RANKL, responsables de l'ostéolyse et de la libération d'IL6, d'IGF1 et de TGFβ dans l'environnement tumoral. La perte osseuse est également appuyée par le relargage de DKK1 par les PCT, dont le rôle est d'inhiber la production d'ostéoblastes qui ne sont plus en mesure de produire l'ostéoprotégérine nécessaire à l'inhibition de l'ostéolyse. Ces facteurs de croissance agissent également par rétrocontrôle positif, augmentant de ce fait la prolifération des PCT. (Brigle, 2017) (Palumbo, 2011)

La recherche d'une atteinte osseuse dans le MM est primordiale et l'imagerie tient une place importante dans l'évaluation de l'ampleur de la déminéralisation. Un bilan normal nécessite des clichés du crâne, du rachis complet, du bassin, du thorax, des humérus et des fémurs. Plusieurs techniques peuvent être utilisées comme les Rayons X, longtemps considéré comme l'examen de référence. Cependant elle nécessite des lésions osseuses d'au moins 40% pour être détectable sur les images et d'autres examens sont aujourd'hui plus performants. Comme notamment la CT : computed tomography, qui utilise les rayons X associés à une analyse numérique combinant les images, donnant une vision 3D. La MRI : Magnetic Resonance Imaging, permettant de quantifier le champ magnétique du corps par la mesure des protons émis par l'eau. Cette technique permet de reconstruire les organes étudiés en 3D, mais également les anomalies comme les infiltrations médullaires sur le rachis. Nous pouvons également citer le PET : Positron emission tomography, utilisant un produit de contraste permettant de mesurer la luminosité émise par les organes. Le PET permet ainsi de détecter les lésions extra médullaire.

Par ailleurs, la résorption des os va libérer une quantité importante de calcium dans le sang pouvant aller jusqu'à l'hypercalcémie. Il s'agit donc d'un paramètre biologique à mesurer régulièrement chez le patient.

2.2. Anémie

L'augmentation de l'invasion médullaire va altérer l'hématopoïèse normale et notamment l'érythropoïèse favorisant l'apparition d'anémies. Une numération de la formule sanguine (NFS) est nécessaire afin de mettre en évidence l'anémie normochrome, normocytaire qui est la plus fréquente dans le MM, représentant une baisse de l'hémoglobine et du nombre de globule rouge (GR) de façon homogène. Environ 10 à 15% des patients présentent une thrombopénie ou plus rarement une diminution de la formule leucocytaire sanguine, signes d'une infiltration médullaire importante. (Nau, 2008)

2.3. Insuffisances rénales

Dans son fonctionnement normal, le rein filtre le sang, réabsorbe l'eau et les métabolites, mais est également en charge de l'élimination de l'urine primitive par filtration dans le glomérule rénal. Or, la grande proportion de chaînes légères dans le sang va entraîner leur accumulation dans les tubules, pouvant aller du dysfonctionnement fonctionnel, due à une mauvaise réabsorption, jusqu'à l'insuffisance rénale chronique par obstruction tubulaire causée par les

dépôts. (Gaballa, 2014) Il faut noter qu'un niveau excessif de chaînes légères dans les reins peut provoquer à long terme des atteintes rénales irréversibles. Ainsi l'évaluation de la fonction rénale est basée sur la mesure de la clairance de la créatinine, ce qui permet d'estimer le débit de filtration glomérulaire.

2.4. Infections

La synthèse d'Ig monoclonale va également impacter le système immunitaire en amenuisant les défenses de l'organisme contre les infections pathogènes. Effectivement, l'augmentation des PCT réduit la production d'un Ig variée ce qui se traduit par une hypo-gamma-globulinémie polyclonale. Les patients sont alors plus susceptibles de développer des infections à répétition ce qui est l'une des principales causes de morbidité dans le MM.

V. Anomalies cytogénétiques

Le MM est une pathologie complexe et génétiquement hétérogène. Elle résulte de l'accumulation de mutations oncogéniques intervenant au cours du développement du plasmocyte et de la progression tumorale. Les premières analyses génomiques ont permis de distinguer et de caractériser les événements mutationnels primaires, apparaissant précocement dans l'historique de la maladie, dès le stade MGUS. Ces analyses, notamment l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), ont permis de différencier deux types mutationnels : l'hyper diploïdie et les non hyper diploïdies liées aux translocations du chromosome 14. Par la suite, l'établissement du caryotype ou encore le séquençage des exons, ont permis de mettre en avant l'existence d'événements secondaires qui marquent généralement l'apparition d'un stade plus avancé de MM. (Morgan, 2012) (Manier, 2017) *Figure 11 Evolution cytogénétique du Myélome Multiple*

1. Evènements primaires

1.1. Hyper diploïdies

La diploïdie correspond à l'état d'une cellule comprenant 23 paires de chaque chromosome. De ce fait l'hyper diploïdie distingue le fait que la cellule a un nombre élevé de chromosomes, généralement supérieur à 48. Cette mutation représente 50% des patients présentant un MGUS, un SMM ou un MM symptomatique, et implique préférentiellement des trisomies 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et 21. Bien que l'origine de ces mutations reste encore mal connue, il semblerait qu'elle soit associée à un pronostic est moins défavorable. (Manier, 2017) (Kazandjian, 2014)

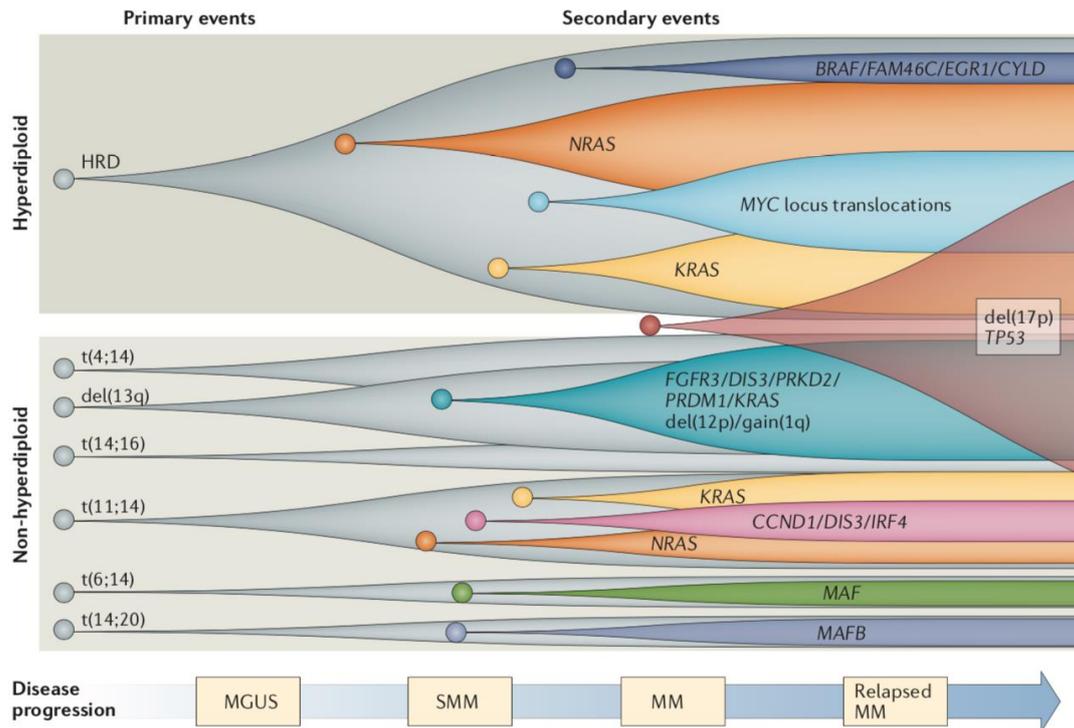


Figure 11 Evolution cytogénétique du Myélome Multiple (Manier, 2017)

1.2. Non Hyper diploïdies

Les translocations sont ici majoritaires et se définissent par le transfert d'un segment d'ADN chromosomique vers un autre. Elles concernent principalement la chaîne lourde des Igs (IGH) et le chromosome 14 locus q32.33 dans 90% des cas de translocation. Ainsi, les gènes recombinés se trouvent sous le contrôle de l'IGH induisant la surexpression de certains oncogènes MMSET/FGFR3, CCND3, CCND1, MAF et MAFB, ou des cyclines jouant un rôle dans le cycle cellulaire. Plusieurs translocations du chromosome 14 ont été étudiées.

La **t(11 ;14)(q13 ;32)** est la plus représentée entre 15 et 20% des patients, impacte la voie de la cycline D1 (CCND1) impliquée dans la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire. Elle est de pronostic neutre. La **t(4 ;14)(p16;32)**, représente 15% des patients, cible FGFR3 (Fibroblast growth factor 3) et MMSET (MM SET domain). La perte de MMSET altèrera les propriétés d'adhésion, alors que sa surexpression impactera la voie P53 impliquée dans le cycle cellulaire et notamment dans la voie apoptotique. Cette mutation est associée à un mauvais pronostic. La **t(14 ;16)(q23;32)**, représente 5% des patients, dérègle l'activation du facteur de transcription c-Maf et de la cycline D2. Elle est associée à un mauvais pronostic. La **t(6 ;14)(p21;32)**, représente 1 à 2% des patients et surexprime le gène de la Cycline D3. Ou encore la **t(14 ;20)(q11;32)**, la plus rare des translocations (1%), impactant la voie MAFB et étant de mauvais pronostic. Il faut noter que ces deux dernières translocations sont présentes à

des stades précoces de la pathologie. (Manier, 2017) (Kazandjian, 2014) Toutes ces translocations ont pour résultat la production d'une immunoglobuline non fonctionnelle.

2. Evènements secondaires

2.1. *La Translocation de MYC*

Elle concerne 3 à 4% des patients MGUS/SMM et 15-20% des MM. Elles sont souvent exprimées dans les tumeurs hyper diploïdes et associées à des locus tels que l'IGH (16,5%) et l'IGL (16,5%) pour les plus fréquentes. Toutes ces translocations induisent une surexpression de MYC et sont associées à un mauvais pronostic.

2.2. *Les altérations chromosomiques*

Plusieurs altérations chromosomiques sont répertoriées, comme notamment le **gain du chromosome 1q21**, détecté chez 30 à 40% des patients, associé à la surexpression du gène CKS1B (cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1B) et représentant un facteur de mauvais pronostic. La **délétion 13q**, est la 3^{ème} anomalie la plus fréquente puisqu'elle est présente chez 45 à 50% des patients. Elle est retrouvée chez certains MGUS laissant penser qu'il s'agit d'un évènement précoce, peut être associée à la perte de l'ensemble du chromosome, il s'agit alors d'une monosomie dans 50% des cas, mais elle est aussi souvent associée à une autre mutation génétique. Il existe également, la **délétion du chromosome 17**, représentant 10% des patients au diagnostic. Elle est associée à la perte du gène suppresseur de tumeur TP53, est de mauvais pronostic et marque généralement une pathologie avancée. La **délétion de 1p** est présente chez 30% des patients, associée à un mauvais pronostic et touchant deux régions 1p12 et 1p32.3. (Manier, 2017) (Fonseca, 2003) (Kumar, 2018)

VI. Diagnostic et Classification

Le diagnostic du MM intervient souvent après consultation chez le médecin généraliste pour des douleurs osseuses résistantes au repos et aux traitements antalgiques de paliers I, II ou III, ou de fatigue persistante. Cependant, il peut également être posé lors d'une situation « d'urgence » à la suite d'une fracture osseuse, d'une insuffisance rénale aigue ou après la découverte d'hypercalcémie. Pour cela, plusieurs éléments doivent être évalués et classifiés. Ainsi, il faudra répertorier les signes cliniques s'il y en a, les signes biologiques mais également effectuer une analyse radiologique permettant d'établir l'atteinte osseuse.

1. Critères biologiques

La caractéristique principale du MM est la synthèse d'une immunoglobuline monoclonale détectable dans le sang et dans les urines. L'électrophorèse des protéines sériques, est un examen répandu permettant de séparer les protéines en fonction de leurs caractéristiques. Ainsi, associée à une immunofixation des protéines sériques et urinaires, ces examens permettront de mettre en évidence un pic unique traduisant la prolifération de l'immunoglobuline et de la typer (IgG, IgA, IgD, IgE, kappa ou lambda). Il est également possible de quantifier ces chaînes légères libres dans le sérum. Par ailleurs, d'autres protéines seront évaluées comme la lactate déshydrogénase (LDH) ou la β 2-microglobulin. (Brigle, 2017)

Les biopsies de la moelle osseuse et les myélogrammes sont nécessaires pour observer l'infiltration tumorale par les plasmocytes dystrophiques et pour la réalisation des analyses cytologiques. Les biopsies consistent à prélever une petite partie d'os contenant de la moelle, après anesthésie locale, dans la crête iliaque. (Moreau, 2013) Le myélogramme est quant à lui l'examen de référence en France, basé sur le prélèvement et l'analyse de moelle osseuse ponctionnée dans le sternum ou sur la crête iliaque postérieure.

Comme décrit précédemment, les anomalies cytogénétiques doivent être détectées et répertoriées. Le Myélogramme pourra donc être associé à des analyses cytogénétiques comme la FISH. Par ailleurs, des analyses phénotypiques peuvent être réalisées permettant de détecter les marqueurs membranaires spécifiques des plasmocytes, permettant de les quantifier mais également de suivre leur expression au cours de l'évolution éventuelle de la pathologie pour l'évaluation de la maladie résiduelle. (Moreau, 2013)

2. Critères diagnostic

Les groupes IMWG (International Myeloma Working Group) et Mayo Clinic se sont servis de tous ces éléments pour établir des critères de diagnostic entre les stades de la pathologie, MGUS, SMM ou MM, mais également de l'orienter vers d'autres types de proliférations plasmocytaires comme les cas de plasmocytomes extramedullaire, plasmocytomes solitaires ou de leucémie plasmocytaire. (Kyle, 2009) Les critères permettant de distinguer les 3 stades du MM sont décrits ci-dessous dans *Tableau 1 Critères diagnostics du MGUS, SMM et MM.*

Critères	
MGUS	Protéinémie-M <3g/dL Infiltration de la moëlle osseuse <10% Absence des critères CRAB
SMM	Protéinémie ≥3g/dL Et/ou Une infiltration ≥10% Absence des critères CRAB
MM	≥10% d'infiltration plasmocytaire dans la moëlle osseuse Présence d'une protéinurie et/ou protéinémie monoclonale HyperCalcémie ≥11.5mg/dL Insuffisance Rénale Anémie : Hémoglobine ≥2g/dL Présence de lésions osseuses (Bones)

Tableau 1 Critères diagnostics du MGUS, SMM et MM

Les caractéristiques du patient et de la pathologie impactent la survie et la réponse au traitement et peuvent se révéler pronostique. C'est pourquoi un système de stratification a été mis en place, comme le DSS dans un premier temps, puis l'ISS. (Rajkumar, 2016)

3. Classification par le Durie-Salmon staging system (DSS)

La classification de Durie est la première à être mise en place en 1975, dans l'objectif d'optimiser les stratégies thérapeutiques des patients en fonction du stade de la pathologie. Cette classification est corrélée à la masse de cellules tumorales (M-composants).

Elle est basée sur l'évaluation de paramètres biologiques associés au :

- Niveau de composant cancéreux contenu dans le sérum et/ou l'urine,
- Niveaux d'hémoglobine, de calcium et de créatinine dans le sérum,
- Du type d'Immunoglobuline (Ig) produite par le clone,
- Mais également de paramètres cliniques comme l'étendue des atteintes osseuses.

Confère le *Tableau 2* Classification selon Durie-Salmon.

	Critères	Masse tumorale (Cellules x10 ¹² /m ²)
I	<ul style="list-style-type: none"> Hémoglobine >10g/100mL Calcémie ≤12mg/100mL Structure osseuse normale ou une atteinte de type plasmocytome unique Taux d'Ig faible : IgG <5g/100mL et IgA <3g/100mL Taux de protéinurie (chaines légères) faible <4g/24h 	Faible <0.6.10 ¹²
II	Ni Stade I ni stade III	Intermédiaire 0.6-1.2.10 ¹²
III	<ul style="list-style-type: none"> Hémoglobine <8.5g/100mL Calcémie >12mg/100mL Lésions osseuses avancées Taux d'Ig élevé : IgG >7g/100mL et IgA >5g/100mL Taux de protéinurie (chaines légères) élevé >12g/24h 	Haute >1.2.10 ¹²
Sous types		
IA	Créatininémie <2mg/100mL	Basse avec fonction rénale normale
IIIB	Créatininémie ≥2mg/100mL	Haute avec fonction rénale anormale

Tableau 2 Classification selon Durie-Salmon (Durie, 1975)

Cette classification reste d'actualité, mais la deuxième classification, ISS, donne plus de détails biologiques fiables quant à la valeur pronostique.

4. Classification par l'International staging system (ISS)

L'ISS est un système de classification simple, basé sur deux paramètres, le taux de **β2-microglobuline** donnant une information sur l'importance de l'atteinte tumorale et rénale, mais également le **taux d'albumine dans le sérum** dont le taux faible traduit la présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6 spécifique du microenvironnement tumoral du MM. Défini en 2005, l'ISS permet de séparer les patients en 3 stades de la maladie comme présenté ci-dessous dans le *Tableau 3 International Staging System*.

	β2-microglobuline	Taux d'albumine	Survie médiane (mois)
ISS1	<3.5mg/L	≥3.5g/dL	62
ISS2	Ni stade 1 ni stade 3		44
ISS3	β2-microglobuline ≥5.5mg/L		29

Tableau 3 International Staging System (Greipp, 2005)

Cependant en 2014, l'IMWG met à jour ce système en basant son rationnel sur le fait que les taux d'albumine peuvent varier suivant des causes indépendantes de la maladie et donc apporter un biais à l'évaluation de l'état du patient. Ainsi après une étude menée sur 4 445 patients, il a été montré que les anomalies cytogénétiques décelées pouvaient elles aussi impacter la survie et devaient être incluses aux systèmes de classification. *Tableau 4 ISS révisé dans le Myélome Multiple.*

	Critères	Survie à 5 ans (%)
ISS1	<ul style="list-style-type: none"> • <3.5mg/L de β2-microglobuline • \geq3.5g/dL d'albumine • Pas de facteurs de risques cytogénétiques • Lactate déshydrogénase normale 	82
ISS2	Ni stade 1 ni stade 3	62
ISS3	<ul style="list-style-type: none"> • β2-microglobuline \geq5.5mg/L • Facteurs de risques cytogénétiques t(4 ;14), del(17p) • Lactate déshydrogénase élevée 	40

Tableau 4 ISS révisé dans le Myélome Multiple (Rajkumar, 2016)

Ces deux classifications sont finalement complémentaires et permettent d'obtenir un nombre important d'informations nécessaires notamment dans les essais cliniques à titre prospectif mais également dans l'amélioration des stratégies thérapeutiques. Il est donc recommandé de reporter l'ensemble des critères décrits précédemment. (Kyle, 2009)

VII. Traitements du MM

1. Les molécules de Chimiothérapies

Le traitement est historiquement composé de molécules de chimiothérapie dont l'action a pour objectif d'éliminer l'ensemble des cellules cancéreuses, en agissant sur le cycle cellulaire, sans discriminer les cellules saines et provoquant de nombreux effets secondaires souvent délétères pour le patient.

1.1. Les agents Alkylants

Dans le myélome multiple, on peut notamment parler des agents alkylants, se liant de façon covalente à l'ADN, bloquant sa réplication puis sa transcription en ARN et dont l'effet final est d'induire l'apoptose de la cellule. On trouve dans cette famille des dérivés du gaz moutarde, le **Melphalan** (Alkeran®), utilisé en injectable dans la phase d'intensification thérapeutique ou par voie orale chez les patients âgés et le **Cyclophosphamide** (Endoxan®).

1.2. Les Corticoïdes

Les molécules anticancéreuses sont associées à des anti-inflammatoires stéroïdiens dérivés du cortisol, administrés par voie orale le plus souvent. Utilisé depuis les années 50 pour leurs propriétés anti-inflammatoires, immunosuppressive et antiallergique, les corticoïdes tels que la **Prednisone** (Cortancyl®) ou la **Dexaméthasone** (Soludecadron®) sont les plus utilisées en oncologie. Par ailleurs ils apportent un bénéfice dans le traitement antiémétique, antalgiques, mais agissent également en synergie avec d'autres molécules.

Depuis les années 2000, l'arsenal thérapeutique dans le myélome a véritablement été renforcé, améliorant ainsi la prise en charge des patients, leur qualité de vie mais également leur survie. (Kumar, 2018) Ainsi, deux classes ont permis cette évolution en agissant de façon plus ciblée sur les cellules tumorales, en inhibant les cascades de signalisations responsables de leur survie, leur prolifération et leur migration.

1.3. Les Immunomodulateurs (IMiDs)

Les IMiDs, dont le rôle est de renforcer le système immunitaire du patient par une action anti inflammatoire, immunomodulatrice et anti-angiogénique. Cette classe thérapeutique est représentée pour la première fois par la **Thalidomide**, sur le marché pharmaceutique Allemand en 1957 en qualité de sédatif hypnotique, principalement utilisé comme antiémétique chez la femme enceinte. Suite à la naissance de plusieurs enfants atteints de malformations, elle est retirée du marché et ce n'est que bien plus tard qu'elle retrouve une indication en oncologie et surtout dans le myélome multiple en 1999. Elle est décrite comme inhibant le TNF- α et donc l'expression des molécules d'adhésion ; comme modulant la sécrétion de certaines cytokines comme le TNF- α , IL1 α et β , IL6, IL12 et IL8 ; comme ayant des propriétés anti angiogéniques ; ayant une action sur le complexe NF-kB ; mais aussi ayant une action sur les leucocytes et surtout les lymphocytes T en modifiant le ratio CD4/CD8 en faveur des lymphocytes T cytotoxiques. Enfin, la thalidomide bloque la prolifération tumorale en agissant sur le cycle cellulaire aboutissant à l'apoptose de la cellule. (Leleu, 2004) Le **Lenalidomide-Revlimid®**, est une molécule de deuxième génération, bénéficiant d'un effet plus puissant et d'effets indésirables moins forts que la thalidomide. Plus tard, le **Pomalidomide-Pomalyst®**, a été développé comme molécule de 3^{ème} génération, autorisé par l'EMA en 2013 en association avec la dexaméthasone chez les patients réfractaires au Revlimid® ou au Velcade® (IP). Le Pomalidomide a le même mécanisme d'action que les molécules de sa classe, mais il semblerait qu'il ait en plus un effet particulier sur l'inhibition de la synthèse d'IL6. (International Myeloma Foundation)

1.4. Les inhibiteurs de protéasome (IP)

Les IPs, thérapies ciblées bloquant l'activité du protéasome et induisant ainsi la mort des cellules myélomateuses. Cette classe est composée du **Bortezomib-Velcade®**, approuvé en 2003 par l'organisation américaine la FDA dans le MM. Il s'agit d'un inhibiteur réversible de la protéine 26S du protéasome, permettant une diminution des facteurs anti-apoptotiques, des molécules inflammatoires, des molécules d'adhésion mais également des cytokines. (Paramore, 2003) Le **Carfilzomib-Kyprolis®** est un IP de deuxième génération ayant obtenu son autorisation de mise sur le marché en 2016 et se liant de façon irréversible sur le protéasome. Il présente un avantage en bithérapie associé à la dexaméthasone par rapport au Bortezomib /Dexaméthasone en termes de survie sans progression avec un gain de 9,3 mois chez des patients ayant déjà reçu au moins une ligne de traitement. Ou encore l'**Ixazomib-Ninlaro®** premier IP réversible, administré par voie orale. Il est recommandé en association avec le Lenalidomide et la dexaméthasone.

1.5. Les nouvelles classes

En 2015, une nouvelle molécule obtient une autorisation de mise sur le marché (AMM), il s'agit du **Panobinostat-Farydak®**. Elle appartient aux inhibiteurs de l'histone désacétylase, dont la classe thérapeutique a pour rôle d'agir sur l'acétylation des histones entraînant une détente de la chromatine et l'activation de la transcription se traduisant *in vitro* par un arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose des cellules transformées. (EMA)

D'autres molécules devraient prochainement faire leur apparition sur le marché, en ciblant notamment les voies anti-apoptotiques (anti-Bcl-2/Venetoclax : actuellement en essai clinique), du fuseau mitotique (anti-KSP/filanesib) et des cyclines (anti cyclines/dinaciclib). (Kumar, 2018)

2. Stratégie thérapeutique chez les Patients au diagnostic

Alors que les stades asymptomatiques ne sont pas obligatoirement traités, les patients symptomatiques bénéficient d'une prise en charge définit par un protocole thérapeutique, dépendant de l'âge, de l'état du patient et de sa capacité à tolérer une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. (Kumar, 2018) (Manier, 2019)

2.1. Protocole chez les patients de moins de 65 ans éligibles à l'autogreffe

Pour ces patients le protocole comprend 8 mois de traitement découpé en plusieurs phases :

- La **phase d'induction**, ayant pour but d'éliminer le maximum des cellules tumorales dans la moelle osseuse en associant un IP (Bortezomib) et un IMiDs (Thalidomide ou Lenalidomide) et des corticoïdes. Cette association a remplacé la chimiothérapie de type vincristine, adriamycine, dexaméthasone en montrant de meilleurs résultats.
- Une phase de **mobilisation des cellules souches** dans le sang périphérique par l'injection du cyclophosphamide puis de facteurs de croissance granulocytaires (GCSF). Suivi de leur recueil dans l'intention de les réinjecter pour reformer la population hématopoïétique, détruite après la chimiothérapie intensive.
- Une phase de **chimiothérapie intensive**, où le patient reçoit une forte dose de chimiothérapie, généralement du Melphalan, suivie de la réinjection des cellules souche afin de limiter l'aplasie. C'est ce qu'on appelle l'autogreffe de cellules souches.
- Une **phase de consolidation**, où le patient reçoit les mêmes molécules de chimiothérapie que dans la phase d'induction.

Et enfin un **traitement d'entretien**, principalement composé de Lenalidomide pendant 24 mois en France. (Kumar, 2018) (Manier, 2019) (Moreau, 2017)

2.2. Protocoles chez les patients de plus de 65 ans inéligibles à l'autogreffe

Comme discuté plus haut, le myélome multiple est une pathologie dont l'âge médian au diagnostic est de 65ans. Un tiers des patients à traiter ne seront donc pas aptes à recevoir une greffe autologue. Le traitement de référence a longtemps été une association entre le Melphalan (M) et de Prednisone (P) chez cette population, avec une survie médiane sans progression entre 7 et 10 mois. Mais comme pour les patients plus jeunes, l'utilisation des nouvelles classes thérapeutiques IMiDs et IP en association avec le protocole MP (MPT ou VMP) ont largement amélioré les résultats pour ces patients. Plus récemment, c'est l'utilisation du Lenalidomide qui est apparu comme apportant le plus de bénéfice. Cependant, la meilleure stratégie pour cette population reste largement discutée, effectivement pour certains spécialistes les doses de chimiothérapies devraient être adaptées à la physiologie de la personne âgée et pour d'autres ils ne devraient recevoir qu'une bithérapie afin d'optimiser la balance bénéfices/risques. (Larocca, 2016) Une prise en charge adaptée aux mutations cytogénétiques est également possible, mais nous ne développerons pas ici ces possibilités.

3. Évaluation de la réponse

Une fois que le traitement est mis en place, le patient bénéficie d'un suivi dans l'objectif d'évaluer l'évolution biologique et la réponse antitumorale.

A l'origine, l'IMWG avait défini la réponse d'un patient sur l'analyse de fluides organiques (l'urine, le sérum ou les biopsies de la moelle osseuse) permettant de mettre en avant le taux de protéine monoclonale et l'infiltration plasmocytaire. Nous pouvions alors parler de réponses complète stringente, réponse complète, très bonne réponse partielle, réponse partielle, maladie stable, maladie progressive dont les définitions sont dans Tableau 5 Critères d'évaluation de la réponse thérapeutique (critères de réponse 2011) (Kyle, 2009)

<i>Catégories</i>	<i>Critères</i>
Réponse complète (CR)	Immunofixation du sérum et de l'urine négative Disparition de tissu tumoral Infiltration plasmocytaire <5% dans la moelle osseuse
Réponse complète stringente (CRs)	CR Ratio de chaînes légères circulantes normal Absence de cellules tumorales dans la moelle osseuse par immunohistochimie (IHC)
Très bonne réponse partielle (VGPR)	Protéine monoclonale M détectable par immunofixation (pas par électrophorèse) ou Diminution de la prot M dans le sérum supérieure ou égale à 90% et le dans l'urine <100mg par 24h
Réponse partielle (PR)	Réduction de la prot M de plus de 50% dans le sérum et de 90% dans l'urine ou <200mg par 24h Si ce critère ne peut être évalué, d'autres paramètres seront observés comme le ratio de chaînes légères libres, le nombre de plasmocytes dans la MO ou encore la réduction du tissu plasmocytaire.
Maladie stable (SD)	Aucun critère pour CR, VGPR, PR ou PD
Maladie en progression (PD)	Augmentation de 25% d'un ou plusieurs critères : La protéine M dans le sérum ou l'urine FLC % d'infiltration plasmocytaire Lésions osseuses Hypercalcémie

Tableau 5 Critères d'évaluation de la réponse thérapeutique

Mais avec l'apparition des molécules dont nous avons discuté précédemment et les excellentes réponses qui ont été observées, à savoir environ 75% de réponses complète, il a fallu mettre en place des critères plus fins. La réponse devient alors pronostique de la survie sans progression et de la survie globale. C'est pourquoi en 2016, l'IMWG instaure la mesure de la MRD pour **minimal residual disease** par cytométrie en flux multi-couleurs ou par analyses génétiques moléculaires comme le séquençage de gènes. Le suivi de ce paramètre se révèle être un bon biomarqueur dans l'évaluation de la réponse mais également dans l'établissement du pronostic de survie des patients. Ainsi, la maladie résiduelle négative mesurée correspond à l'absence de plasmocytes tumoraux pour 10^6 cellules de la moelle osseuse. (Moreau, 2017)

(Mailankody, 2015) Malgré les réponses biologiques, les patients présentent encore, à plus ou moins long terme, des rechutes. Elles sont définies par la réapparition de signes cliniques dans les 60 jours après l'arrêt du traitement. Certains patients peuvent être réfractaires au traitement, c'est-à-dire qu'ils ne montrent aucune réponse dans les 6 mois.

4. Stratégie thérapeutique chez les Patients à la rechute

Les traitements de la rechute sont choisis en fonction de nombreux paramètres comme l'âge, les comorbidités, le type de rechute, l'efficacité et la tolérance de la/les première(s) ligne(s), le nombre de lignes thérapeutiques précédentes, le type de réponse clinique et biologique suite au dernier traitement administré mais également la durée de cette réponse. (Moreau, 2017) Actuellement, les molécules proposées aux patients en rechute font principalement partie des classes précédemment citées et sont à base de :

- **Lenalidomide :**

Carfilzomib/Lenalidomide/Dex,

Ixazomib/Lenalidomide/Dex,

- Ou encore de **Pomalidomide :**

Carfilzomib/Pomalidomide/Dex.

Pour les rechutes très agressives, des cycles de traitement composé d'Anthracycline sont proposés. Par ailleurs, une deuxième autogreffe de cellules souches peut être envisagée chez les patients jeunes et ayant bénéficié d'une rémission profonde et de longue durée après la première greffe. (Rajkumar, 2019) Malgré de bons résultats avec ces molécules, le myélome multiple reste incurable et nécessite de nouvelles alternatives thérapeutiques pour la prise en charge des patients.

Partie 3 Immunothérapies et Thérapie Cellulaire

Le système immunitaire (SI) d'un individu lui permet de se protéger contre les agents pathogènes de type virus, bactérie ou parasite. Il peut également éliminer les cellules du soi présentant des mutations comme les cellules cancéreuses. Ainsi, lors de la progression tumorale, des mécanismes d'échappement se mettent en place et après une période de « d'équilibre », le SI peut être dépassé permettant alors la progression de la maladie.

I. Généralités sur l'Immunothérapie anticancéreuse

Ces dernières années, l'apparition de médicaments d'immunothérapie ont permis une avancée dans le traitement des patients. L'objectif principal étant d'influer sur le système immunitaire du malade, en le renforçant ou en modulant son activité pour qu'il puisse de nouveau être capable d'éliminer la tumeur tout en épargnant les cellules saines. Pour cela, plusieurs techniques sont développées comme décrit dans la *Figure 12 Différents types d'immunothérapies anti-cancéreuses*, comme l'immunothérapie passive, l'immunothérapie active spécifique ou encore l'immunothérapie adoptive.

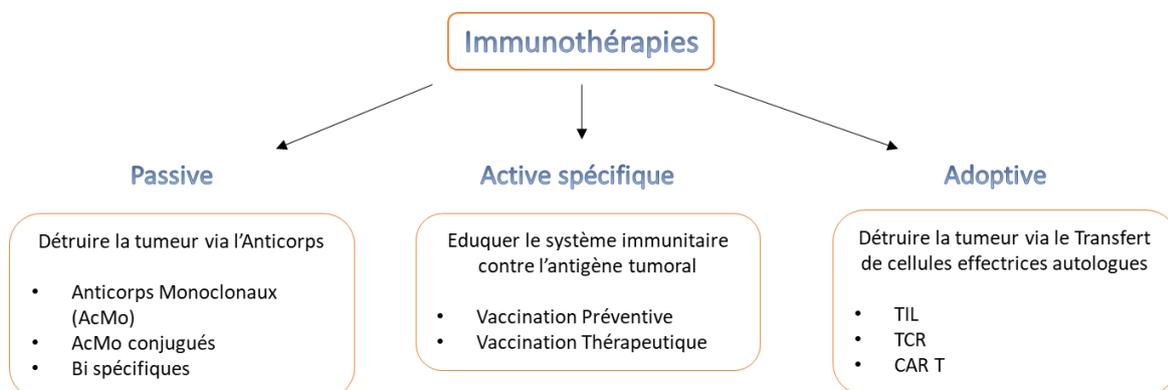


Figure 12 Différents types d'immunothérapies anti-cancéreuses

1. L'immunothérapie passive

Certaines immunothérapies agissent directement sur les cellules tumorales par l'injection de protéines synthétiques et sont dites passives. Les mécanismes d'action des Immunothérapies passives sont représentés en *Figure 13 Mécanismes d'action des Immunothérapies passives*.

1.1. Les Anticorps Monoclonaux

Les anticorps monoclonaux (AcMo), agissent en ciblant et éliminant spécifiquement les cellules présentant l'antigène tumoral choisi, en recrutant les cellules cytotoxiques, puis en les activant

par les voies du complément (CDC), de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), phagocytose facilitée ou bien par action directe. Apparus à la fin des années 90 avec le Rituximab, ils sont aujourd'hui une véritable solution pour les patients en oncologie.

1.2. *Les Anticorps Monoclonaux conjugués*

Les anticorps conjugués ou *antibody drug conjugate* (ADC) sont des anticorps monoclonaux lié de façon covalente à une molécule chimique toxique. L'objectif est de cibler spécifiquement un antigène sur les cellules tumorales grâce à l'anticorps et d'ajouter les bénéfices de l'action d'un agent toxique (toxine, chimiothérapie ou radio-isotope) pour les éliminer. Ils permettent ainsi de limiter les effets indésirables des molécules sur les tissus sains en effectuant une libération ciblée. (Tai, 2019)

1.3. *Les Anticorps Bispécifiques*

Les anticorps bispécifiques permettent de reconnaître spécifiquement deux épitopes différents. Certains Ac Bispécifiques gardent la région Fc, alors que d'autres non.

Les BiTEs ou « bispecific T-cell engager » représentent l'essentiel des Ac bispécifiques dépourvus de région Fc. Ils sont composés de deux domaines variables simple chaîne (scFv), libérés de la fraction constante des anticorps et permettant la reconnaissance de deux antigènes différents. Dans la plupart des cas, ils permettent de lier dans le même temps une cellule T par un scFv anti-CD3 et une cellule tumorale par un scFv ciblant un antigène tumoral. Ainsi, en rapprochant ces deux types cellulaires, une synapse se forme favorisant la lyse de la cellule tumorale par la cellule T (ADCC) mais également la sécrétion de cytokines par celle-ci activant par cascade d'autres cellules de l'immunité, les dirigeant contre la tumeur. (Hipp, 2017) A l'heure actuelle, seul le Blinatumomab (CD3/CD19) est autorisé par la FDA dans la leucémie aigüe lymphoblastique en rechute.

Il faut noter que d'autres formats existent notamment avec les BiKE utilisant l'ADCC des cellules NK, ou bien les TriKE ajoutant un domaine codant pour l'IL-15 permettant une survie prolongée de la molécule.

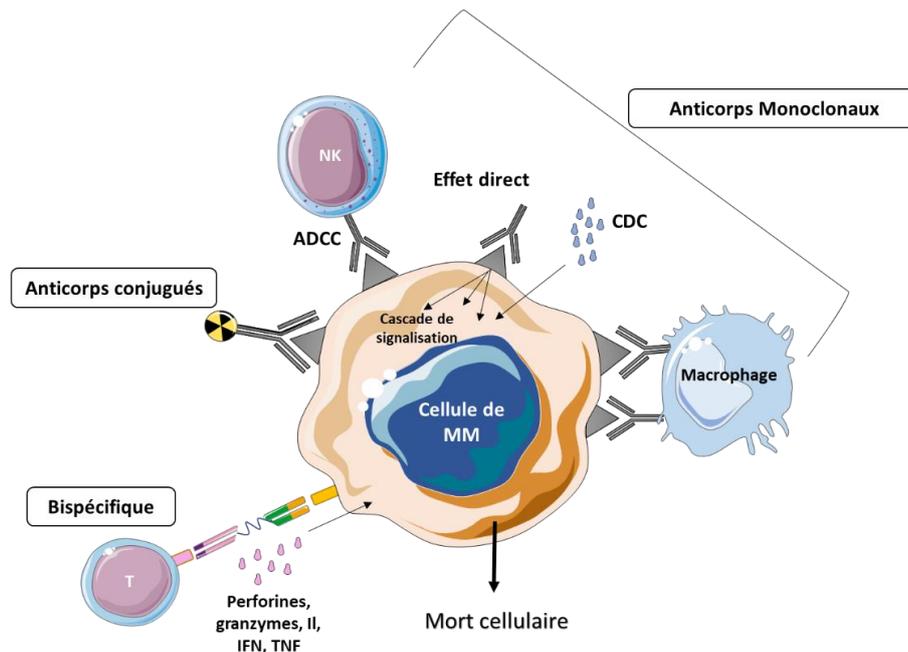


Figure 13 Mécanismes d'action des Immunothérapies passives

Adapté de (Nishida, 2019) (Kerjean, 2020)

2. L'immunothérapie Active

D'autres Immunothérapies sont dites actives, car c'est le système immunitaire du patient lui-même qui éliminera la tumeur. Plusieurs stratégies sont possibles, soit il sera activé après avoir été « éduqué » par des méthodes de vaccination préventive et/ou thérapeutiques.

Comme pour les vaccinations conventionnelles, il s'agit en fait d'immuniser le patient contre un antigène spécifique d'un certain type de cancer, qu'il soit déclaré ou non.

Soit il sera réactivé grâce à l'action d'AcMo inhibant les voies de control, on parle alors d'inhibiteurs de chekpoint. Cette stratégie a déjà montré son efficacité dans le traitement du cancer avec la mise sur le marché d'Ac anti-CTLA4, PD1 ou PDL1. (Sharma, 2015)

Nous ne développerons pas les détails de cette stratégie ici.

II. Immunothérapie adoptive et cellules T

Mais celle qui nous intéressera principalement dans ce travail est l'immunothérapie par transfert de cellules ou immunothérapie adoptive. Elle a pour objectif d'utiliser les cellules effectrices de l'immunité du patient en les prélevant au sein de la tumeur ou dans le sang périphérique, de les sélectionner/modifier, les faire proliférer et de les réinjecter. Plusieurs techniques sont actuellement disponibles, dont la plupart utilisent les cellules T. Il faut savoir que certaines études portent maintenant sur l'utilisation des cellules de l'immunité innée comme les Natural Killer (NK).

1. Transfert adoptif de Cellules T

Le transfert adoptif de cellules T regroupe trois stratégies.

1.1. Les TILs

Dans un premier temps, c'est la stratégie des TIL ou *Tumor Infiltrating Lymphocyte* qui a été développée dans le Mélanome. Elle est basée sur le fait que des lymphocytes T intra tumoraux restent spécifiquement actifs contre l'antigène. Ces cellules sont donc prélevées, activées et expansées *ex vivo*, puis réinjectées au patient.

En les cultivant à l'extérieur du patient, ces cellules ne sont pas soumises aux mécanismes d'inhibition de l'environnement tumoral et il est donc possible de rendre disponible un « pool » de cellules T « éduquées » pour éliminer la tumeur. (Robbins, 2017)

Malheureusement, elles ne restent pas toutes immunocompétentes et peuvent nécessiter une modification génétique leur permettant de reconnaître les cellules cibles en choisissant l'antigène le plus propice à l'élimination de la tumeur. Pour cela, il existe deux écoles, la modification des cellules en y ajoutant un TCR modifié génétiquement ou en y ajoutant un récepteur antigénique artificiel avec les CARs.

1.1. Les TCRs

Ainsi comme pour les TILs, les cellules T sont prélevées chez le patient, activées *ex vivo*, modifiées génétiquement pour exprimer à leur surface un récepteur T artificiel dirigé contre un antigène de choix, de façon dépendante du CMH. L'avantage de cette stratégie est qu'elle permet de reconnaître des molécules antigéniques internalisées.

1.2. Les Récepteurs chimériques des Ly T

Les capacités lytiques des T peuvent également être redirigées indépendamment du CMH grâce à une protéine synthétique de fusion permettant l'expression d'un scFv à la surface de la cellule pour qu'il reconnaisse l'antigène cible sur la cellule tumorale. Les CARs sont classés comme « médicaments de thérapie innovant » (MTI).

2. Les Récepteurs Antigéniques Chimériques (CAR T)

Ici nous allons donc développer cet aspect de l'immunothérapie adoptive.

2.1. Structure

Le CAR est donc composé d'un domaine extracellulaire constitué par le récepteur scFv d'une immunoglobuline, provenant généralement d'un anticorps monoclonal murin ou humain, d'un

hinge, constitué par CD8 α , CD28, IgG1 ou IgG4, dont le rôle est de donner plus d'espace et de flexibilité au scFv lors de sa fixation à l'antigène. Mais également d'un domaine transmembranaire, pouvant être constitué de CD28, CD4 ou CD8 α et d'un domaine d'activation intracellulaire constitué de la chaîne ζ du CD3. *Figure 14 Composition d'un CAR (Adapté de Maude, 2015)*

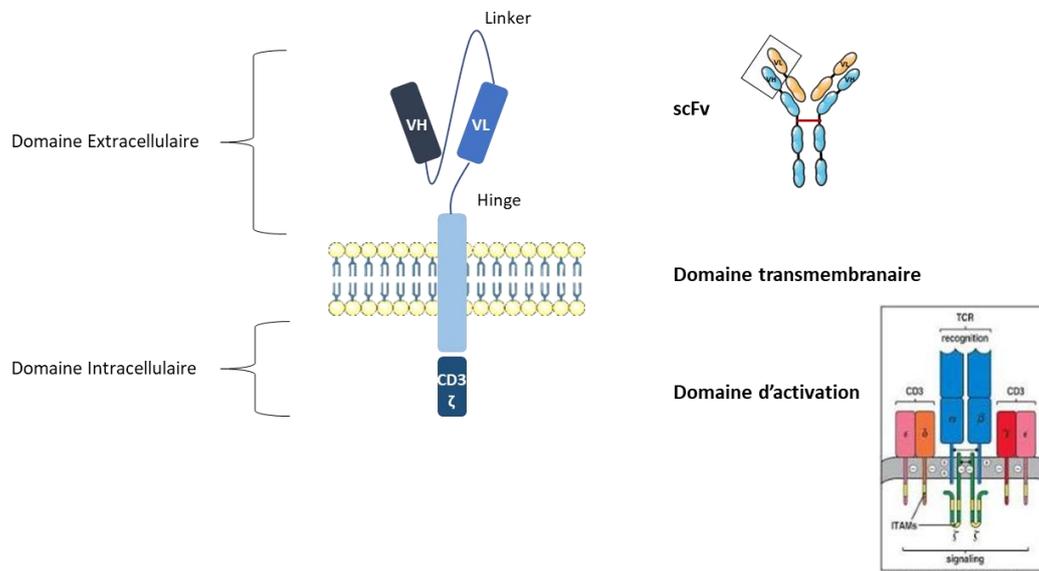


Figure 14 Composition d'un CAR (Adapté de Maude, 2015)

2.2. Générations

Mais alors que ces CARs de première génération montrent des résultats limités *in vivo*, en termes de persistance, d'expression et de fonction, leur structure est modifiée pour ajouter des domaines de costimulation. Effectivement, le CD3 ζ ayant pour rôle d'activer et d'induire la prolifération des cellules T, ce sont les signaux de costimulation qui améliorent les propriétés répliquatives et de persistance de ces cellules.

C'est donc par l'ajout des domaines CD28 ou 4-1BB qu'apparaît la deuxième génération, puis la troisième lorsque deux signaux de costimulation sont associés cf *Figure 15 Structure des différentes générations de CARs*. La dernière génération de CARs quant à elle, couple le CAR de deuxième génération à un transgène codant pour une cytokine inductible, notamment l'IL-12. Ces CARs en plus de l'activité cellulaire médiée par le lymphocyte T, permettent une action sur l'environnement tumoral grâce aux cytokines, ce qui se révèle être l'un des enjeux majeurs du traitement des tumeurs solides. (Chmielewski, 2015)

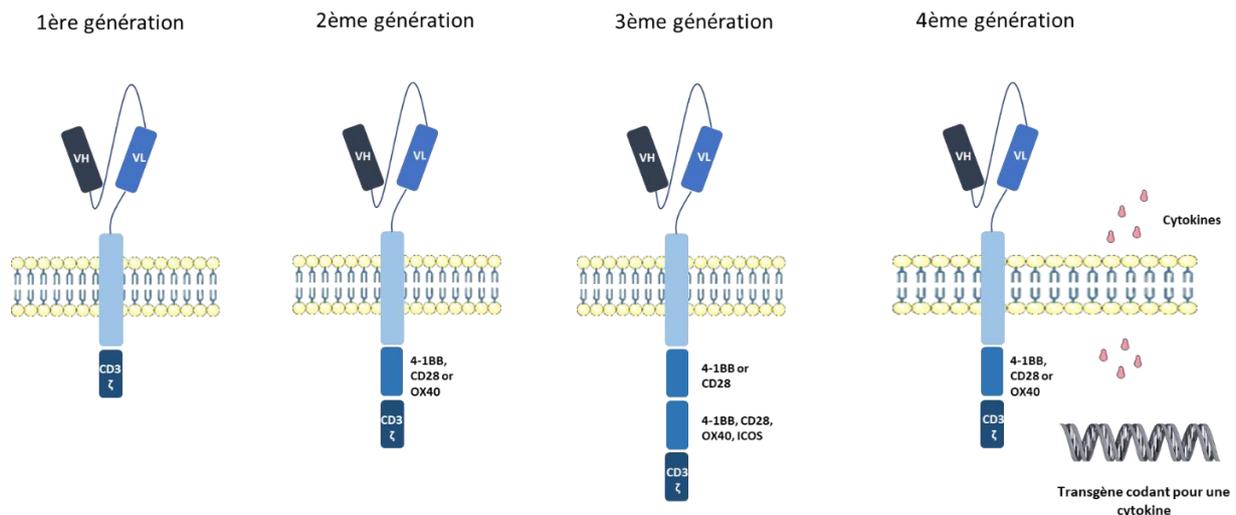


Figure 15 Structure des différentes générations de CARs

(Adapté de Maude, 2015 et de Chmielewski, 2015)

A noter qu'actuellement la majorité des essais cliniques en onco-hématologie sont réalisés avec des CARs de 2^{ème} génération.

2.3. La production des CAR T

Une fois que la cible est identifiée et l'antigène isolé, l'objectif est de faire exprimer la protéine de fusion par les cellules T. Elle se divise en plusieurs étapes que nous allons détailler brièvement ci-dessous.

Isolation des cellules d'intérêt : Les lymphocytes T des patients sont récupérés et isolés à partir des cellules mononuclées provenant du sang périphérique par cytophèrese et envoyées au centre responsable de la fabrication du produit fini.

Activation et culture : Elles sont ensuite activées *ex vivo* selon un protocole de culture défini. Initialement, les cellules étaient stimulées via un anticorps monoclonal soluble anti-CD3, mais le résultat n'était pas satisfaisant. Par la suite, il a été observé que l'association d'anticorps anti CD3 et CD28 immobilisés sur une surface était moins cher et plus efficace. Les deux méthodes les plus utilisées sont les Dynabeads® proposant comme support des microbilles magnétiques et le Transact® constitué de particules biocompatibles et plus petites. Le milieu de culture est également enrichi avec des cytokines comme l'IL2, l'IL7 ou encore l'IL15.

Transduction : Plusieurs moyens de vectorisation peuvent être utilisés lors de la transduction du gène d'intérêt. Les γ -Rétrovirus et les Lentivirus, sont les plus utilisés et les plus connus, ils ont montré une capacité de transduction élevée et sûre, il faut tout de même noter qu'ils doivent être privés de leurs facultés répliquatives mais également bénéficier d'un suivi en clinique. Cette méthode ne nécessite qu'une incubation des cellules activées et des particules virales.

Il est également possible d'utiliser des techniques non virales comme le Sleeping Beauty ou PiggyBac utilisant des transposon/transposase transfectés dans le génome de la cellule par de l'électroporation, perméabilisant la membrane.

Expansion et Injection : Les CAR T sont alors expandus, puis réinjectés au patient après qu'il ait reçu un régime de lymphodéplétion. Ce traitement est essentiel à la prise de greffe puisqu'il élimine les lymphocytes circulant, améliorant ainsi la prolifération, la persistance et l'efficacité clinique des CAR T. (Gee, 2018)

Les cellules peuvent également provenir de donneurs sains, il s'agit alors d'une stratégie allogénique. Nous détaillerons ce type de stratégie plus tard dans ce manuscrit. *Figure 16 Cycle de production des cellules CAR T*

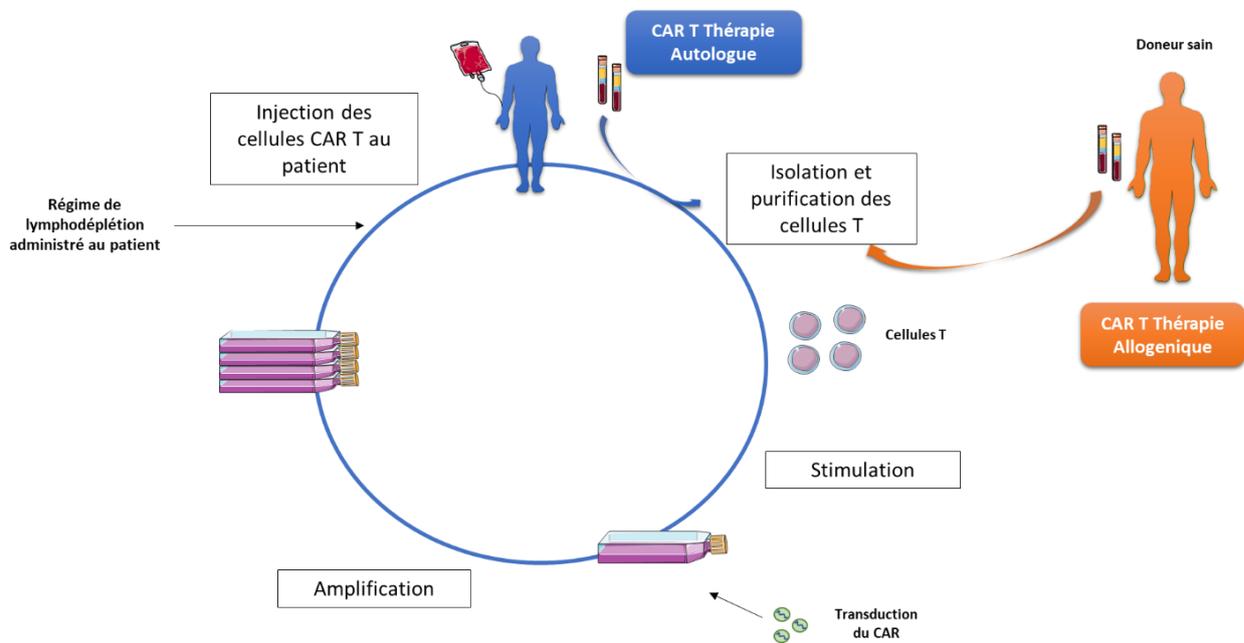


Figure 16 Cycle de production des cellules CAR T

III. CAR T en Oncohématologie

Pour qu'elle soit appliquée en clinique, cette technique nécessite la sélection d'un antigène dit « idéal ». Il devra être exprimé sur toutes les cellules tumorales, qu'il soit facile d'accès, qu'il joue un rôle dans la survie de la tumeur mais surtout qu'il soit spécifique des cellules à éliminer.

1. CD19, l'antigène de référence

L'antigène le plus opportun était donc dans un premier temps le CD19.

Il s'agit d'une glycoprotéine de surface, exclusivement exprimée lors du développement des lymphocytes B. (Wang, 2012) (Schroeder, 2008) (Paiva, 2016) Exprimé de façon homogène

dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) ou chroniques (LCL) et les lymphomes non Hodgkinien, CD19 est considéré comme rare dans les autres hémopathies malignes, notamment dans le myélome, dans lequel environ 5% des patients expriment cette protéine, associée à un mauvais pronostic. (Mateo, 2008) (Maude, 2015) Trois CARs anti-CD19 sont actuellement sur le marché en France et les résultats de leurs études sont regroupés dans le Tableau 6 Données cliniques des CAR T commerciaux.

1.1. Kymriah®-Tisagenlecleucel (Novartis)

Kymriah® est un CAR de 2^{ème} génération (4-1BB) autologue, constitué d'un épitope anti-CD19 murin. Deux études cliniques ont permis l'obtention des AMMs en 2018, il s'agit d'ELIANA pour la LAL B et de JULIET pour le LDGCB. ELIANA est réalisée chez des enfants et jeunes adultes en rechutes ou réfractaires aux traitements de la LAL B. (Maude, 2018) Par ailleurs, JULIET est une étude de phase 2 réalisée chez des adultes en rechutes ou réfractaires aux traitements du LDGCB. (Schuster, 2018)

1.2. Yescarta®- Axicabtagene (Gilead)

Yescarta® est un CAR de 2^{ème} génération (CD28) autologue, constitué d'un épitope murin anti-CD19. Il est transduit par vecteur rétroviral et est autorisé dans le traitement du LDGCB chez l'adulte en rechute ou réfractaire après au moins 2 lignes de traitement. L'AMM a été obtenue en 2017, grâce aux résultats de l'étude pivot ZUMA-1. ZUMA-1 est réalisée chez des adultes en rechutes ou réfractaires aux lignes de traitement précédentes. (Neelapu, 2017)

1.3. Tecartus®- Brexucabtagene autoleucel (Gilead)

Tecartus® est un CAR de 2^{ème} génération présentant le même design que Yescarta® et autorisé dans le traitement du lymphome à cellules du manteau (LCM) chez l'adulte, en rechute ou réfractaire après au moins 2 lignes de traitement, ayant potentiellement reçu un anti-CD20. L'AMM a été obtenue en 2020, grâce aux résultats de l'étude pivot ZUMA-2. ZUMA-2 est réalisée chez des adultes en rechutes ou réfractaires aux lignes de traitement précédentes. (Wang, 2020)

	Kymriah®		Yescarta®	Tecartus®
Etude	<i>ELIANA</i>	<i>JULIET</i>	<i>ZUMA-1</i>	<i>ZUMA-2</i>
CAR T	Anti CD19 4-1BB Lentivirus		Anti CD19 CD28 Rétrovirus	Anti CD19 CD28 Rétrovirus
Pathologie	LLA	LDGCB	LDGCB	LCM
Age Médian	11	56	58	65
Lignes de traitement en moyenne	3	3	3	5
Taux de réponse (%)	81 à 3 mois	52 à 3 mois	82 à 6 mois	93 à 7 mois
Survie Globale (% à 12mois)	80	48	60	83
Survie sans progression (% à 12mois)	50	35	45	61
Durée de la rémission (% à 12 mois)	60	60	50 (pour les patients présentant une réponse)	60

Tableau 6 Données cliniques des CAR T commerciaux

D'une façon générale, nous pouvons observer que les résultats obtenus par les CAR T anti-CD19 sont bons avec des taux de réponses entre 50 et 90% cf Tableau 6 Données cliniques des CAR T commerciaux et qu'ils sont indépendants de la pathologie, l'âge ou encore le type de construction utilisée. Par ailleurs, ces études ont permis de mettre en évidence que la persistance des CAR T était liée à l'aplasie B ainsi qu'à la durée de la réponse.

2. Tolérance des CAR T

Cette stratégie nécessite un suivi accru du patient notamment lors de la phase de prolifération aigüe des cellules entre le 7^{ème} et le 14^{ème} jour post infusion, afin de traiter au plus vite les effets indésirables dont les plus fréquents sont les relargages cytokiniques, les toxicités neurologiques et les aplasies B.

2.1. *Syndrome de relargage cytokinique (CRS)*

Le CRS est l'effet secondaire le plus fréquent, dont la toxicité peut être la plus sévère. Il s'agit d'un évènement inflammatoire influencé par la prolifération des T et l'élimination de cellules tumorales, libérant principalement de l'IL-6, du TNF α et de l'IFN γ . Ce lien entre l'augmentation de cytokines et la diminution des cellules cible, laisse penser que plus le patient est répondeur plus il aura de risque de développer un CRS. Les principaux symptômes sont assimilés à un syndrome grippal (fièvre, asthénie...) mais peuvent aller jusqu'à la défaillance multiviscérale nécessitant des soins intensifs. Les principaux traitements utilisés sont le Tocilizumab (anti-IL6) et les corticoïdes pour leurs propriétés antiinflammatoires.

2.2. Toxicité neurologique

Les encéphalopathies intervenant dans le contexte des CAR T sont généralement de faible intensité et réversibles. Le processus de leur apparition est encore mal connu mais pourrait avoir un lien avec le CRS. Cette toxicité se résout souvent sans intervention médicale, mais peuvent nécessiter dans certains cas des antiépileptiques préventifs ou curatifs.

2.3. Aplasie B

Cet effet indésirable est directement lié avec l'effet des CAR T puisque dans les CAR T anti-CD19 l'objectif est d'éliminer les cellules CD19⁺, donc la lignée B. Une aplasie B peut durer de quelques semaines à plusieurs années et est un paramètre variable selon les patients. C'est un critère de suivi dans l'évolution des CAR T chez le patient mais également de la pathologie. Ce déficit en lymphocyte B est caractérisé par le manque d'anticorps protecteurs pouvant provoquer des infections chez les patients, justifiant un traitement substitutif en immunoglobulines polyvalentes. D'autres effets indésirables peuvent également être cités comme le syndrome de lyse tumoral ou l'anaphylaxie. (Maude, 2015) (Maus, 2013)

3. Rechutes

Nous avons aujourd'hui suffisamment de recul pour affirmer que sur les patients répondeurs, 30 à 50% rechuteront dans l'année suivant l'administration du traitement. (Shah, 2019)

Deux types de rechutes sont observables, celles où l'antigène reste exprimé par les cellules tumorales (CD19⁺) et celles où l'expression de l'antigène diminue voire disparaît totalement (CD19⁻). Ces mécanismes de rechute mènent à des réflexions pour améliorer la stratégie thérapeutique et proposer des solutions aux patients.

3.1. Rechutes CD19⁺

Ces rechutes représentent 75 à 91% des LAL et 67% des lymphomes. Il s'agit généralement de rechutes intervenant dans les premiers mois suivant l'infusion, après une rémission, associées à un manque de persistance des CAR T et une aplasie B transitoire. La persistance limitée étant probablement liée à la qualité des cellules T utilisées pour la transduction, leur phénotype ou aux propriétés structurelles du CAR. (Song, 2019)

Les Aspects structurels du CAR

Trois paramètres peuvent influencer sur la capacité du CAR à fournir une réponse optimale.

Tout d'abord, la liaison du CAR à sa cible qui va être impactée par le choix du *scFv*. Effectivement, de par sa conformation, l'encombrement stérique et son affinité pour l'antigène il peut moduler l'action du CAR T. Une forte affinité est associée à une dissociation plus lente de la cible, permettant une activation optimale et durable de la cellule effectrice. Mais une affinité trop forte pourrait entraîner des effets indésirables sur des cellules exprimant l'antigène en dehors de la tumeur. Ensuite, le choix du *hinge* et du *domaine transmembranaire* impactant la stabilité et l'activité du CAR, en donnant de la flexibilité à la liaison antigénique. Enfin, les domaines de costimulation, dont les plus étudiés sont CD28 et 4-1BB, pouvant jouer un rôle primordial dans la persistance du CAR T. Le CD28 est associé à une réponse rapide, une prolifération des CAR T de phénotype majoritairement effecteur mémoire (EM), mais dont la persistance est limitée. A l'inverse, le 4-1BB diminue l'efficacité mais améliore la persistance en promouvant le développement de T centraux mémoires (CM) et diminue le risque d'effet indésirable lié aux cytokines. (Sadelain, 2017) (Rafiq, 2020) (Kalos, 2011)

Aspects fonctionnels du T

La qualité des cellules T injectées est donc primordiale. Effectivement, il a été mis en évidence que les résultats des études CAR T dans la LAL montrent des réponses de meilleure qualité par rapport à celles obtenues dans les LCL/les lymphomes. Cela peut être expliqué par plusieurs hypothèses. Tout d'abord que la moyenne d'âge des patients traités est plus élevée dans les LLC/lymphomes, donnant ainsi une proportion de lymphocytes EM plus élevée, connus pour leurs capacités à sécréter des protéines pro-tumorales et anti-apoptotique. (Singh, 2019) Que le nombre de lignes de traitement peut aussi avoir un impact sur l'efficacité lytique des T, puisque les chimiothérapies de type cyclophosphamide et cytarabine réduisent la proportion de cellules T naïves, essentielles à la prolifération et donc la production de CAR T de qualité. (Shah, 2019) Ainsi, plusieurs axes d'optimisations seraient envisageables, comme modifier le ratio CD4/CD8, prendre des cellules T avec un phénotype moins « exhausté » et moins différencié, ou utiliser des cellules de donneur sains. Certaines équipes proposent de réinfuser les patients avec le traitement, avec pour rationnel que la tumeur est encore CD19+. Mais pour la plupart des patients, aucune re-expansion n'est observée.

3.2. Rechutes CD19-

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cet échappement, comme notamment une modification structurale de l'antigène, une mutation ou un épissage alternatif, une diminution

de la densité antigénique, un phénomène « d'epitope masking » ou encore un changement de lignée tumorale « lineage switching ». (Song, 2019)

La stratégie actuellement adoptée lorsque l'antigène disparaît, est de cibler un autre antigène. Dans la LAL il s'agit principalement de CD22, induisant 73% de réponse complète sur des patients en rechute CD19⁺. Cependant 63% des patients rechutent avec un phénotype CD22⁺ ou diminué, laissant penser que cette stratégie est efficace à court terme. (Cheng, 2019) Sont alors apparues des stratégies ciblant plusieurs antigènes, notamment CD19/CD22, dont les résultats montrent une rémission complète chez les patients. Malheureusement, ces résultats ne sont pas pérennes et montrent des rechutes potentiellement CD19⁺/CD22⁺. (Drai, 2020)

Par ailleurs, l'environnement tumoral majoritairement régulateur peut inhiber l'activité des CAR T. Plusieurs options sont envisageables pour contrer cette inhibition, à savoir l'utilisation de CAR de 4^{ème} génération synthétisant des cytokines immunomodulatrices, l'association de CAR T et d'immunothérapies anti checkpoint (anti-PD1 ou anti-CTLA-4) ou encore d'éteindre l'expression de PD1 sur les CAR T. (Cheng, 2019)

IV. Indications dans les tumeurs solides

Malgré de bons résultats dans le traitement des cancer hématologiques, l'utilisation des CAR T dans les tumeurs solides présente de nombreux facteurs limitants associés à ses caractéristiques constitutionnelles. Effectivement la tumeur solide est hétérogène, compacte, difficile d'accès, présente une vascularisation intra tumorale faible en faisant un environnement hypoxique. Mais de par sa constitution, la tumeur est également limitée en antigènes spécifiques ne provoquant pas d'effets cibles-hors tumeur. Ainsi, pour le moment la plupart des essais cliniques dans ce domaines n'apportent pas de solutions thérapeutiques aux patients. (Rafiq, 2020) (Sadelain, 2017)

Partie 4 Immunothérapies dans le MM

Dans le myélome multiple, le développement des immunothérapies débute par la mise sur le marché de deux anticorps monoclonaux dont les cibles sont CS1 et CD38.

I. CS1

1. La cible

CS1 (CRACC, CD319 ou SLAMF7) est un membre de la famille des Signaling lymphocytic activation molécule (SLAM), composée de 9 membres. (Sondergeld, 2015) (Gogishvili, 2017) (Malaer, 2018). Codée par le chromosome 1 (1q23.1-1q24.1), elle appartient à la famille des immunoglobulines de type I possédant un domaine constant et un domaine « pseudo » variable extracellulaire, et un ou plusieurs motifs à tyrosine (Immunoreceptor tyrosine-based switch motifs ITSMs) intracellulaire. (Veillette, 2010) (Boudreault, 2016) Au cours de l'évolution, de nombreux polymorphismes ont été observés au sein de cette famille, à l'origine de maladie auto-immunes comme le Lupus Erythémateux. Par ailleurs, il a été mis en avant qu'une mutation au niveau des protéines associées aux SLAM (SLAM associated protein-SAP) et interagissant avec les domaines tyrosine des régions cytoplasmiques, pouvait entraîner un syndrome lymphoprolifératif lié à l'X, caractérisé par une déficience de la réponse immunitaire face à l'Epstein Barr Virus. Ceci confirmant que ces récepteurs sont impliqués dans la régulation du système immunitaire.

CS1 a d'abord été caractérisé comme un récepteur des cellules NK, avant d'être identifié comme un chaînon de la réponse immunitaire. (Malaer, 2018) Fortement exprimé sur des plasmocytes normaux et myelomateux, il l'est également en proportion plus faibles sur d'autres cellules lymphoïdes comme les NK, les lymphocytes T CD8 (une petite partie des T CD4), les macrophages et les cellules dendritiques. (Hsi, 2008) (Gogishvili, 2017) Cependant, il n'est pas exprimé sur les cellules non lymphoïdes, ni sur les cellules souches, faisant de lui une cible spécifique des immunothérapies anticancéreuses. Il faut également noter que CS1 permet de limiter les effets indésirables liés aux réactions sur cibles hors tumeur (on target/off tumor). Dans le myélome multiple, 95% des plasmocytes de la moelle osseuse de patients expriment CS1, quel que soit l'anomalie génétique à l'origine de la prolifération tumorale ou le stade de la pathologie. (Lonial, 2015)

2. Les Immunothérapies anti-CS1

2.1. Anticorps monoclonaux

L'**Elotuzumab-Empliciti**® est un anticorps monoclonal humanisé anti-CS1, ayant obtenu l'AMM en 2016. Il agit en induisant la mort des cellules tumorales par un mécanisme d'ADCC par les cellules NK et une phagocytose facilitée. (Lonial, 2015) (Ritchie, 2017) Il est recommandé aux US en association au Lenalidomide/Dexaméthasone dans le traitement des patients ayant reçu au moins une ligne de traitement. (Kumar, 2018)

ELOQUENT II (CA 204004) est l'étude de phase III ayant permis d'étudier son efficacité en association avec le Lenalidomide/Dexaméthasone. Ici, les patients sont randomisés en deux bras, l'un recevant l'Elotuzumab, le Lénalidomide et de la Dexaméthasone (Elo-Ld) et l'autre exclusivement du Lenalidomide et de la Dexaméthasone. (Ld) Les résultats de cette étude montrent un taux de réponse (ORR ou Overall Response Rate) en faveur de l'association Elo-Ld 79% vs 66% pour Ld et une survie sans progression (PFS ou Progression Free Survival) de 41% à 2 ans vs 27% pour le bras témoin. A 3 ans ce traitement permet une réduction du risque de progression de 27% par rapport au groupe contrôle comme décrit dans la *Figure 17 Survie sans progression ELOQUENT 2* . (Rasche, 2017)

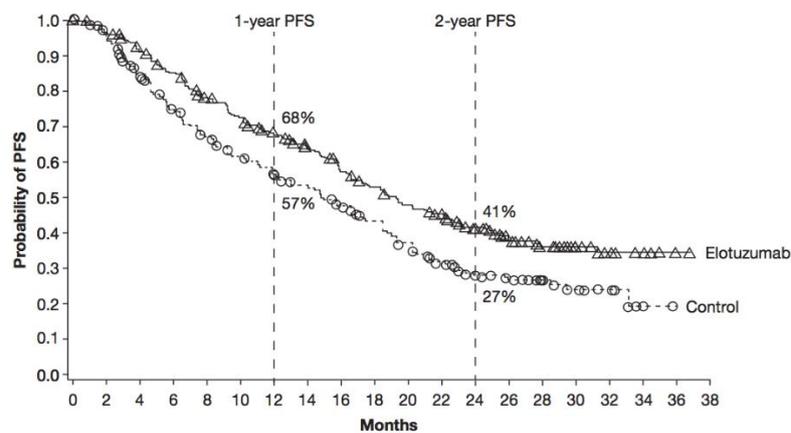


Figure 17 Survie sans progression ELOQUENT 2 (Ritchie, 2017)

L'Elotuzumab montre un intérêt mesuré dans son action anti cancéreuse et ne semble être efficace qu'en synergie avec le Lenalidomide. Sur ces résultats et sur le potentiel que représente CS1 en tant qu'antigène associé, d'autres immunothérapies ont été développées avec pour objectif d'optimiser la lyse tumorale.

2.2. Anticorps Bi spécifiques

Anti CS1-CD3

Constitué du scFv de l'Elotuzumab, il montre *in vitro*, une activité lytique spécifique des cellules CS1+, supportant le rationnel d'un développement en clinique. (Huang, 2019) Pour le moment, aucun essai clinique n'est enregistré.

Anti CS1-NKG2D

Chan et Al ont développé un anticorps bi spécifique ciblant CS1 et NKG2D, connu pour être exprimé sur plusieurs types cellulaires responsables des réponses immunitaires comme les NK, les cellules T CD8+, les cellules T $\gamma\delta$ et les NKT. Les résultats des tests pré cliniques montrent une bonne efficacité anti tumorale sur les lignées exprimant fortement CS1. Ces résultats montrent un rationnel pour un test clinique. (Chan, 2018)

2.3. CAR T anti-CS1

C'est en 2014 que le premier CAR anti-CS1 est développé dans le traitement du MM par Chu et Al. C'est avec un CAR de deuxième génération associant CD28 et CD3Z et transduit par un Rétrovirus que ce laboratoire montre *in vitro* et *in vivo* une bonne efficacité dans l'élimination de cellules issues de lignées tumorales. (Chu, 2014) Par la suite, Gogishvili et Al propose un CAR associant le scFv de l'Elotuzumab, le CD28 et un domaine tronqué de l'EGFR, permettant de suivre et d'éliminer le CAR en cas de nécessité. Les résultats montrent *in vivo* une efficacité supérieure à l'anticorps monoclonal. Cette étude met en évidence l'effet fratricide des CAR anti-CS1 sur les autres cellules T, mais propose également des perspectives d'amélioration via l'humanisation du scFv ou la modification du domaine de co stimulation par 4-1BB. (Gogishvili, 2017) Par ailleurs, aux vues des résultats de l'Elotuzumab en association avec une molécule chimique, Wang et Al a développé des essais pré-cliniques évaluant l'effet d'un CAR anti-CS1 de 2^{ème} génération (CD28-CD3Z+ tEGFR) en combinaison avec du Lenalidomide. Ce groupe montre que cette molécule favoriserait le phénotype mémoire des cellules T, le développement des T CD8+, mais avait également un effet co-stimulant augmentant la sécrétion de cytokines. Appuyant ainsi la co-administration en clinique. (Wang, 2017)

Sur ces bases, une étude clinique utilisant un CAR T anti-CS1 autologue est actuellement en cours. Il s'agit d'une phase 1 (NCT03710421) ayant pour objectif d'étudier un CAR de 2^{ème} génération (4-1BB) associé à un « safety switch » constitué d'EGFR tronqué. Cette étude est réalisée sur des patients ayant reçu au moins 3 lignes de traitement.

Par ailleurs, un projet européen nommé CARAMBA, réunit 4 sites pour une phase I/II évaluant un CAR anti-CS1 de 2^{ème} génération (CD28 ou 4-1BB) associé à un EGFR tronqué, transduit par une méthode non virale, le « sleeping beauty » utilisant des transposons. Débutée en Janvier 2018, cette étude devrait recruter cette année pour la phase I. (CARAMBA, 2020) <https://www.caramba-cart.eu/the-project/>

Basé sur le rationnel de l'utilisation des NK, il faut noter que le groupe Chu et al a développé un CAR NK anti-CS1 en pré-clinique. (Chu, 2014)

II. CD38

1. La cible

CD38 est une glycoprotéine transmembranaire de type 2 et codée par le chromosome 4. (Malavasi, 1994) (Deaglio, 2001) (Poret, 2015) Initialement décrit comme marqueur de différenciation de la lignée lymphoïde, CD38 est exprimée à la surface des lymphocytes T et B activées, des cellules dendritiques mais également des NK. Par la suite, il est également décrit comme appartenant à la famille d'enzymes multifonctionnelles, responsables du cycle de l'Adénosine diphosphate (ADP) et essentielles dans plusieurs processus physiologiques. Il tient ainsi un rôle de récepteur et d'ecto-enzyme. (Deaglio, 2008) Effectivement, CD38 est impliqué dans le catabolisme de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et de la NAD Phosphate (NADP), substrats importants dans la génération de l'ADP-ribose circulaire (cADPR). Il faut noter que ces molécules sont essentielles dans la régulation du Ca²⁺ intracellulaire, nécessaire à la prolifération lymphocytaire, à la fonction cardiaques ou intestinale. (Quarona, 2013) (Deaglio, 2008)

En tant que récepteur, son activité a été montrée grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques et de son ligand CD31. Sa fonction permet l'activation et la prolifération de plusieurs lignées, mais également de moduler l'expression du TCR, du BCR, ou du *CMHII*. (Ferrero, 1997)

Figure 18 Représentation schématique de l'activité de CD38 chez l'Homme

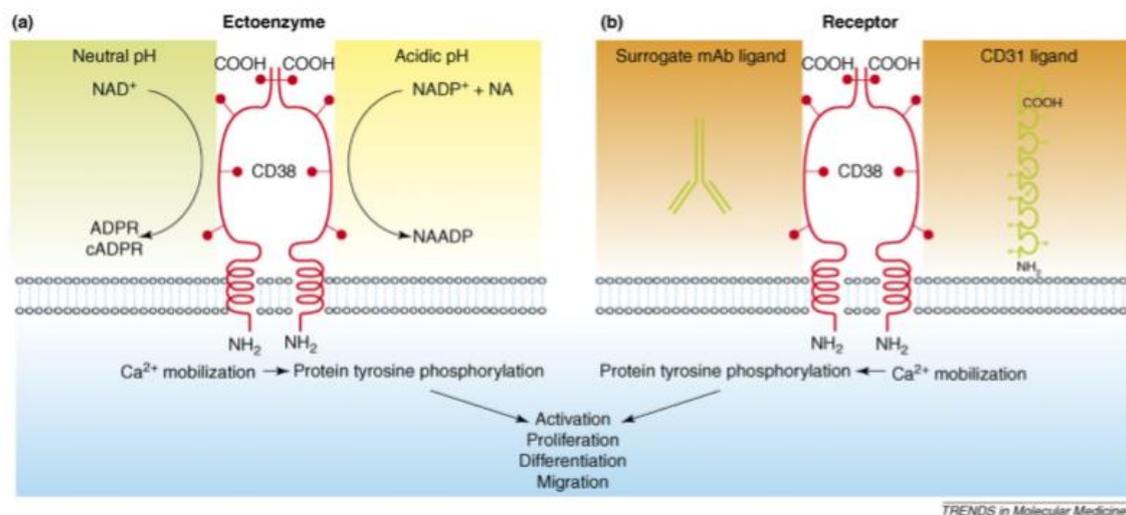


Figure 18 Représentation schématique de l'activité de CD38 chez l'Homme (Deaglio, 2008)

Plus récemment, CD38 a également été associé à l'adhésion et à la migration cellulaire. Grâce à la fixation de son ligand CD31, provoquant l'augmentation d'intégrines intracellulaires activant la cascade moléculaire liée à l'adhésion. (Deaglio, 2008) Son expression n'est pas restreinte aux cellules lymphoïdes, il est aussi présent, plus faiblement, à la surface des cellules myéloïdes et des cellules non hématopoïétiques (cerveau, yeux, prostate, pancréas, muscles ou reins). (Deaglio, 2008) Il a été montré que CD38 était fortement exprimé sur les plasmocytes tumoraux et plus faiblement sur les monocytes et les ostéoclastes progéniteurs. (Morandi, 2018)

2. Les Immunothérapies anti-CD38

2.1. Anticorps monoclonaux

Le **Daratumumab-Darzalex®** est un anticorps monoclonal anti-CD38 humain, ayant obtenu l'AMM en 2018. Il agit en induisant la mort des cellules tumorales par CDC, l'ADCC et phagocytose facilitée. Il a également une activité immunomodulatrice en inhibant l'activité des Tregs, des Bregs ou des cellules myéloïdes (myeloid-derived suppressor cells : MDSC), permettant ainsi de réactiver l'activité lytique des cellules T. **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** (Van de Donk, 2018) Le Daratumumab est principalement recommandé en association avec le Melphalan, les IMiDs, les IP et les corticoïdes. Chez les patients nouvellement diagnostiqués, ayant reçu au moins une ligne de traitement, mais également en monothérapie pour les patients réfractaires aux classes thérapeutiques précédemment citées. (Agence Européenne du Médicament, 2016) Deux études de phase III étudient l'efficacité du Daratumumab en association, avec le Bortezomib (V)/Dexaméthasone (DVd) dans l'étude CASTOR (MMY3004) (NCT02136134) et au Lenalidomide/Dexaméthasone (DRd) dans l'étude POLLUX (MMY3003) (NCT02076009).

Les résultats de l'étude **CASTOR** montrent une ORR en faveur du groupe DVd avec 82,9% vs 63,2% Vd et une PFS à 12 mois de 60,7% pour DVd vs 26,9% pour le groupe Vd. Cf *Figure 19 Survie sans progression étude CASTOR* Dans cette étude, l'association du Daratumumab avec le Bortezomib/Dexaméthasone semble apporter un réel avantage dans la prise en charge des patients avec notamment une augmentation de 31.2% du taux de réponses mais également de 125% du taux de survie à 12 mois.

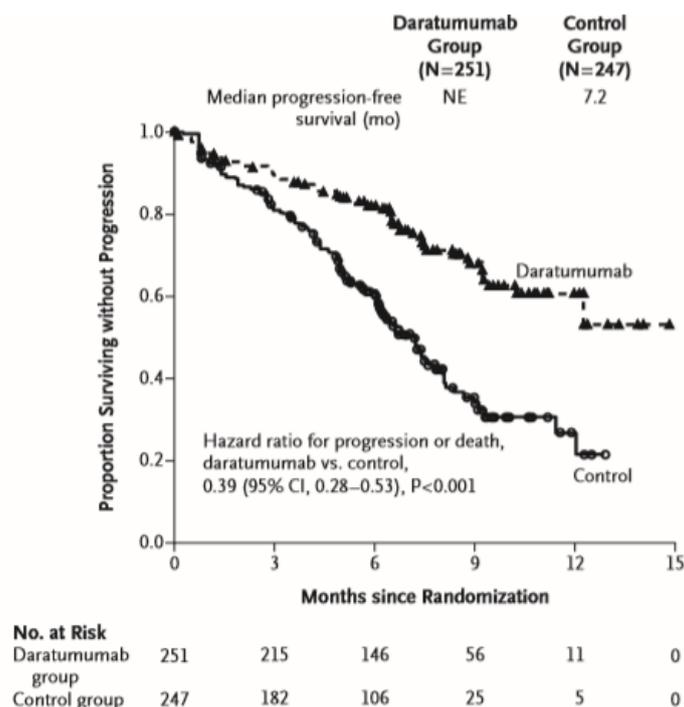


Figure 19 Survie sans progression étude CASTOR (Palumbo, 2016)

Les résultats de l'étude **POLLUX** montrent un ORR en faveur du groupe DRd avec 92,9% vs 76,4% pour Rd et une PFS à 12 mois de 83,2% pour DRd vs 60,1% pour le groupe Rd. Cf *Figure 20 Survie sans progression étude POLLUX* (Dimopoulos, 2018)

Dans cette étude, l'association du Daratumumab avec le Lenalidomide/Dexaméthasone semble apporter un réel avantage dans la prise en charge des patients avec notamment une augmentation de 21,5% du taux de réponses et de 38% du taux de survie à 12 mois.

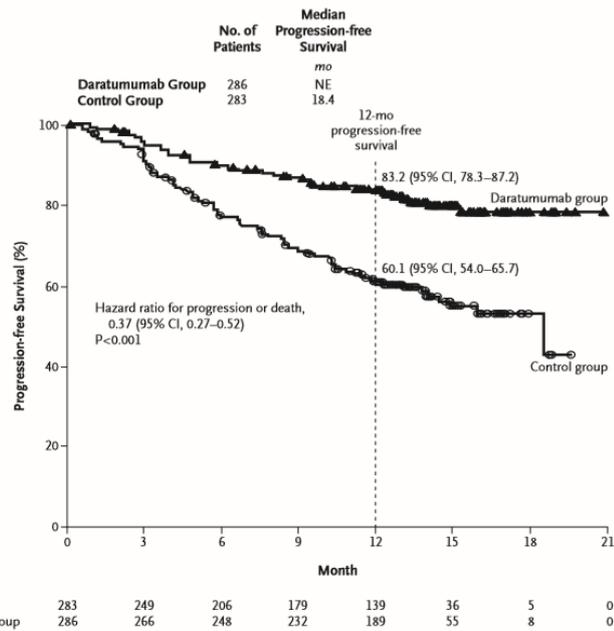


Figure 20 Survie sans progression étude POLLUX (Dimopoulos, 2016)

Plus récemment, une étude de Phase III-CASSIOPEIA (MMY3006-NCT02541383) a été mise en place, afin d'étudier l'effet du Daratumumab en association avec du Bortezomib, de la Thalidomide et de la Dexaméthasone sur les patients au diagnostic éligibles à une greffe de cellules souches. Dans cette étude, un taux de 29% de réponses complètes stringentes (sCR) a été observé dans le groupe DVTd contre 20% dans le groupe sans Daratumumab à J100 post autogreffe. Par ailleurs, l'ajout du Daratumumab a également amélioré la probabilité de survie sans progression à 18 mois (93% versus 85% dans le groupe VTd). (Moreau, 2019)

Le Daratumumab apporte de nouvelles options dans le panel des stratégies thérapeutiques du MM, que ce soit au diagnostic ou en rechute. Il est aujourd'hui principalement utilisé chez les patients en rechute en associations avec le Lenalidomide/Dex, Bortezomib/Dex ou Pomalidomide/Dex.

L'Isatuximab-Sarclisa® est le deuxième anticorps monoclonal ciblant CD38 ayant obtenu une AMM (Mai 2020). Il est recommandé en association avec le Pomalidomide/Dexaméthasone, chez les patients en rechutes et réfractaires ayant reçu au moins deux lignes de traitement incluant le Lenalidomide et un IP. Son mécanisme d'action est similaire à celui du Daratumumab et c'est grâce aux données de l'étude de Phase III ICARIA-MM (NCT02990338) qu'il obtient son AMM, en montrant une amélioration significative de la PFS et du taux d'ORR du bras l'Isatuximab/Pomalidomide/Dexaméthasone vs Pomalidomide/Dexaméthasone.

(Sanofi, 2020) (Attal, 2019) D'autres études de phase III sont en cours afin de tester l'efficacité du traitement avec d'autres associations thérapeutiques.

Il faut noter que d'autres anticorps monoclonaux anti-CD38 sont actuellement en développement comme MOR202 (NCT01421186) ou TAK-079 (NCT02219256).

2.2. Anticorps associé à de la chimiothérapie (ADC)

Plusieurs ADC anti-CD38 ont été développés alliant soit des molécules chimiques comme le Dara-DM4, soit des radionucléides comme l'⁹⁰Yttrium anti-CD38. (Zhang, 2019) (Green, 2018) Seul le ⁸⁹Zr-DFO-daratumumab, fait actuellement l'objet d'une étude de phase I/II (NCT03665155). (Ulaner, 2020)

2.3. Anticorps Bi spécifiques

AMG424 (Amgen) anti-CD3/CD38

Cet anticorps bi spécifique ciblant CD3 et CD38 est actuellement en essai clinique de Phase I (NCT03445663). Aucun résultat n'est actuellement disponible, cependant cette molécule a montré en pré-clinique, une aptitude à éliminer les lignées tumorales et à stimuler la prolifération des cellules T en présence ou non de cible. (Zafra, 2019)

GBR 1342 (Glenmark) anti-CD3/CD38

Après avoir donné de bons résultats *in vitro* et *in vivo*, cette molécule est actuellement développée en phase I/II chez l'Homme (NCT03309111). (Richter, 2018)

2.4. CAR T anti-CD38

Un CAR anti-CD38 est actuellement en clinique en Phase I (NCT03464916), il s'agit du CAR2 Anti CD38 A2. Il est développé par Sorrento therapeutics chez des patients myélomateux en rechutes et réfractaires aux IMiDs, PI et au Daratumumab. Le scFv est entièrement humain et il est transduit par Rétrovirus de façon autologue. Nous devrions avoir plus de détails sur cette étude dans les prochains mois. (Sorrento therapeutics, 2019)

De par sa forte et homogène expression sur les plasmocytes et après le succès des anticorps monoclonaux, CD38 devient une cible intéressante dans le développement de CAR anti MM. Cependant, son expression à la surface des lignées hématopoïétiques ou non hématopoïétiques, pose la question de son activité cible/hors tumeur (on target/off tumor) pouvant potentiellement entraîner des effets délétères chez le patient. Ainsi, la structure des CARs doit être repensée et

optimisée afin de mettre en place des alternatives pouvant éviter ou diminuer ses effets néfastes, tout en gardant l'activité antitumorale recherchée.

Parmi ces modifications on retrouve notamment :

- La diminution de l'affinité du paratope pour sa cible avec la technique du « light chain exchange », consistant à garder la chaîne lourde de l'anticorps utilisé dans la construction du CAR, mais à faire varier la chaîne légère. Un CAR dont l'affinité est plus faible pourra éliminer les cellules CD38^{high} tout en laissant intactes les cellules exprimant moyennement ou faiblement l'antigène. (Drent, 2017)
- Des techniques faisant intervenir un « safety switch », tels que des gènes suicides permettant l'élimination des cellules transduites grâce à une molécule chimique, en la transformant en métabolite toxique : HSV-Tk ou en induisant la dimérisation d'une molécule pro apoptotique : iCas9 (dont l'action peut être vérifiée en 30 minutes). (Drent, 2018)
- En « armant » les CARs d'épitopes, pouvant être ciblés par des anticorps monoclonaux : CD20 ou EGFR. Cette méthode est considérée comme la moins immunogène, mais présentant l'inconvénient majeur d'éliminer les cellules saines exprimant ces Ag. (Straathof, 2005)
- Ou encore en induisant l'activité (ou l'inactivité) du CAR par l'administration d'une molécule chimique : « switch on-switch off ». Il faut noter que cette technique présente l'avantage de garder le « pool » de CAR T circulants viables, contrairement aux gènes suicides qui entraînent leur destruction. (Drent, 2018)

III. B Cell Maturation Antigen

1. La cible

BCMA (CD269 ou TNFRS17) appartient à la super famille des récepteurs Tumor Necrosis Factor (TNFR). (Ma, 2019) Ces récepteurs sont composés d'un domaine extracellulaire riche en cystéine, favorisant la fixation des ligands, et d'un domaine intracellulaire activant les signaux de prolifération, de survie et de différenciation des cellules. (Gravestain, 1998) (Xu, 2001)

La plupart de ces récepteurs interviennent dans des réactions immunitaires (CD27, CD30, OX40, Fas) et certains peuvent être clivés en région extracellulaire pour donner une forme soluble, comme BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family) ou APRIL (A proliferation inducing ligand). (Xu, 2001)

BAFF ou BLyS (B-Lymphocyte stimulator) est exprimé par les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. Sa partie soluble est captée par trois récepteurs : **BCMA**, **TACI** (Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor) et **BAFF-R** sur les lymphocytes B. *Figure 21 TNF Récepteurs et ligands* (Mackay, 2003) Il a pour rôle d'activer leur prolifération, leur survie et de moduler la sécrétion d'immunoglobuline. (Xu, 2001) (O'Connor, 2004) Il a été montré qu'une mauvaise liaison entre BAFF et son récepteur pouvait entraîner une baisse des LyB circulants. Alors qu'une perte de TACI entraîne une augmentation du nombre de Ly B et une inhibition des réponses immunitaires indépendantes des LyT provoquant ainsi une auto-immunité. (O'Connor, 2004) Il y a notamment un niveau élevé de BAFF dans le lupus. (Xu, 2001)

APRIL se fixe sur TACI et BCMA avec la même affinité que BAFF et favorise la prolifération de cellules tumorales et les cellules B. (Xu, 2001) APRIL serait également lié à un troisième récepteur agissant sur la survie des cellules T. (Mackay, 2003)

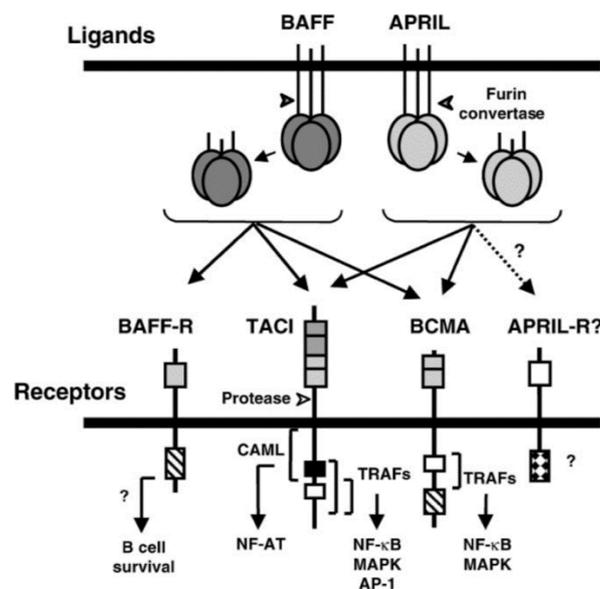


Figure 21 TNF Récepteurs et ligands (Mackay, 2003)

BCMA est le récepteur 17 de cette super famille et il est exprimé à la surface des Ly B postgerminatifs. C'est après la fixation de **BAFF** que ce récepteur induit les voies de signalisation MAPK et NFκB activant les processus de prolifération, de différenciation plasmocytaires, ainsi que leur maintien au sein de la circulation cf *Figure 21 TNF Récepteurs et ligands*. (Bae, 2019) (Ng, 2004) Dans un contexte pathologique, la surexpression de BCMA pourrait donc induire une prolifération exagérée des plasmocytes tumoraux, mais également l'induction d'un signal anti-apoptotiques. (Ma, 2019) Son niveau d'expression est également corrélé au nombre de plasmocytes, entraînant une augmentation de BCMA avec la progression

du MM. (Ma, 2019) Par ailleurs, après maintien en culture de cellules de moelle il a été mis en évidence que BCMA pouvait également être sécrété sous forme soluble (sBCMA). (Sanchez, 2012)

Comme abordé précédemment, BAFF se fixe sur BCMA, provoquant l'expansion et la différenciation des LyB en plasmocytes. En situation pathologique, les PCT vont sécréter une forme soluble de BCMA (BCMAs), empêchant BAFF de se fixer et provoquant une diminution de la synthèse d'anticorps. (Sanchez, 2018) *Figure 22 Interactions de BAFF et BCMA en situation normale et pathologique*

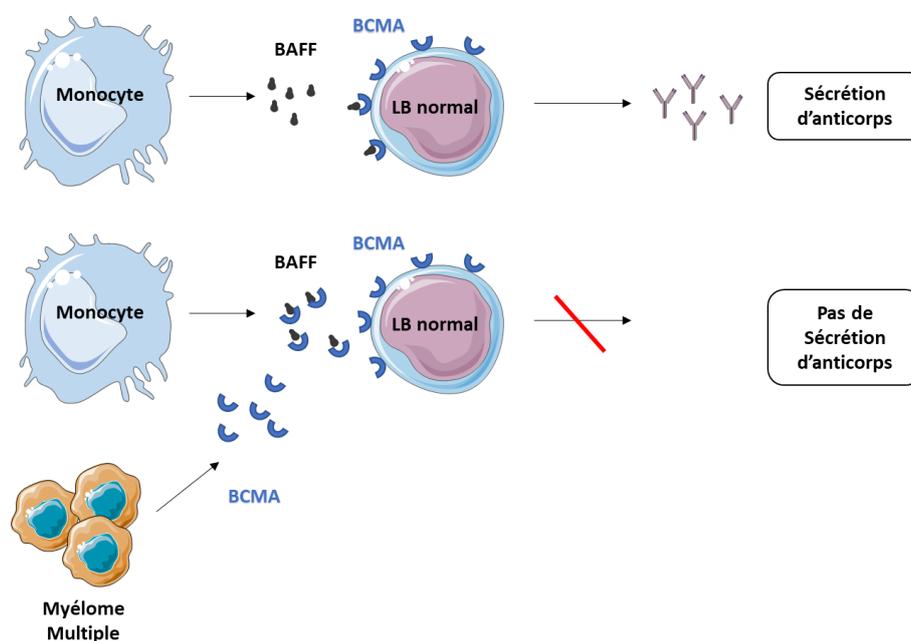


Figure 22 Interactions de BAFF et BCMA en situation normale et pathologique

Adapté de (Sanchez, 2018)

Il faut noter que le niveau de BCMAs est variable en fonction du stade de la maladie et augmente au cours de la progression. (Sanchez, 2012) Il serait donc envisageable d'utiliser sBCMA comme biomarqueur dans le MM. (Sanchez, 2018)

BCMA est donc une cible privilégiée dans le MM, du fait que son expression soit limitée aux phases tardives de la différenciation B : plasmablastes et plasmocytes, ainsi que sa capacité à être détecté dans le sérum, permettant un suivi de l'évolution de la pathologie. (Cho, 2018)

2. Les Immunothérapies anti-BCMA

2.1. ADC

Belantamab Mafodotin®-GSK2857916 (GSK)

Le Belantamab Mafodotin® est un anticorps monoclonal anti-BCMA fucosylé, conjugué au MMAF (Monomethyl Auristatin-F) un agent toxique ciblant les microtubules. Il obtient son AMM en 2020, en monothérapie chez des patients en rechute/réfractaires, ayant reçu au moins 3 lignes de traitement (IMiDs, les IP ou un AcMo anti-CD38). Des études sont en cours ou programmées par GSK afin d'étudier ce produit en combinaison avec d'autres drogues anti-MM. (Trudel, 2019) (Weisel, 2019)

D'autres ADCs sont actuellement développés, nous les citerons simplement dans le Tableau 7 ADC anti- BCMA développés en clinique. (Kumar, 2020) (Strasz, 2020)

	MEDI2228 (Astrazeneca)	AMG224 (Amgen)	CC-99712 (Celgène)	HDP-101 (Heidelberg Pharma)
Molécule chimique Construction	Pyrrrolobenzodiazépine Tesirine	Inhibiteur de la polymérisation des tubules MCC-DM1	Même scFv que le CAR bb2121 anti-BCMA	l'Amanitine un inhibiteur de la polymérase II
Stade Pré-clinique ou Clinique	Phase I NCT03489525	Phase I NCT02561962	Phase I NCT04036461	phase 1/2a
ORR	61%	-	-	-
Références	Kumar S. K., 2020	Clinical trial, 2019	Bristol-Myers Squibb, 2020	Andras Strasz, 2020

Tableau 7 ADC anti- BCMA développés en clinique

2.2. Bi spécifiques

Sept Bi spécifiques sont actuellement en essai clinique, dont les résultats sont indiqués dans le Tableau 8 Bi spécifiques anti-BCMA développés en clinique (Topp, 2019) (Harrison, 2020) (Raje, 2019) (Costa, 2019) (Madduri, 2020) (Kristine, 2020) (Buelow, 2019)

	AMG420 (Amgen)	AMG701 (Amgen)	PF-06863135	CC-93269 (Celgène)	REGN5458 (Regeneron)	JNJ- 644007957 (Janssen)	TNB-383B (TeneaBio's)
Cible	CD3/BCMA			CD3 et 2 régions de BCMA	CD3/BCMA humanisé		CD3/BCMA humain
Stade Pré- clinique ou Clinique	Phase I NCT02514239	Phase I NCT0328790 8	Phase I NCT03269136	Phase 1 NCT03486067	Phase I/II NCT0376110 8	Phase I NCT0314518 1	Phase I NCT0393373 5
ORR	70%	83%		83,3%	63%		80
Références	Topp, 2019	Harrison, 2020	Raje N. S., 2019	Costa, 2019	Deepu Madduri, 2020	Kristine, 2020	Buelow, Abstract 1874 Tenebio, 2019

Tableau 8 Bi spécifiques anti-BCMA développés en clinique

2.3. CAR T anti-BCMA

Concernant les CAR T anti-BCMA, de nombreux essais cliniques sont en cours. Les résultats disponibles ou à venir, permettront un éclairage sur l'utilisation de cette cible en thérapeutique. Nous développerons en détail les essais cliniques les plus avancés ou présentant des caractéristiques « originales ». Pour les autres, nous prenons le parti de les présenter sous forme de tableau.

First in human CAR BCMA

Après le succès des CAR T anti-CD19 dans la LAL, Ali et al (Ali, 2016) (NCT02215967) est le premier groupe à développer un CAR anti-BCMA dans le traitement du MM. Il est composé d'un scFv murin, d'un signal de co-stimulation CD28 et transduit par Rétrovirus. Dans cette étude de phase I, les patients recrutés ont précédemment reçu en moyenne 7 lignes de traitement et reçoivent un régime de lymphodéplétion à base de cyclophosphamide et de fludarabine. Plusieurs doses de CAR T ont été testées, de 0,3 à 3.10⁶ cellules/Kg puis allant jusqu'à 9.10⁶ cellules/Kg. Les réponses observées à ces doses sont principalement des réponses partielles (PR). Dans la population traitée avec la dose la plus élevée, l'ORR est de 81% et la PFS médiane est d'environ 7,5 mois. Toujours pour la même dose, des syndromes de relargage cytokiniques (CRS) de Grade 3 et 4 ont été observés et de sévères neurotoxicités y ont été associées. Malgré cela, cette première administration a montré des résultats positifs quant aux réponses anti myélome chez les patients, pour la dose la plus élevée de CAR T cells. (Brudno, 2018)

CAR T BCMA

Dans l'objectif d'optimiser cette nouvelle stratégie thérapeutique, Cohen et Al (Cohen, 2019) (NCT02546167) a mis en place un essai clinique de phase 1 utilisant un CAR T anti- BCMA humain/4-1BB. De Novembre 2015 à Décembre 2017, les patients traités avaient reçu une

médiane de 7 lignes de traitements et étaient réfractaires aux IP, aux IMiDs ou au Daratumumab. Dans 96% des cas ils présentaient au moins une anomalie cytogénétique de mauvais pronostic et dans 28% des cas une masse extra médullaire. Les malades étaient répartis en trois cohortes. La première, présentant un taux de réponse (partielle ou mieux) de 44%, reçoit entre 1 et 5.10^8 CAR T sans lymphodéplétion. La deuxième, montrant un taux de réponse de 20% a été arêtée de façon précoce. Les patients de ce bras recevaient du cyclophosphamide et une dose plus faible de CAR T entre 1 et 5.10^7 cellules. Quant à la troisième, montrant 60% de réponse, les patients recevaient du cyclophosphamide et la même dose que la première cohorte ($1-5.10^8$ cellules). La durée moyenne de réponse est de 4 mois. L'absence de régime de lymphodéplétion n'empêche pas la prolifération des CAR T *in vivo*, cependant l'expansion est plus stable et durable en sa présence. (Cohen, 2019) (Cohen, 2016)

Ide-cel/Bb2121-Bluebird/Celgène

Bb2121 est un CAR anti-BCMA murin/4-BB, transduit par vecteurs lentiviraux. (D'Agostino, 2020) Une Phase 1 clinique a été réalisée divisée en une phase d'escalade de dose (50.10^6 , 150.10^6 , 450.10^6 et 800.10^6 CAR +) et une phase d'expansion de dose (150.10^6 et 450.10^6). Le régime de lymphodéplétion est à base de Fludarabine et de Cyclophosphamine. Au total, ont été inclus, 33 patients ayant reçu une médiane de 7 lignes de traitements, dont l'âge moyen est de 60 ans et le délai médian depuis le diagnostic est de 5 ans. Sur ces patients réfractaires, le taux de réponse était de 85% (ORR) dans les 10,9 mois. La PFS est de 40% à 12 mois cf *Figure 23 Survie sans progression des patients sous bb2121*. (Raje, 2019) (Lin, 2019)

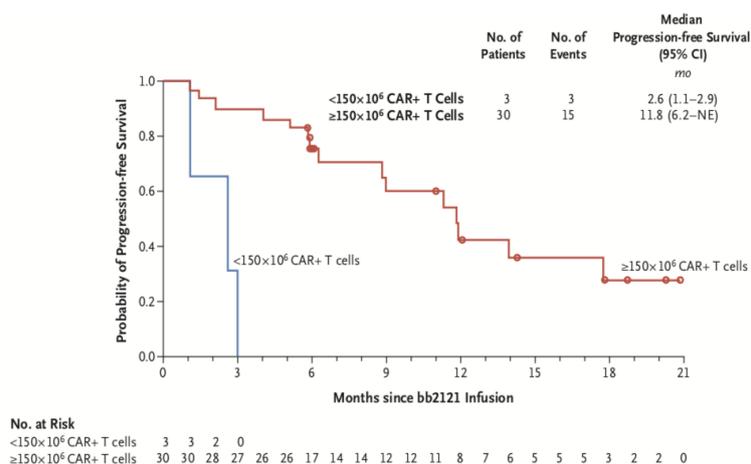


Figure 23 Survie sans progression des patients sous bb2121 (Raje, 2019)

Suite aux résultats positifs de la phase I, une phase II a été débutée, incluant 128 patients traités qui tous ont reçu une dose entre 150 et 450.10^6 CAR⁺ après lymphodéplétion. La sélection est restreinte aux patients réfractaires ayant reçu au moins trois lignes de traitement, notamment

des IMiDs, des IP et une immunothérapie anti-CD38. L'ORR est compris entre 84 et 90% en fonction de l'âge des patients et la PFS était de 8,6 mois, ce qui est légèrement inférieur à ce qui a été observé dans la phase I. (Berdeja, 2020)

La phase 3-KarMMA 3(NCT03651128) a pour objectif d'étudier le CAR sur des patients ayant reçu 2 à 4 lignes (dont le Daratumumab). Et de comparer les résultats à un bras traité avec des thérapies de référence, DaraPomDex, DaraBortDex, IxaLenDex, CarfilDex ou EloPomDex. Nous n'avons pas encore de résultats cliniques à disposition. (Delforge, 2020)

Une autre étude de phase I (NCT03274219-bb21217) est actuellement en cours, utilisant le CAR T **bb2121** cultivé *ex vivo* avec un inhibiteur de phosphoinositide 3 kinase (PI3K) -**bb007**, permettant d'enrichir la production de CAR T en cellules T mémoire, améliorant ainsi leur persistance. Cet essai a pour objectif d'évaluer la sûreté, les aspects pharmacocinétiques, l'efficacité mais également la persistance de l'effet anti tumoral, sur un modèle d'escalade de dose avec l'infusion de 150.10^6 , 450.10^6 , 800.10^6 et 1200.10^6 CAR⁺. (Shah, 2018) Pour être inclus, les patients doivent présenter une tumeur exprimant au moins 50% de BCMA par Immuno histo chimie (IHC), ils reçoivent ensuite un régime de lymphodéplétion composé de Fludarabine/Cyclophosphamide. En Mars 2020, 46 patients avaient été traités (12 à 150.10^6 , 6 à 300.10^6 et 6 à 450.10^6 CAR⁺), d'âge médian de 62 ans et ayant reçu une médiane de 6 lignes de traitements. (Bristol-Myers Squibb, 2019) (Berdeja, 2019) La durée de réponse est d'environ 11.9 mois et 55% des patients ont une réponse confirmée. Il faut noter qu'une analyse phénotypique des Ly T montre que les patients présentant une proportion plus importante de T mémoires ont de meilleures expansions de CAR T. (Alsina, 2020)

Ciltacabtagene autoleucel /LCAR-B38M : double épitope ciblant BCMA

LCAR-B38M est un CAR de 2^{ème} génération possédant un domaine 4-1BB, transduit par vecteur lentiviral. Sa partie extracellulaire contient deux fragments de chaînes lourdes dérivées des anticorps de Lama, capables de fixer deux épitopes du domaine extracellulaire de BCMA (acides aminés 1 à 54) : VHH1 ciblant BCMA de l'acide aminé 24 au 36 et VHH2 ciblant du 12 au 23. (Xu, 2019) Testé en clinique en Chine, une étude de phase I (LEGEND-2) a été mise en place dans l'objectif d'évaluer la sûreté et l'efficacité du traitement sur des patients réfractaires ayant reçu préalablement au moins 3 lignes de thérapie. Elle inclut au total 74 patients, le régime de lymphodéplétion n'est composé que de cyclophosphamide et l'administration de $0,5.10^6$ cellules/Kg est répartie en 3 infusions. Le taux de réponse (ORR) est de 88% avec 74% de CR,

4% de VGPR et 11% de PR. A 18mois, la survie globale est de 68% et la survie sans progression est de 50%. Quant à la persistance, 29% des patients montrent un niveau détectable de CAR T dans le sang à 5 mois. (Xu, 2019) (Zhao, 2018) (Wang, 2019) Par ailleurs une phase II (CARTIFAN-2) est actuellement en cours en Chine.

En association avec Janssen, un essai de phase Ib/II-CARTITUDE-1(NCT03548207), a été mis en place sur des patients réfractaires à au moins trois lignes de traitement comme les IP, les IMiD ou le Daratumumab. Comme pour LEGEND-2, les patients reçoivent un régime de lymphodéplétion, à base de Cyclophosphamide/Fludarabine et par la suite une seule infusion de CAR est réalisée à hauteur de $0,75 \cdot 10^6$ CAR+/Kg. Le principal objectif de cet essai étant de confirmer la sécurité du traitement à la dose évaluée afin d'obtenir la dose recommandée pour passer en phase II. En Mai 2020, 97 patients, dont la moyenne d'âge est de 61 ans, ont été traités et étaient jusqu'alors en moyenne en 6^{ème} ligne de traitement. Un mois après l'administration, 21 patients étaient évaluable avec un ORR de 94.8%, et la PFS à 6 mois est de 87.4%. (Madduri, 2020) Au regard de ces résultats et de l'octroi par la FDA de la désignation de thérapie révolutionnaire « breakthrough therapy », les études CARTITUDE-2 et CARTITUDE-3 seront mises en place afin d'évaluer l'efficacité du traitement sur des lignes thérapeutiques plus précoces (<3lignes). (Madduri, 2019)

P-BCMA-101

P-BCMA-101 est un CAR anti-BCMA/4-1BB développé par Poseida, ne possédant pas de scFv mais un monomère de CentyrinTM appelée CARTyrin et transduit par une technique non virale appelée PiggyBac. Les CentyrinTM sont des molécules alternatives aux immunoglobulines, plus petites, plus stables et totalement humaines. Elles dérivent de la molécule ténascine fibronectine III, se fixent avec une meilleure affinité sur les cibles et provoquant moins de réactions immunogènes. (Barnett, 2016) (Poseida, 2016) Elles sont ici associées un « safety switch » permettant d'éliminer les T transduites. Par ailleurs, le PiggyBacTM (*Figure 24 Application du PiggyBacTM*) est une méthode de transduction basée sur des transposons, permettant une insertion plus sûre, moins mutagène et non oncogénique.

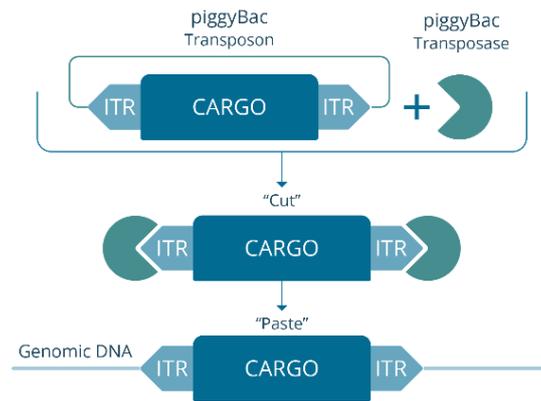


Figure 24 Application du PiggyBac™ (Poseida)

Dans les trois semaines suivant la transduction, le pourcentage de cellules exprimant le transgène est supérieur à 95% et le phénotype des T est majoritairement de type Stem cell mémoire, associé à une meilleure viabilité et une meilleure activité anti myélome. (Hermanson, 2016) (Poseida, 2016)

Le P-BCMA-101 est donc le premier CAR Centyrin™ testé en phase I (NCT03288493), chez 23 patients d'âge moyen de 61 ans, ayant reçu au moins 3 lignes de traitement (IMiDs, IP et Daratumumab). Pré-traités par Cyclophosphamide/fludarabine et répartis-en 5 groupes, ils reçoivent des doses entre $0,75 \cdot 10^6$ et $15 \cdot 10^6$ cellules/kg. Le taux de réponse globale est de 63% et de 100% pour sous-groupe recevant la dose recommandée pour la phase II ($857 \cdot 10^6$ cellules). De façon plus générale, sur les 19 patients évaluables d'un point de vue clinique, 15 ont montré des réponses significatives et le traitement a été bien toléré avec seulement 9,5% de CRS G1-2 et 4,8% de neurotoxicités G3. (Gregory, 2018) Au vu de ces résultats, la FDA a donné le statut « orphan drug » au P-BCMA-101 en Mai 2019.

Une phase II est en cours (NCT03288493-PRIME), avec pour objectif de recruter près de 100 patients pour évaluer la sécurité et la réponse au traitement. Des études de phases III seront par la suite mises en place pour étudier l'efficacité en combinaison avec des traitements approuvés par les autorités de santé mais également sur des patients en phase plus précoce dans la stratégie thérapeutique. (Costello, 2019)

CAR-ddBCMA

Le CAR-ddBCMA a un mécanisme d'action un peu différent de celui des CAR T. Effectivement, la protéine permettant le lien avec l'antigène tumoral n'est pas un scFv mais une protéine soluble sparX dont la technologie est développée par Arcellx Platform. Celle-ci est associée à un domaine TAG, comme sur la Figure 25 Liaison du sparX à l'antigène, qui pourra

être reconnu et lié à un complexe récepteur composé d'un signal anti-TAG en extra cellulaire et d'un domaine de signalisation conventionnel à l'intérieur de la cellule T. L'action lytique des CAR T est donc définie par la dose de protéine sparX administrée au patient. (Arcellx) Cette technologie, a obtenu au début de l'année 2020 la désignation « d'Orphan Drug » par la FDA. Une phase 1 (NCT04155749) est actuellement en cours, avec en Juillet 2020, 4 patients ayant reçu le ddBCMA à la dose de 100×10^6 CAR+ T (76% de CAR +). A ce jour, les résultats montrent 3 répondeurs. (Frigault, 2020)



Figure 25 Liaison du sparX à l'antigène (Arcellx)

CAR-BCMA CD8+

Nous ne disposons actuellement que de données pré-cliniques concernant ce type de CAR T développés par Cartesian therapeutics. Il a été montré que Descartes-08, le premier CAR T autologue CD8⁺ présentait des risques réduits en termes de sécurité d'utilisation de par son expression limitée dans le temps. Par ailleurs, il montre une bonne efficacité contre les lignées myélomateuses, résistantes aux traitements chimiques conventionnels. (Lin, 2019) Cartesian Therapeutics a actuellement deux produits en développement clinique, Descartes-08 (NCT03448978) qui prévoit d'inclure 30 patients dans une phase I/II et Descartes-11 (NCT03994705) prévoyant d'inclure 18 patients dans une phase I. Les deux protocoles acceptent les patients ayant reçu précédemment au moins deux lignes de traitement, réfractaires aux IP et aux IP, mais également aux traitements anti-BCMA, aux autres CAR T ou aux greffes allogéniques de cellules souches. (Cartesian Therapeutics)

CAR anti-BCMA développés par Celgene

Par ailleurs, 3 CAR T anti-BCMA développés par Celgene sont répertoriés dans le Tableau 9 CAR anti-BCMA développés par Celgene. (Green, 2018) (Mailankody, 2018) (Mailankody, 2018)

Les résultats de ces études et le nombre important d'essais CAR T BCMA réalisés par cette entreprise, ont fait que la stratégie de développement a orienté ses efforts vers le JCARH125. (Hernandez, 2018)

	JCARH125	MCARH171	FCARH143
Cible	anti-BCMA/CD28transmembranaire/4-1BB	anti-BCMA(scFv différent de JCARH125) /4-1BB/EGFR	anti-BCMA (scFv humain)/4-1BB/EGFR
Stade Pré-clinique ou Clinique	Phase I/II NCT03430011-EVOLVE	Phase I	Phase I
Patient (N et Age)	44	11	7 Screen : CD138+ dans la moelle osseuse
Dose	50.10 ⁶ , 150.10 ⁶ , 450.10 ⁶ CAR+	72.10 ⁶ , 137.10 ⁶ , 475.10 ⁶ , 818.10 ⁶	5-15.10 ⁷ EGFRt+ Ratio CD4 :CD8 égal à 1
Nb ligne de traitement	7	6	8
ORR	82%	64%	100% à 1 mois
Durée de la réponse		au-delà de 6 mois à partir de 450.10 ⁶ CAR+	baisse globale de 70% de l'expression de BCMA et une population BCMA négative
Références	Mailankody, 2018	Hernandez, 2018	Green, 2018

Tableau 9 CAR anti-BCMA développés par Celgène

Autres CAR anti BCMA

Trois autres CAR anti-BCMA répertoriés dans le Tableau 10 CAR anti-BCMA montrent des résultats similaires aux essais cliniques précédemment détaillés. (An, 2020) (Li, 2019) (Hao, 2020) D'une façon générale, les CAR anti-BCMA montrent de très bons résultats avec des taux de réponses près de 80%, sur des patients d'environ 60 ans ayant reçu une médiane de 7 lignes de traitement. Certains essais tendent à montrer que l'humanisation du scFv pourrait améliorer la prise en charge des patients réfractaires aux CAR T anti-BCMA murin. Il faut cependant noter que pour le moment, aucune de ces stratégies n'a bénéficié d'une AMM.

	C-CAR088: high affinity human MoAb	CT053 CARsgen therapeutics	CT103 IASO Biotherapeutics
Cible	BCMA/4-1BB scFv humain de haute affinité	scFv anti BCMA humain/4-1BB	scFv Humain/CD8a transmembranaire/4-1BB
Stade Pré-clinique ou Clinique	Phase I	Phase I NCT03716856, NCT03302403, NCT03380039	Phase I
Patient (N et Age)	21 patients 60ans	24 60ans	18 53,5
Dose	1-3-4.5.106CART/Kg	1.5 × 10 ⁸ CAR T	1-6.106/Kg
Nb ligne de traitement	4	4,5	>3 Dont lignes de CAR T anti-BCMA murin
ORR	6 CR, 10 VGPR et 4PR	87.5%	100%
Durée de la réponse		21.8 months PFS 18.8 months	70,6
Références	An, 2020	Hao, 2020	Li, 2020

Tableau 10 CAR anti-BCMA

D'autres stratégies ont été développées, misant sur une action synergique entre les CAR T anti-BCMA et d'autres stratégies thérapeutiques

2.4. CAR T anti-BCMA associé à de la chimiothérapie

Ainsi, nous avons pu voir apparaître l'association entre un CAR T anti-BCMA et la **Gamma secretase**. Le rationnel est ici basé sur le fait que la gamma secretase augmente l'expression de BCMA et diminue le taux de BCMA soluble, permettant ainsi une meilleure élimination des cellules cibles par le CAR T. Cette association est actuellement testée en clinique en phase I (NCT03508577). Les patients sélectionnés doivent avoir plus de 10% de plasmocytes dans la moelle osseuse et avoir reçu au moins 4 lignes de traitements. Ici 8 ont été inclus, dont 1 ayant déjà reçu un traitement CAR T anti BCMA et 1 autre ayant rechuté sous Ac bispécifique anti-BCMA. Parmi les 6 patients évaluable, le meilleur taux de réponse est de 100% avec 5 très bonnes PR et 1 PR. Au 15 Juillet 2019 aucun patient n'avait rechuté. (Cowan, 2019)

2.5. Combinaison de CARs anti-CD19 et anti BCMA

Dans le MM plusieurs antigènes peuvent être surexprimés à la surface des clones tumoraux. Ainsi, cette stratégie permettrait ainsi de maximiser l'élimination des plasmocytes tumoraux, notamment ceux résistants à la stratégie BCMA. Ici l'objectif est d'administrer de façon séquentielle ou simultanée des CARs ciblant deux antigènes différents. Plusieurs études sont

actuellement en cours concernant cette stratégie et nous pouvons citer la phase III **ChiCTR-OIC-17011272** utilisant 2 CARs de 2^{ème} génération 4-1BB/EGFR, dirigés contre CD19 (humanisé) et contre BCMA (murin). Cette étude montre des taux de réponse de l'ordre de 92,6% chez des patients réfractaires à environ 6 lignes de traitement et d'environ 57,5 ans. (Yan, 2019)

L'étude de phase I/II **NCT03455972**, recrute les patients en fonction de la présence de marqueurs de mauvais pronostics. Le protocole clinique associe une auto-greffe de cellules souches et l'administration de CARs anti-CD19 murin de 2^{ème} génération et anti-BCMA humanisé de 3^{ème} génération. En Novembre 2019, les patients présentent un taux de réponse globale de 100%. Une analyse plus poussée met en avant que selon la randomisation des patients, réalisée en fonction du moment où la transplantation intervient, la PFS peut varier. Elle est de 100% à 1 an pour les patients en 1^{ère} ou 2^{ème} ligne et de 68% chez les patients en phase plus tardive. Il semblerait donc que l'association de la greffe de cellule souche et de deux CAR T soit très efficace sur des patients de mauvais pronostic. (Shi, 2019) (Smith, 2019)

Par ailleurs, le groupe Garfall et Al (Garfall, 2019) a mis en place une étude basée sur la co-infusion du CAR T anti-BCMA étudié dans le papier de Cohen et Al et du CTL0119 qui correspond à la version humanisée de Tisagenlecleucel (CTL019) (**NCT03549442**). Elle est réalisée sur une petite cohorte de patients répartis en deux groupes, l'un visant à étudier la combinaison sur des patients ayant reçu au moins 3 lignes de traitement. Et l'autre, visant à étudier différentes stratégies comme l'association des CAR T, ou l'administration d'un CAR anti-BCMA sur des patients présentant des facteurs de mauvais pronostic. Sur les 8 patients ayant reçu la combinaison, 5 n'ont toujours pas de cellules B circulantes et parmi eux 2 sont toujours en rémission après 1 an et 4 mois. Des résultats supplémentaires sont nécessaires pour vérifier l'utilité de la combinaison de CARs dans le traitement du MM. (Garfall, 2019) D'autres études sont actuellement en cours NCT04194931, NCT04162353 et NCT03767725.

2.6. CARs anti BCMA bispécifiques

Une autre stratégie serait de construire un CAR présentant deux scFv. L'avantage de cette stratégie est uniquement fonctionnel et permet de transduire les LyT qu'une fois.

CD19 et BCMA

Une étude clinique GC012- **NCT04236011** est actuellement en cours, avec un CAR développé par le groupe Zhang et Al en collaboration avec Gracell Biotech. (Zhang, 2019) Entre Mars et Juillet 2019, tous les patients incluent montre une réponse, 1 sCR, 3 VGPR et 1 PR, sans toxicité majeure. Les résultats sont encourageants malgré le peu de recul que nous ayons sur cette étude. Une autre étude clinique est en cours avec le même CAR dans des conditions de production différentes. Effectivement Gracell dispose d'une plateforme de fabrication rapide de CAR T, « Fast CAR », mettant à disposition le produit en 24h. (Zhang, 2019) Une autre étude portant sur un CAR Bispécifique CD19/BCMA est en cours NCT03706547.

CD38 et BCMA

Li et Al (Li, 2019) associe CD38 et BCMA, deux cibles privilégiées des stratégies thérapeutiques dans le MM. Ainsi dans ce premier essai chez l'homme, le taux de réponse est de 90,9%, la survie sans progression à 9 mois est de 78,87% et le *BM38* reste détectable dans le sang et dans la moelle à 15 mois. Cet essai met en avant la bonne tolérance d'un CAR bi spécifique ciblant le CD38 exprimé à la surface de nombreuses cellules non tumorales et non hématopoïétiques. Par ailleurs de prochains résultats permettront de statuer quant à la persistance des cellules dans l'organisme. (Li, 2019)

TACI et BCMA (AUTO2)

Une autre stratégie consiste à cibler TACI, du fait de son expression stricte sur les plasmocytes et de son appartenance à la famille des récepteur TNF. (Schmidts, 2019) Autolus Therapeutics a donc développé un CAR permettant de reconnaître BCMA et TACI par le ligand commun APRIL. Equipé d'un domaine RQR8 permettant l'élimination du CAR, de deux domaines de costimulation CD28 et OX40, il s'agit d'un plasmide de grande taille. Une étude de phase I a été réalisée avec un taux de réponse global de 43% et une très bonne persistance, notamment pour un patient au-delà d'une année. Il faut noter que ce patient a ensuite été réinfusé avec le même CAR T et qu'il continue de se maintenir. Il se trouve que ce patient présentait le niveau basal de TACI le plus important. (Popat, 2019) En ciblant un ligand cette stratégie se révèle être novatrice, mais ne montre pas de réponse antitumorale intéressante.

GPRC5D et BCMA

GPRC5D semblent être une excellente cible et un modèle *vivo* montre que l'association de BCMA et de cette cible pourrait améliorer la persistance de la réponse antitumorale. Dans l'attente donc d'un passage en clinique. (Larrea, 2020)

CS1 et BCMA

Des CARs bispécifiques ciblant CS1 et BCMA sont actuellement en développement que ce soit en préclinique ou en clinique (Phase 1 précoce **NCT04156269**) (Zah, 2020)

Pour le moment, l'association de BCMA à une molécule chimique ou à une autre cible n'a pas montré de résultats concluants, laissant penser que cette stratégie serait à privilégier dans la prise en charge des patients.

IV. Les autres cibles

A côté de BCMA, CS1 et CD38 d'autres antigènes ont été mis en avant pour une possible utilisation dans le traitement du myélome multiple par immunothérapie.

1. CD19

Dans le Myélome Multiple, c'est le groupe Garfall et Al (Garfall, 2015) qui met en place une étude clinique de phase I (NCT02135406) en 2014, avec le CAR anti CD19 (CTL019) développé par Novartis. Le rationnel est basé sur le fait que CD19 serait exprimé sur une sous population de précurseurs plasmocytaires. (Yan, 2019) (Zhang, 2019)

Leur objectif était donc d'évaluer la sécurité et la survie sans progression, potentiellement associée à la sous population de plasmocytes CD19⁺ et à une réponse maintenue dans le MM. (Cohen, 2018) Dans cette étude, 12 patients dont l'âge médian était de 61 ans, ont été inclus. Ils avaient précédemment reçu environ 9 lignes de traitement et possédaient des facteurs de mauvais pronostic. Le protocole prévoyait un conditionnement au Melphalan à haute dose, une autogreffe de cellules souches et une infusion de CTL019 aux doses 1.10^7 à 5.10^7 cellules. Sur les 12 patients, 10 ont reçu l'infusion et seul 2 patients ont obtenu un bénéfice en termes de survie sans progression comparé aux résultats précédemment obtenu après auto greffe de cellules souches. (Garfall, 2016) Plusieurs raisons peuvent expliquer ce faible nombre de réponse et notamment la dose 10 fois plus faible que celle utilisée dans les autres essais cliniques de CTL019. (Garfall, 2018)

2. CD138

CD138 ou Syndecan-1 appartient à la famille des HSPGs (Heparan Sulfate Proteoglycans) exprimés à la surface de cellules adhérentes et d'un petit nombre de cellules non adhérentes, impliquées dans les interactions cellules-cellules ou cellules-matrice extra cellulaire. Le CD138 est principalement présent à la surface de cellules épithéliales, des plasmocytes mais également à la surface de cellules tumorales. Dans le MM, il est associé à un mauvais pronostic. (Teng, 2012) (Kriegsmann, 2018) Ces propriétés suggèrent que CD138 pourrait être une cible intéressante dans le traitement du myélome multiple. Cependant des toxicités ciblant les muqueuses et la peau pourraient apparaître dues à l'expression de CD138 par les cellules épithéliales. (Wu, 2019)

2.1. *Anticorps conjugué*

BT062 ou Indatuximab Ravtansine est un anticorps anti CD138, basé sur un scFv chimérique murin/humain, conjugué à une molécule la maytansinoid DM4 qui est un agent cytotoxique des microtubules provoquant un arrêt du cycle cellulaire et une entrée en apoptose. Testé en phase I/II en association avec du Lenalidomide et de la dexaméthasone, sur les 45 patients inclus, seuls 30 patients étaient toujours en traitement avec une durée médiane de 123 jours, le taux de réponse était de 83% avec 3 CR, 10 VGPR, 15 PR et 89% d'effets indésirables ont été répertoriés avec seulement des grades 1 et 2 montrant ainsi une toxicité limitée et une élimination rapide du produit. (Kelly, 2014) (Jagannath, 2019)

2.2. *CAR T cells*

ATLCAR-CD138.CAR

Suite à ces résultats, Sun et Al (Sun, 2019) ont monté le scFv du BT062 sur un CAR T, CD138.CAR. Ce CAR est constitué d'un scFv anti CD138, d'un hinge IgG1, d'une région transmembranaire CD 8 α et d'un domaine de costimulation 4-1BB. (Sun, 2019) Une phase I a été mise en place (NCT03672318) en Janvier 2019 aux États Unis, et une Phase II en Chine. Il n'y a pour le moment aucune donnée clinique pour cet essai. (ClinicalTrials, 2019)

CART138

Par ailleurs, en 2016 Guo et Al (Guo, 2016) a mis en place une étude de phase I (NCT01886976) dans l'objectif d'étudier le temps de réponse sur des patients ayant reçu entre 5 et 18 lignes de traitement. Le protocole clinique consiste en l'infusion d'un CAR T anti-CD138 (CD8 α , 4-1BB), à une dose moyenne de 0,75.10⁷ cellules/Kg. Sur les 5 patients traités, 4 ont montré une

stabilisation de la pathologie dans les 3 à 6 mois. Et le dernier a montré des signes de progression, bien que des CAR T restaient détectables dans la moelle osseuse. (Timmers, 2019)

CART anti-CD138

Tian et Al (Tian, 2017) quant à eux ont testé un CAR anti-CD138 sur un patient de 52 ans présentant une évolution extra médullaire. Le CAR n'est pas décrit, mais nous savons que le patient a reçu un régime lymphodéplétant composé de Cyclophosphamide/Fludarabine avant de recevoir une dose de $1,5 \cdot 10^8$ CAR⁺. Le patient a présenté une réponse partielle avant de décéder 3 mois post infusion après avoir déclaré une infection pulmonaire.

3. G Protein coupled class C group 5-member D (GPC5D)

GPC5D fait partie de la super famille des Protéines G couplé à un récepteur, de la famille C associé aux récepteurs métabotropiques du glutamate. Cette famille est divisée en 4 groupes selon le type de ligand endogène qui leur est associé ainsi qu'à leurs fonctions physiologiques. (Bräuner-Osborne, 2001) GPC5D a 7 segments transmembranaires et est exprimé à la membrane de la cellule. Des analyses tissulaires ont mis en avant des niveaux de mRNA élevé à moyen dans différents tissus de l'organisme tel que les reins, le pancréas, l'intestin grêle, la rate et les testicules, ainsi que de faibles niveaux dans les poumons, le colon, la prostate, le thymus et les leucocytes. Par ailleurs l'expression de GPC5D est associée aux tissus produisant de la kératine. Le groupe Atamaniuk et Al. a permis d'avoir plus de connaissance concernant l'implication de ces récepteurs dans le cancer et notamment dans le myélome multiple. Effectivement, l'ARNm de GPC5D a été détecté dans la moelle osseuse de patients myélomateux, et une forte expression est associée à une infiltration plasmocytaire importante, une forte sécrétion de β 2-microglobuline, la délétion 13q14(rb-1) ou la translocation (4 ;14), ce qui fait de lui un marqueur de mauvais pronostic. Suite à ces travaux, Smith et Al. ont analysé par immunofluorescence quantitative l'expression de CD138, BCMA et GPC5D sur des échantillons de moelle. La majorité des échantillons CD138⁺ montrent une co-expression de BCMA et GPC5D, avec 98% de CD138⁺/GPC5D⁺ et une expression indépendante de BCMA. (Smith, 2018) Ainsi, sa surexpression de mauvais pronostic dans le myélome, sa présence faible sur les tissus sains et son accessibilité font de GPC5D une potentielle nouvelle cible thérapeutique dans le myélome multiple (Atamaniuk, 2012)

3.1. *Anticorps Bi spécifique anti-CD3/GPRC5D*

JNJ-64407564

Il est actuellement testé dans une Phase I (NCT03399799), permettant d'évaluer la sécurité, la tolérance et l'efficacité du produit en intraveineux. Cette étude devrait être menée sur 185 patients, et devrait permettre d'établir une dose recommandée pour une phase II. Une autre phase I devrait être initiée (NCT04108195) afin de traiter les patients avec du Daratumumab (anti-CD38) et d'effectuer une randomisation : bras traité par le bispécifique CD3/GPRC5D et l'autre avec le CD3/BCMA également développé par Janssen. (ClinicalTrials, 2019) (ClinicalTrials, 2019) (Kodama, 2019)

3.2. *CAR T cells*

Un CAR de 2nd génération (MCARH109) a été développé avec un scFv humain anti-GPRC5D (CD28 transmembranaire/4-1BB), montrant *in vivo* l'élimination de clones myélomateux KO pour BCMA. (Smith, 2018) Il devrait passer en clinique prochainement, sur des patients en rechute de thérapie par CAR T anti-BCMA. (Eureka Therapeutics, 2019)

4. Immunoglobulin Light Chain

Dans la recherche de nouvelles cibles et de réduire l'aplasie B observée avec les CAR-T CD19, Ramos et Al (Ramos, 2016) ont exploré l'éventualité de cibler la chaîne légère κ qui est présente sur environ 50% des cellules B du sang. (Bräuninger, 2001) (Kaleem, 2000) Initialement développé dans le cadre des Lymphomes non Hodgkiniens et des leucémies chroniques lymphoblastiques, et bien que les plasmocytes n'expriment normalement plus d'Ig, l'utilisation de CAR T contre Igk trouve un rationnel dans la description d'une sous population de cellules B clonogéniques de Plasmocytes tumoraux, trouvés dans le sang et dans la moelle de patients. (Matsui, 2004)

4.1. *Anticorps monoclonaux*

Le MDX-1097 ou KappaMab est un IgG1k fixant un épitope unique de κ sur les cellules B tumorales, mais également sur les chaînes légères κ solubles avec cependant moins d'affinité. Spencer et Al (Spencer, 2019) rapportent des résultats préliminaires d'une phase I, dans laquelle 12 patients ayant reçu au moins 2 lignes de traitement sont infusés avec une dose croissante (0,3, 1, 3 et 10 mg/Kg) et sont évalués à 135 jours (environ 4,5 mois). Aucune réponse conventionnelle n'a pu être mise en évidence, cependant il a été observé une réduction des chaînes κ dans le sérum d'un patient dans les 3 mois suivant l'infusion et une réduction des

lésions osseuses chez un autre. Face à toxicité réduite et une forte réponse chez certains patients, une phase IIa a été mise en place, montrant 2 réponses sur des patients précédemment traités par Lenalidomide pendant plus de 18 mois. (Spencer, 2019) (Spencer, 2013) Ainsi une phase IIb en association avec du Lenalidomide a été mis en place, des résultats devraient être obtenus prochainement dans la mesure où le recrutement a été fermé en juillet 2019.

4.2. *CAR T cells*

Une phase I a donc été mise en place afin d'évaluer la faisabilité et la sûreté de l'utilisation d'un κ CAR. Elle est composée de 16 patients, 9 lymphomes et 7 myélomes multiples, ayant reçu précédemment au moins une ligne de traitement. Aucune réponse n'a été observée chez les patients myelomateux. (Ramos, 2016)

5. CD56

CD56 ou Neural cell adhesion (NCAM) est un membre de la superfamille des immunoglobulines. Principalement connu pour être présent à la surface des Natural killer (NK), mais il a également été mis en évidence sur les plasmocytes tumoraux dans 65 à 80% des cas et dans moins de 15% des cellules normales. (Van Camp, 1990) C'est un marqueur de bon pronostic dans le myélome multiple, mais également une bonne cible thérapeutique. (Ailawadhi, 2019)

5.1. *Anticorps conjugué*

Un essai clinique a donc été mis en place par Berdeja et al avec un AcMo anti-CD56 le Lovortuzumab, huN901, couplé à la Mertansine un agent toxique inhibant la polymérisation des microtubules. Sur 44 patients, la réponse globale est de 64.1% avec 11 très bonnes réponses partielles, 10 réponses partielles et 12 stabilisations de la maladie. Les principaux effets indésirables sont de la fatigue, des neuropathies périphériques et une atteinte rénale. Par ailleurs d'autres études utilisant des molécules couplées appartenant à la même famille mais dont l'anticorps ciblait d'autres antigènes ont également montré des neuropathies périphériques laissant penser que cette toxicité est propre à la molécule chimique et non au mécanisme d'action de l'anticorps. (Berdeja, 2014)

5.2. CAR T cells

Basé sur des essais pré cliniques, Benjamin et al a monté le scFv anti-CD56 (N901) sur un CAR de 2^{ème} génération (CD28), transduit par Rétrovirus. Ce CAR montre de bons résultats *in vitro* avec notamment une réduction de 40-50% des cellules tumorale à un ratio supérieur à 5 CAR T pour une cible. Il a également montré *in vivo*, que le CAR T anti CD56 injecté à des souris était capable d'éliminer les lignées tumorales greffées, montrant ainsi l'intérêt de l'utilisation de cette cible dans les thérapies par CAR T. (Benjamin, 2012) Par ailleurs, deux études cliniques chinoises sont actuellement en cours NCT03473496 et NCT03271632. Aucun résultat n'est pour le moment disponible.

6. CD44v6

CD44 est une glycoprotéine transmembranaire de classe 1, exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus normaux et surexprimée dans les tumeurs hématologiques et épithéliales. Plusieurs isoformes de cette molécule existent, dues à l'insertion d'exons sur le domaine extracellulaire. (Senbanjo, 2017) Notamment le CD44v6, qui est très présent dans la majorité des carcinomes, mais également dans le MM. Effectivement après analyses par cytométrie de flux, le groupe Liebisch et al a montré que dans 43% des cas, cette molécule était présente à la surface des cellules tumorales des MM avancés, l'associant ainsi à la progression de la maladie. De plus, la présence de la délétion du chromosome 13q est corrélée à la surexpression de CD44v6, en faisant un marqueur de mauvais pronostic. (Liebisch, 2005) Dans le développement de nouveaux CARs, Casucci et al cré en 2013 un CAR anti-CD44v6 de deuxième génération (CD28) utilisé dans la LAM et dans le MM. Associé à une forte toxicité cutanée, le CAR CD44v6 est construit avec un gène suicide (TK ou Caspase 9), permettant son élimination. Des résultats *in vivo* ont montré une bonne persistance et une efficacité anti tumorale. (Casucci, 2012) A la suite de quoi, une étude de phase I/IIa a été mise en place (NCT04097301) dans le projet EURE-CART où le MLM-CAR44.1 est transduit par rétrovirus et associé au gène suicide HSV-TK. L'objectif de cette première administration à l'homme est d'étudier l'efficacité et la sureté du produit. (Carrabba, 2018) Nous ne disposons pas pour le moment de résultats cliniques.

7. CD70

CD70 est un membre de la famille des TNF, ligand naturel de CD27 et jouant un rôle dans les réactions immunitaires. Exprimé normalement de façon transitoire dans les cellules T, B et NK activées et sur un petit groupe de cellules dendritiques, il est également exprimé de façon anormale dans de nombreuses pathologies hématologiques. (Ge, 2017) Des données pré clinique ont pu établir l'expression de CD70 sur 60% des échantillons de MM. (McEarchern, 2007) Deux CARs ont été développés dans l'objectif d'éliminer les plasmocytes CD70⁺, le premier par Shaffer et al est de 1^{ère} génération, constitué d'un domaine CD27 extracellulaire permettant la liaison à CD70. Le deuxième par Wang et Al proposant un domaine extracellulaire composé d'un CD27 tronqué, associé à un domaine de costimulation CD28 ou 4-1BB. (Shaffer, 2011) (Wang, 2016) Dans les deux cas de bons résultats ont été montrés *in vitro* et *in vivo*. Cependant aucun CAR T anti-CD70 n'est actuellement enregistré en clinique dans le traitement du MM.

8. CD229 (Ly9) ou SLAMF3

CD229 est un autre membre de la famille SLAMF associé à l'activation lymphocytaires, et exprimé principalement sur les cellules T, NK, B, les macrophages, les cellules dendritiques. (Atanackovic, 2011) Par ailleurs, il a été montré que CD229 était surexprimé à la surface des plasmocytes myélomateux de patients présentant des facteurs de risques, en faisant une bonne cible pour les immunothérapies. (Yousef, 2015) Radhakrishnan et al a donc développé un CAR anti-CD229 (CD8 transmembranaire/4-1BB), dont le scFv est entièrement humain. Il montre de bons résultats *in vitro* et *in vivo* avec un faible effet fratricide, laissant penser à un possible développement en clinique. (Radhakrishnan, 2017) (Radhakrishnan, 2020) Cependant aucun essai clinique ne semble enregistré pour le moment.

9. NKG2DL

NKG2DL est un récepteur codé par le gène KLRL1, dont la protéine transmembranaire de type II (Lanier, 2015) est exprimée à la surface des NK, sur le groupe de $\gamma\delta$ ⁺ des cellules T, mais également sur les cellules T CD8⁺. Dans des conditions normales, il s'agit du principal récepteur activateur des NK, mais lors d'un contexte pathologique, il peut également être présent à la surface des cellules T CD4⁺, comme dans la maladie de Crohn ou l'arthrite rhumatoïde. Chez l'humain, NKG2D a plusieurs ligands comme MICA, MICB, ULBP 1-3 et ULBP4, pouvant être surexprimé à la surface des cellules tumorales comme dans le MM.

(Nausch, 2008) (Duan, 2019) (Barber, 2008) Une étude clinique de phase I (NCT02203825) est en cours sur un CAR T anti-NKG2D de 1^{ère} génération et développé par Ceylad. Cette étude inclut 12 patients (7 atteints de LAM et 5 de MM) ayant reçu au moins 5 lignes de traitements, et ne propose pas de régime de lymphodéplétion. Malgré le fait qu'aucune réponse clinique n'ait été observée, les principaux objectifs tel que la faisabilité et la sécurité du produits, sont atteints, et aucun CRS ou Neurotoxicité n'ont été à déclarer.

Par ailleurs de nombreuses questions restent en suspens concernant les perspectives de ce CAR avec de potentielles améliorations comme l'ajout d'un signal de co-stimulation, l'administration d'un régime lymphodéplétant ou encore l'utilisation d'un autre type cellulaire effecteur comme les NK. (Baumeister, 2019)

10. Lewis Y

Lewis Y (LeY) est un Ag appartenant à la famille du système de groupe sanguin. Présent à la surface d'environ 75% des cancers épithéliaux, il a été mis en évidence à la surface de plasmocytes de MM dans 50% des cas. (Peinert, 2010) (Krug, 2007) Le groupe Westwood et al a été le premier à mettre en place une étude pré clinique sur un CAR ciblant LeY en montant le scFv d'un anticorps monoclonal humanisé le Hu3S193, combiné à un domaine CD28/CD3Z et transduit par rétrovirus. (Westwood, 2005) Après de bons résultats *in vivo* et une toxicité limitée par la faible expression de l'antigène sur les tissus normaux, une étude clinique de phase I (NCT01716364) a été mise en place en 2012 dans la LAM et le MM. Aucun résultat n'est disponible.

11. NY-ESO-1

NY-ESO-1 or New York esophageal squamous cell carcinoma 1 est un antigène intracellulaire appartenant à la famille des « cancer testis antigen » (CT). Il est détecté dans environ 20 à 40% des tumeurs dont notamment le mélanome, la prostate et le cancer du poumon. (Jungbluth, 2001) C'est le groupe Van Rhee et al, qui met en évidence l'expression de cet antigène dans le MM. Effectivement, une étude de screening a mis en avant que NY-ESO-1 était fréquemment exprimé lorsque les patients présentaient une anomalie cytogénique et très faiblement exprimé sur les tissus normaux ou chez les MGUS. (Van Rhee, 2005) Du fait de son expression intracellulaire, NY-ESO-1 fait l'objet d'études dans le développement de TCRs modifiés génétiquement dans le but de moduler l'affinité et orienter l'activité des LyT. Par ailleurs, d'autres stratégies sont développées dans l'objectif d'associer les CARs et les propriétés

intracellulaires des TCRs. Les TCRm-CARs dérivent d'anticorps capables de mimer l'activité des TCRs en reconnaissant les peptides présentés par le CMH I. (Kriegsmann, 2018) Le groupe Sschuberth et al a développé un anticorps anti-NY-ESO-1157-165 se liant également à la molécule HLA-A*02 :01, dont le scFv a été utilisé pour monter un CAR de 2^{ème} génération (CD23) transduit dans des cellules T CD8+. De bons résultats ont été montrés *in vitro* et *in vivo*, appuyant le rationnel d'un développement clinique. (Schuberth, 2013) Un essai est actuellement en cours associant CAR et TCR dans une Phase I/II (NCT03638206) dans plusieurs pathologies.

Objectifs de la thèse

Au cours des dernières années, des avancées majeures ont été réalisées dans le traitement du myélome multiple. Le développement des immunothérapies a contribué d'une façon significative à ces progrès, notamment avec les anticorps monoclonaux comme le daratumumab. Pourtant, en dépit de résultats significatifs, notamment en termes de réponse, les patients rechutent et le MM reste une maladie incurable.

Le succès incontestable des CAR T anti-CD19 dans les leucémies aiguës et le lymphome, non seulement en termes de réponse, mais également de survie globale, a laissé espérer que l'adaptation de cette stratégie thérapeutique au MM pourrait apporter une solution à certains malades. En effet, les CAR T anti-BCMA ont montré une très bonne efficacité, avec des taux de réponse de près de 80%. Cependant, la survie globale des patients traités avec CAR-T BCMA apparaît bien moins bonne que celle observée pour les malades leucémiques ou Lymphomateux, ayant reçu des CAR T anti-CD19.

Dans un premier temps, notons que les malades du MM ont en moyenne 7 lignes de traitements avant de recevoir la stratégie CAR T et qu'ils sont généralement âgés d'au moins 60 ans et que malgré cela les CAR T anti-BCMA montrent des taux de réponse excellent proche de 80%. Que cette cible offre une spécificité aux plasmocytes exceptionnelle et des effets secondaires limités. Toutefois, le recul que nous avons actuellement sur ces essais, montre qu'il y a clairement un problème de persistance de l'action antitumorale puisqu'environ 50% des patients présentent des signes de rechute dans l'année suivant l'infusion. Si nous essayons de comprendre à quoi peuvent être dues ces rechutes, il faut tout d'abord regarder si l'expression de BCMA est persistante. Or, bien qu'il y ait dans de nombreux cas une baisse de l'expression de la cible, la plupart présentent des plasmocytes BCMA⁺. De ces conclusions, plusieurs axes d'améliorations peuvent être envisagés et comme pour les rechutes CD19, elles peuvent toucher soit les caractéristiques du CAR, soit les propriétés physiologiques des cellules effectrices. Comme nous avons pu le voir en abordant le développement des immunothérapies, plusieurs stratégies touchant le CAR en lui-même ont été testées, comme par exemple choisir des antigènes cibles différents, changer le design du CAR en faisant varier les domaines de liaison à l'antigène, les domaines transmembranaires et les signaux de Costimulation, ou encore adopter des méthodes de transduction différentes, mais aucun d'elles n'a apporté de solution radicale.

Nous nous sommes alors demandé si les difficultés évoquées ne venaient tout simplement pas des cellules T. Or lorsque nous avons abordé les CAR T anti-CD19 dans le lymphome, dont les patients ont à peu près le même profil que ceux du MM, des informations importantes ont été mises en lumière, notamment le fait que certaines classes médicamenteuses pouvaient moduler la différenciation des T, poussant l'apparition de marqueurs de « fatigue » des T, les empêchant ainsi de fournir une activité antitumorale durable.

Dans ce contexte, le projet de Thèse, visait tout d'abord à étudier les propriétés phénotypiques des Ly T du sang périphérique de patients à différents stades de la maladie, à savoir des patients au diagnostic, en rechute de chimiothérapie, sous Daratumumab ainsi que des patients en rechute de Daratumumab. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à caractériser les propriétés fonctionnelles des CAR T de 2^{ème} génération anti-CS1/CD28 et anti-BCMA/4-1BB issus de ces différents groupes de malades, et de les corrélérer aux données phénotypiques.

Mes résultats montrent que les lignes de traitement ont un impact majeur sur le phénotype et l'activité antitumorale des stratégies CAR T chez les patients du MM.

Résultats

I. Etude de la fonctionnalité des CAR T chez des Patients MM à différents stades de la pathologie

Le Myélome Multiple (MM) est une hémopathie maligne qui touche 5000 nouveaux patients par an en France. Les traitements de référence associant les Immunomodulateurs, les inhibiteurs du Protéasome et plus récemment les anticorps monoclonaux comme le Daratumumab, ont permis une amélioration de la prise en charge des malades. Cependant, le MM reste à ce jour incurable, avec un taux de survie de 50% à 5 ans, nécessitant l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi elles, l'utilisation de CAR-T ciblant le BCMA, induisent de bonnes réponses chez des patients en rechute et réfractaires à plusieurs lignes de traitement. Mais la rémission reste limitée et les malades rechutent dans l'année. Ces résultats laissent penser que les traitements de première ligne, administrés aux patients du MM, pourraient impacter l'efficacité de la thérapie par CAR-T.

Dans ce travail, nous proposons une caractérisation phénotypique des T de patients au diagnostic (n=26), en rechute de chimiothérapie (n=23), sous Daratumumab (n=30) mais également en rechute de Daratumumab (n=10). Par ailleurs, nous avons transduit ces cellules avec des CAR anti-CS1 et anti-BCMA, afin d'étudier leurs propriétés fonctionnelles (n=10). Nos résultats montrent que les LyT des patients en rechute présentent des défauts phénotypiques majeurs tels que l'inversion du ratio CD4/CD8, la diminution du phénotype naïf (CD62+CD45RO-), du marqueur lié à l'activation (CD25) et l'augmentation du marqueur d'épuisement (PD1). Ils montrent également *in vitro* que les CAR-T anti-CS1 issus de ces patients ont des capacités prolifératives diminuées en réponse à l'antigène et une capacité lytique antitumorale altérée. Par ailleurs, nous observons également que les capacités fonctionnelles des CAR T produites à partir de cellules de patients traités par Daratumumab sont réactivées. Des résultats similaires sont obtenus avec des CAR-T anti-BCMA, indiquant que les défauts sont indépendants de l'antigène ciblé. Ces données montrent que les cellules T des patients en rechute présentent des caractéristiques d'épuisement pouvant réduire leur capacité thérapeutique. L'ensemble de ces résultats ouvre de nouvelles perspectives dans l'optimisation de la stratégie thérapeutique par CAR T dans le MM.

CAR-T cells generated from Multiple Myeloma patients at relapse have poor cytotoxic functions

Audrey Abecassis¹, Nathalie Roders¹, Maxime Fayon¹, Caroline Choisy¹, Elisabeth Nelson¹, Stephanie Harel^{1,2}, Bruno Royer^{1,2}, Camille Villesuzanne^{1,2}, Alexis Talbot^{1,2}, Jean-Paul Fermand^{1,2}, Mike Burbridge³, Bertrand Arnulf^{1,2} and Jean-Christophe Bories¹.

¹ INSERM, UMR 976, Institut de Recherche Saint-Louis, Université de Paris, Paris, France.

² Immuno-Hematology, Saint-Louis Hospital, Paris, France.

³ Oncology Translational and Clinical Research, Institut de Recherches Internationales Servier (IRIS), Suresnes, France.

Correspondance to : Jean-Christophe Bories, INSERM UMR 976, Institut de Recherche Saint-Louis, Hôpital St. Louis, 1 Avenue Claude Vellefaux, Paris cedex 10, France ;

Telephone: 33 1 57 27 67 88. Email: jean-christophe.bories@inserm.fr

Competing Interests statement: This work was supported by grants from the “Cancéropole Ile de France” and from the “Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies monoclonales”. M. Fayon was supported by fellowships from the “Société Française d’Hématologie”. A. Abecassis was supported by a fellowship from the “Agence Nationale pour la Recherche Scientifique, CIFRE” in partnership with Servier.

The development of novel therapeutic modalities associating proteasome inhibitors, immunomodulatory drugs and monoclonal antibodies, such as daratumumab, has extended the survival of multiple myeloma (MM) patients ¹. However, the disease remains incurable and more efficient therapies are needed for patients with relapsed and/or refractory (R/R) disease. T-cells expressing a Chimeric antigen receptor (CAR-T) represent a novel immunotherapy for cancers, including hematological malignancies. In most cases, CARs contain a single-chain variable fragment (scFv) recognising the target tumor antigen, which has been fused with CD3z and CD28 (or CD137) intracytoplasmic domains, which deliver activation and co-stimulatory signals, respectively, following antigen binding ². The CAR construct is introduced into the patient T cells by viral transduction *in vitro*, expanded *ex vivo* and then reinfused back to the patient. Using this autologous setting, high response rates (around 80%) were observed with anti-CD19 CAR-T in the treatment of patients with refractory/relapsed (R/R) B acute lymphoblastic leukemia (ALL) and B cell lymphoma ³. Building on these results, several constructs have been engineered to target MM tumor cells, including anti-CS1 (CD319) and

anti-GPRC5D CARs^{4,5}. However, the most clinically advanced CAR-T cell therapy for MM has been developed to target the B cell maturation antigen (BCMA), which is expressed on post germinal B cells and plasma cells⁶. Early clinical trials with autologous anti-BCMA CAR-T have produced interesting results in heavily pretreated R/R MM patients⁷. High response rates (around 80%) were observed but the median progression free survival is relatively short, ranging from 11 to 15 months depending on studies⁸.

Progression of MM is associated with major changes in the T cell compartment in blood and bone marrow of patients⁹. Decreased CD4/CD8 T cell ratio, elevation of regulatory (FOXP3+) over Th17 T cells and expression of exhaustion markers have been reported¹⁰. Furthermore, many MM therapies, such as autologous stem cell transplantation, exposure to IMiDs or to monoclonal antibodies, are thought to impact on the functional potential of T lymphocytes¹¹. It has recently been reported that the proliferative potential of CAR-T cells is impaired in relapsed MM patients¹². However, at present the processes that affect the efficiency of therapeutic T-cells in MM remain largely unknown.

To investigate the T cell populations in MM patients at various stages of the disease, we performed Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients at diagnosis (Diag) (n = 26), at relapse (RL) (n = 23), upon daratumumab treatment (Dara) (n = 30) and at relapse after daratumumab treatment (RDara) (n = 10) (Figure S1A), as well as from healthy donors (Don) (n = 27). As expected¹⁰, RL, Dara and RDara patients displayed inverted CD4/CD8 T cell ratios compared to Don and Diag cases (Figure S2A). In addition, the fraction of naïve CD4⁺ T cells (CD62L⁺, CD45RO⁻) was reduced in samples from RL and RDara compared to those isolated at diagnosis, and this reduction was significantly more pronounced in Dara patients (Figure 1A). We also observed elevated percentages of central memory CD4⁺ T cells (CD62L⁺, CD45RO⁺) in Dara patients and of effector memory (CD62L⁻, CD45RO⁺) in both RL and RDara compared to Diag samples. In contrast, no significant changes were observed in the different CD8⁺ T cell populations, although the central memory subset tended to be elevated in Dara patients (Figure S2B). Thus, the percentages of CD4⁺ T cells is decreased in treated MM patients and contains reduced percentages of naïve cells.

We next analyzed activation (CD69, CD25) and exhaustion (PD-1, LAG3) markers on PBMC T cells, whose expression correlates with engagement of T cells into specific stages of maturation. We found a significant elevation in the percentages of CD4⁺ cells expressing CD25, CD69, PD-1 and LAG3 in Dara patients (Figure S2 C and 1B). As daratumumab had previously been shown to affect regulatory T cells (Treg)^{13,14}, we investigated this cell population in Dara

patients. FACS analysis revealed similar percentages of Treg (FOXP3⁺ CD4⁺) in the blood of all groups of MM patients (Figure S3 A). However, among those cells, there was a marked decrease in the percentages of CD38 expressing cells in Dara patients (Figure S3 B). The percentages of PD-1 and LAG3 expressing cells was also slightly higher in CD8⁺ T cells from Dara patients compared to other groups (Figure 1B), while the ratios of CD25⁺ cells were moderately reduced (Figure S2 C). These results indicate that daratumumab treated MM patients display higher levels of activated CD4⁺ cells and increased percentages of exhausted T cells.

We next set up an *in vitro* assay to measure the expansion potential of the anti-CS1¹⁵ or scFv deficient CAR-T control (Mock) generated by lentiviral transduction of peripheral T cells from MM patients (Figure S1B). T cells were expanded for 6 days in anti-CD3/CD28 plus IL-2 medium, then washed from activation medium and plated on NIH 3T3 cells expressing the CS1 antigen. Seven days later, the numbers of live CAR-T in the culture were measured by FACS. We observed that the numbers of anti-CS1 CAR-T derived from RL were markedly reduced compared to those generated from Diag or Don and was similar to Mock controls (Figure 2A). Interestingly, CS1 mediated expansion of anti-CS1 CAR-T produced from Dara patients was more robust than CAR-T derived from RL or RDara, but was weaker than cells derived from Don or Diag (Figure 2A). Thus, the CS1 driven expansion of anti-CS1 CAR-T generated from treated patients is dramatically reduced *in vitro*. To explore activation and exhaustion processes of T cells in culture, we performed FACS to analyze the anti-CS1 CAR-T cell populations that develop after one week on CS1 expressing feeders. While CD25 and CD69 activation markers were similarly up-regulated on CAR-T from all 3 groups of patients (Figure S4A), we observed that the fraction of PD1-expressing CD4⁺ T cells was increased in cultures performed with CAR-T generated from RL and Dara compared to Diag and Don controls (Figure 2B). In line with this, CD8⁺ CAR-T derived from RL and Dara tended to display higher percentages of PD1⁺ cells. These results indicate that induction of an exhaustion program could contribute to the *in vitro* proliferation defect of CAR-T generated from RL and Dara patients. We next analyzed the potential of anti-CS1 CAR-T, produced from MM patients (Figure S1C), to kill firefly luciferase expressing MM1.S MM cell lines (MM1Sluc) *in vitro*. Luciferase levels, which reflect the number of live MM cells, were measured after overnight co-cultures of anti-CS1 CAR-T (effector: E) and MM1.Sluc (target: T). Various E:T ratios were tested to differentiate specific from non-specific lysis of MM cells by anti-CS1 or Mock CAR-T. At low E:T ratios, Mock CAR-T did not lyse MM1.Sluc cells, although, at higher ratios (5:1 and 2.5:1), weak nonspecific killing was observed (Figure 2C). In contrast, anti-CS1 CAR-T generated

from MM patients at diagnosis or under daratumumab treatment readily killed target cells at high as well as at intermediate E:T ratios (5:1 to 0.625:1) (Figure 2C and S4C). Remarkably, we observed that the cytotoxic activity of anti-CS1 CAR-T produced from RL and RDara patients was efficient only at high E:T ratios (5:1 and 2.5:1), and appeared much weaker at intermediate or low ratios (0.625:1 and 0.312:1) (Figure 2C and S4C). To test if this defect was dependent on the CS1 target, we established a second generation anti-BCMA CAR containing a CD137 (4-1BB) co-stimulation domain and tested the cytotoxic activity of T cells from all 4 groups of MM patients expressing this construct. We observed that anti-BCMA CAR-T from RL and RDara displayed a weaker cytotoxic activity against MM cells compared to Diag and Dara patients (Figure 2C and S4C). Thus, CAR-T generated from patients at relapse display weaker specific killing activity compared to those derived from MM patients at diagnosis or under daratumumab treatment.

In order to investigate the activity of CAR-T from MM patients in more physiological system, we developed a human MM xenograft mouse model (Figure S4B). MM1.Sluc cells were inoculated in immunodeficient mice and luciferase levels measured with an IVIS Imaging System. Twenty-one days after MM1.S injection, CAR-T from Diag, RL or Dara patients (Figure S1C) were transplanted I.V. into engrafted mice and bioluminescence measured every 3 or 4 days (Figure S4B). While control mice that received no therapeutic T cells showed rapid tumor progression, those treated with Diag CAR-T displayed a marked reduction in tumor growth (Figure 2D and S4B). In contrast, mice treated with CAR-T from Dara patients showed faster MM growth, and those injected with CAR-T from RL had no sign of anti-tumor activity compared to Diag CAR T. In order to further evaluate the efficiency of CAR-T patients over time, we compared the survival of mice injected with anti-CS1 CAR-T generated from Diag, RL and Dara. We observed that mice treated with CAR-T from Diag had a significantly longer survival than those that received CAR-T from RL or that were left untreated (Figure 2E). These results show that CAR-T generated at diagnosis are more efficient than those derived from treated patients to control MM tumor progression *in vivo*.

Altogether our results reveal profound defects in the peripheral T cell populations in relapse MM patients as well as in those who were treated with daratumumab. We report marked reduced proliferative and killing activities for CAR-T generated from relapse MM patients compared to those derived from patients at diagnosis. T cells from patients early in myeloma therapy were recently shown to exhibit better fitness for CAR T manufacturing than those from relapsed/refractory patients¹². Our data are in line with this report and further suggest that the decrease of naïve T cells observed in treated patients could affect the activity of CAR-T.

However, our results also indicate that, while patients who were treated with daratumumab display reduced percentages of naïve T cells, they generate relatively efficient CAR-T. Thus, the defects in peripheral T cell populations is not the only factor responsible for the poor fitness of CAR-T. Analysis of CAR-T manufactured from patients in relapse of daratumumab treatment could shed new lights on this issue.

Contributions

AA, MB, BA and JCB designed the study, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript; AA, MF and NR performed experiments and statistical analysis; BR, SH, CV, AT, JPF and BA provided the patients and collected clinical data; all authors gave final approval for the manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by grant from the “Cancéropole Ile de France” and from the “Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies monoclonales”. M. Fayon was supported by a fellowship from the “Société Française d’Hématologie”. A. Abecassis was supported by a fellowship from the “Agence Nationale pour la Recherche Scientifique, CIFRE” in partnership with Servier. We are also grateful to David Garrick and Michele Goodhardt for critical reading of the manuscript, to Carolina Martinez-Cingolani, the animal facility and to the pole of cytometry of the “Institut de Recherche Saint-Louis” for technical help.

REFERENCES

- 1 Gay, F. *et al.* From transplant to novel cellular therapies in multiple myeloma: European Myeloma Network guidelines and future perspectives. *Haematologica* **103**, 197-211, doi:10.3324/haematol.2017.174573 (2018).
- 2 Boyiadzis, M. M. *et al.* Chimeric antigen receptor (CAR) T therapies for the treatment of hematologic malignancies: clinical perspective and significance. *J Immunother Cancer* **6**, 137, doi:10.1186/s40425-018-0460-5 (2018).
- 3 Maude, S. L. *et al.* Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* **378**, 439-448, doi:10.1056/NEJMoa1709866 (2018).
- 4 Gogishvili, T. *et al.* SLAMF7-CAR T cells eliminate myeloma and confer selective fratricide of SLAMF7(+) normal lymphocytes. *Blood* **130**, 2838-2847, doi:10.1182/blood-2017-04-778423 (2017).
- 5 Smith, E. L. *et al.* GPRC5D is a target for the immunotherapy of multiple myeloma with rationally designed CAR T cells. *Sci Transl Med* **11**, doi:10.1126/scitranslmed.aau7746 (2019).
- 6 D'Agostino, M. & Raje, N. Anti-BCMA CAR T-cell therapy in multiple myeloma: can we do better? *Leukemia* **34**, 21-34, doi:10.1038/s41375-019-0669-4 (2020).
- 7 Brudno, J. N. *et al.* T Cells Genetically Modified to Express an Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor Cause Remissions of Poor-Prognosis Relapsed Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* **36**, 2267-2280, doi:10.1200/JCO.2018.77.8084 (2018).

- 8 Raje, N. *et al.* Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med* **380**, 1726-1737, doi:10.1056/NEJMoa1817226 (2019).
- 9 Suen, H. *et al.* Multiple myeloma causes clonal T-cell immunosenescence: identification of potential novel targets for promoting tumour immunity and implications for checkpoint blockade. *Leukemia* **30**, 1716-1724, doi:10.1038/leu.2016.84 (2016).
- 10 Joshua, D. *et al.* The T Cell in Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **16**, 537-542, doi:10.1016/j.clml.2016.08.003 (2016).
- 11 Pessoa de Magalhaes, R. J. *et al.* Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica* **98**, 79-86, doi:10.3324/haematol.2012.067272 (2013).
- 12 Garfall, A. L. *et al.* T-cell phenotypes associated with effective CAR T-cell therapy in postinduction vs relapsed multiple myeloma. *Blood Adv* **3**, 2812-2815, doi:10.1182/bloodadvances.2019000600 (2019).
- 13 Feng, X. *et al.* Targeting CD38 Suppresses Induction and Function of T Regulatory Cells to Mitigate Immunosuppression in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* **23**, 4290-4300, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-3192 (2017).
- 14 Krejcik, J. *et al.* Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood* **128**, 384-394, doi:10.1182/blood-2015-12-687749 (2016).
- 15 Chu, J. *et al.* Genetic modification of T cells redirected toward CS1 enhances eradication of myeloma cells. *Clin Cancer Res* **20**, 3989-4000, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2510 (2014).

Legends

Figure 1. Flow cytometric analysis of the T-cell subsets in the peripheral blood of MM patients. A. Shown are the percentages of Naïve (CD3+, CD62L+, CD45RO-), Effector (CD3+, CD62L-, CD45RO-), Central Memory (CD3+, CD62L+, CD45RO+) and Effector Memory (CD3+, CD62L-, CD45RO+) among CD4 expressing cells from healthy donors (Don, N = 27), MM patients at diagnosis (Diag, N = 26), patients at relapse MM (RL, N = 23), treated with daratumumab (Dara, N = 30) and in relapse after daratumumab treatment (RDara, N = 10). B. Analysis of exhaustion markers in peripheral blood T-cells from MM patients. Shown are the percentages of PD1 and LAG3 expressing cells among CD4 (upper) or CD8 (lower) positive CD3+ cells in Don (N = 12), Diag (N = 16), RL (N = 13), Dara (N = 23) and RDara (N = 10). P-values were examined with a Mann-Whitney U-test. *P≤0.05, **P≤0.005, ***P≤0.001.

Figure 2. Functional analysis of CAR-T from MM patients. A. Scatter plot showing the numbers of live CAR-T cells cultured for 7 days on NIH3T3 cells expressing the CS1 antigen. Anti-CS1 CAR-T (CS12G) or non-functional CAR-T (MK) were generated from donors (Don, N = 8) and MM patients at diagnosis (Diag, N = 10), in relapse MM (RL, N = 10), treated with daratumumab (Dara, N = 11) or in relapse after daratumumab treatment (RDara, N = 3) were expanded with anti-CD3/anti-CD28 beads and Interleukine-2 (IL-2) for 6 days, then separated from beads/IL-2 and $5 \cdot 10^4$ cells were plated on feeders. B. Scatter plot showing the percentages of PD1 expressing cells among CD4+ or CD8+ CAR-T generated from the indicated groups of MM patients (as in A). C. Anti-CS1 and anti-BCMA CAR-T cells from MM patients at relapse display poor cytotoxic activity against MM cell *in vitro*. Luciferase expressing MM1.S cells (Target:T) were co-cultured with anti-CS1 CAR-T (CS1) or non-functional CAR-T (MK) from MM patients. CAR-T (effector: E) were generated from patients at diagnosis (Diag, N = 9), at relapse (RL, N = 9), or in relapse after daratumumab treatment (RDara, N = 3), at various effector/target (E:T) cell ratios for 24 hours. Curves represent the luciferase activity in the co-cultures after 24 hours. In vitro killing activity of anti-BCMA CAR-T (BCMA) was measured in the same conditions with Diag (N = 5), RL (N = 5) and RDara, (N = 3). P-values were examined with a *two-way ANOVA test* (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001). D. *In Vivo* activity of anti-CS1 CAR-T generated from MM patients in the MM1.Sluc Xenograft mouse model (see Figure S4). Shown are the longitudinal radiance levels (luciferase activity) measured in mice injected with CAR-T (dotted line) from MM patients (Diag, RL, Dara) or left untreated (NT). Radiance was measured on the entire body of mice. These experiments were performed with CAR-T generated from 3 independent patients of each group, each injected into 3

independent mice (9 mice per group). (C) Kaplan-Meier analysis of survival of MM1.S Luc mice injected with anti-CS1 CAR-T from patients (Diag (N = 9), RL (N = 9), Dara (N = 10)) or with no CAR-T (controls, N = 6). P values were determined with log-rank Gehan-Breslow Wilcoxon tests (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

Figure 1

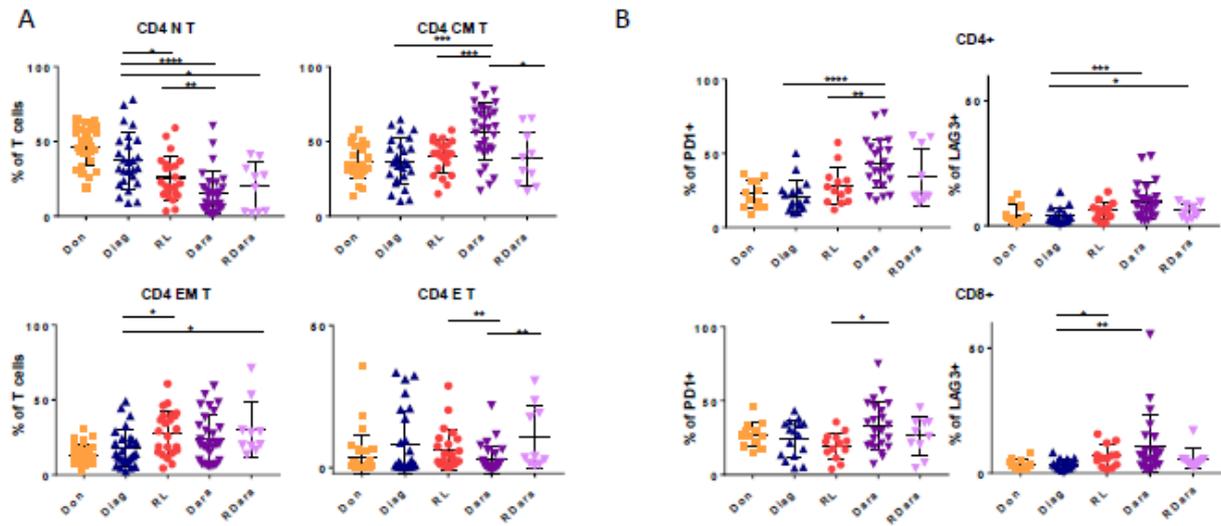
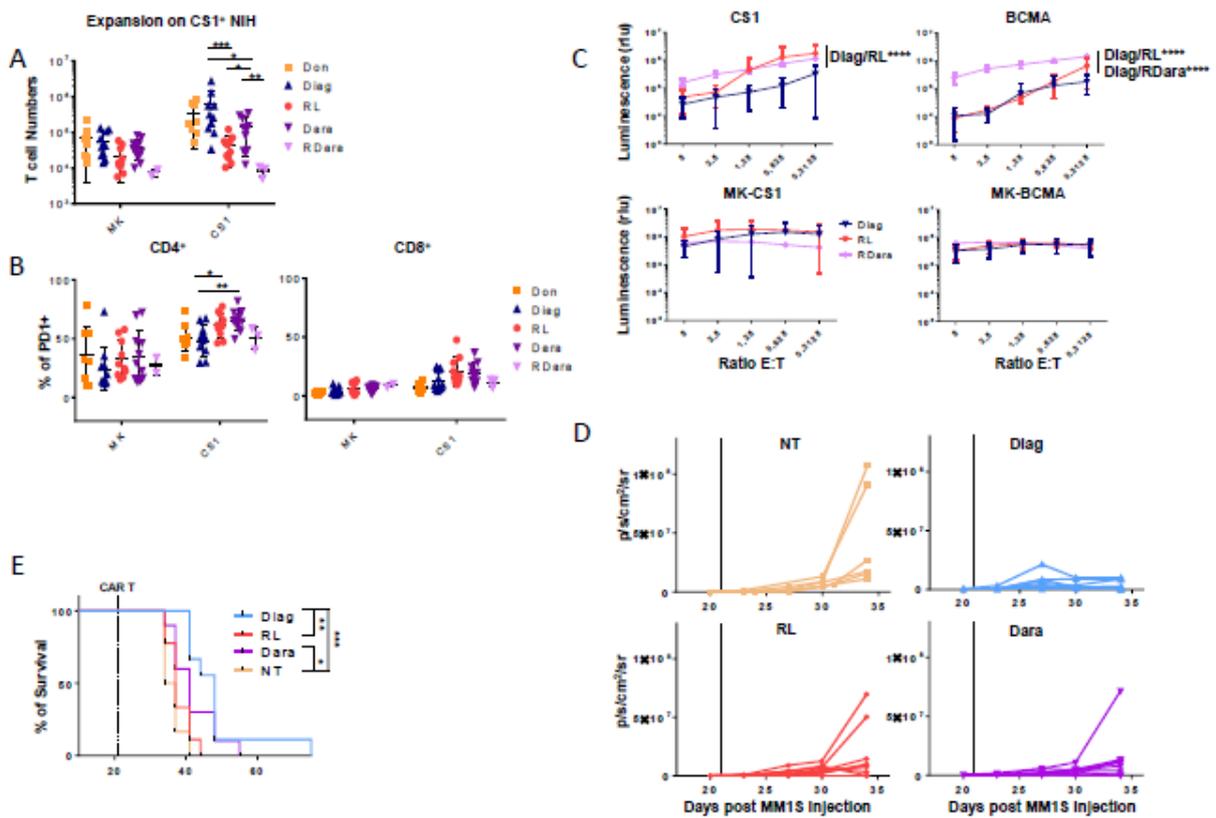


Figure 2



Supplementary Legends

Supplementary Figure 1: Demographics and clinical characteristics of Multiple Myeloma patients included in phenotypic analysis (A), proliferation (B), *in vitro* killing assays (C) and *in vivo* killing assays (D).

Supplementary Figure 2: Phenotypic analysis of PBMC isolated from healthy donors (Don, N = 27), MM patients at diagnosis (Diag, N = 26), at relapse MM (RL, N = 23), treated with daratumumab (Dara, N = 30) and in relapse after daratumumab treatment (RDara, N = 10). A. Shown are the percentages of CD4 and CD8 positive cells among CD3⁺ T cells. B. Scatter plot represent the percentages of Naïve (CD3⁺, CD62L⁺, CD45RO⁻), Effector (CD3⁺, CD62L⁻, CD45RO⁻), Central Memory (CD3⁺, CD62L⁺, CD45RO⁺) and Effector Memory (CD3⁺, CD62L⁻, CD45RO⁺) cells among CD8⁺ T cells. C. Analysis of activation markers in peripheral blood T-cells from MM patients. Shown are the percentages of CD25 and CD69 expressing cells among CD4 (upper) or CD8 (lower) positive CD3⁺ cells. P-values were examined with a Mann-Whitney U-test. *P≤0.05, **P≤0.005, ***P≤0.001.

Supplementary Figure 3: Flow cytometric analysis of regulatory T cell populations in the blood of MM patients at diagnosis (Diag, N = 13), at relapse MM (RL, N = 10), treated with daratumumab (Dara, N = 12) and at relapse after daratumumab treatment (RDara, N = 11). Shown are the gating strategies (left) and the percentages of CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺ (A) and CD4⁺CD38⁺FOXP3⁺ (B) in PBMC from the indicated patients. P-values were examined with a Mann-Whitney U-test. *P≤0.05, **P≤0.005, ***P≤0.001.

Supplementary Figure 4: Analysis of CAR-T from MM patients following *in vitro* stimulation. A. Shown are the percentages of CD25 and CD69 expressing anti-CS1 CAR-T from healthy donors (Don, N=8), MM patients at diagnosis (Diag, N=10), at relapse MM (RL, N=10), treated with daratumumab (Dara, N=11) and at relapse after daratumumab treatment (RDara, N=3), following 1 week in culture on CS1⁺ NIH3T3 feeders. P-values were examined with a Mann-Whitney U-test. *P≤0.05, **P≤0.005, ***P≤0.001. B. (Upper). Treatment schedule. Six to 12-week-old NOD/SCID/IL-2R⁰ null mice were inoculated with 5.10⁶ MM1.SLuc cells by tail vein injection (i.v) at day 0, followed, 21 days later, by infusion of 1.10⁶ anti-CS1 CAR-T generated from MM patients at diagnosis (Diag, N=9), at relapse (RL, N=9), under daratumumab treatment (Dara, N=6). At this time point, similar levels of luciferase-expressing MM cells were detected in all mice. Bioluminescence was measured with the IVIS Imaging

System every 3 or 4 days (arrows). (Lower) Average radiance in mice treated with anti-CS1 CAR-T. P-values were examined with a *two-way ANOVA test* (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). C.Luciferase expressing MM1.S cells (Target:T) were co-cultured with anti-CS1 CAR-T (CS1) or non-functional CAR-T (MK) from MM patients. CAR-T (effector: E) were generated from patients under daratumumab treatment (Dara, N = 10), at relapse (RL, N = 9), or in relapse after daratumumab treatment (RDara, N = 3), at various effector/target (E: T) cell ratios for 24 hours. Curves represent the luciferase activity in the co-cultures after 24 hours. In vitro killing activity of anti-BCMA CAR-T (BCMA) was measured in the same conditions with Dara (N = 6), RL (N = 5) and RDara, (N = 3). P-values were examined with a *two-way ANOVA test* (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Supplementary Figure 1

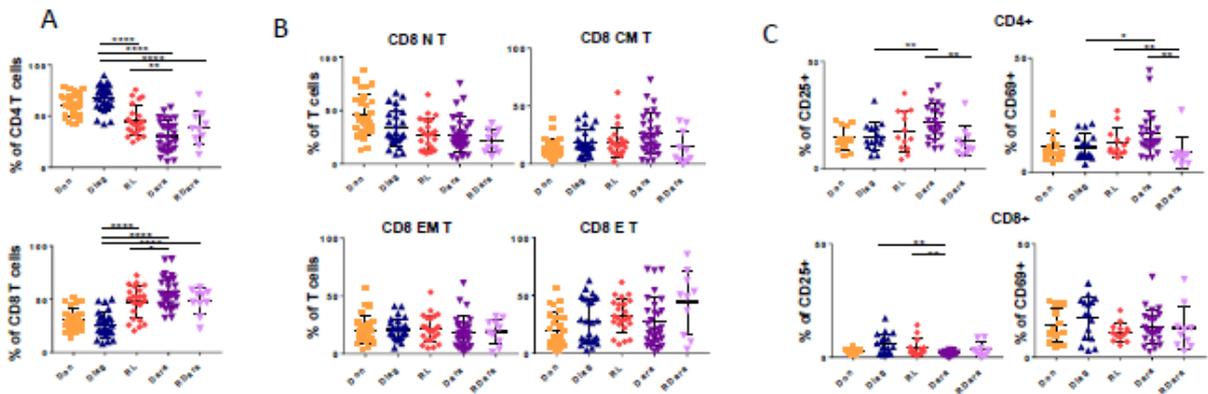
	Diag (N=27)	RL (N=24)	Dara (N=30)	RDara (N=10)
Age (Mean)	65,4	65,7	68,9	68,7
Time since diagnosis (Mean)	-	5,7	9,4	10,3
Prior lines of treatment %				
IMiDs	-	79,1	100	100
PI	-	95,8	93,3	90
Alkylating agent	-	70,8	86,6	90
HSCT	-	41,6 (1allo)	60 (2allo)	60 (1allo)

	Diag (N=10)	RL (N=10)	Dara (N=11)	RDara (N=3)
Age (Mean)	65,8	67,4	67,6	76,6
Time since diagnosis (Mean)	-	6,8y	11,5y	10,6y
Prior lines of treatment %				
IMiDs	-	60	100	100
PI	-	100	90,9	100
Alkylating agent	-	100	81,8	66,6
HSCT	-	60	54,5	33,33

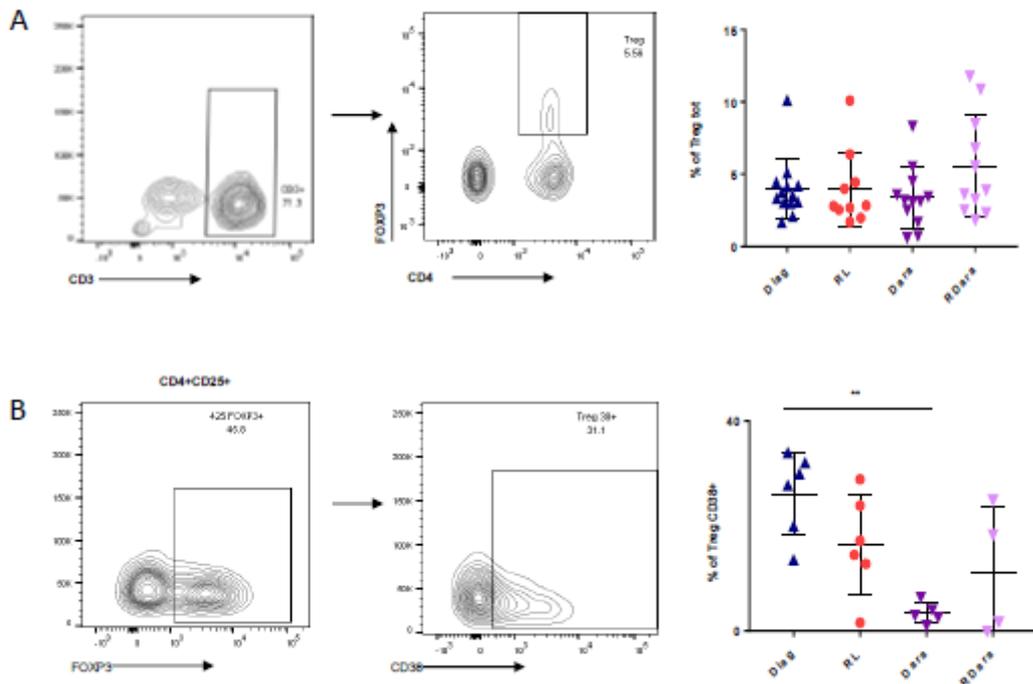
	Diag (N=9)	RL (N=9)	Dara (N=10)	RDara (N=3)
Age (Mean)	66	69,8	68,4	76,6
Time since diagnosis (Mean)	-	6,8y	10,2y	10,6y
Prior lines of treatment %				
IMiDs	-	55,5	100	100
PI	-	100	90,9	100
Alkylating agent	-	100	81,8	66,6
HSCT	-	55,5	54,5	33,33

	Diag (N=3)	RL (N=3)	Dara (N=3)
Age (Mean)	65,3	72	70,3
Time since diagnosis (Mean)	-	4y	6,3y
Prior lines of treatment %			
IMiDs	-	66,6	100
PI	-	66,6	100
Alkylating agent	-	33,3	66,6
HSCT	-	0	33,3

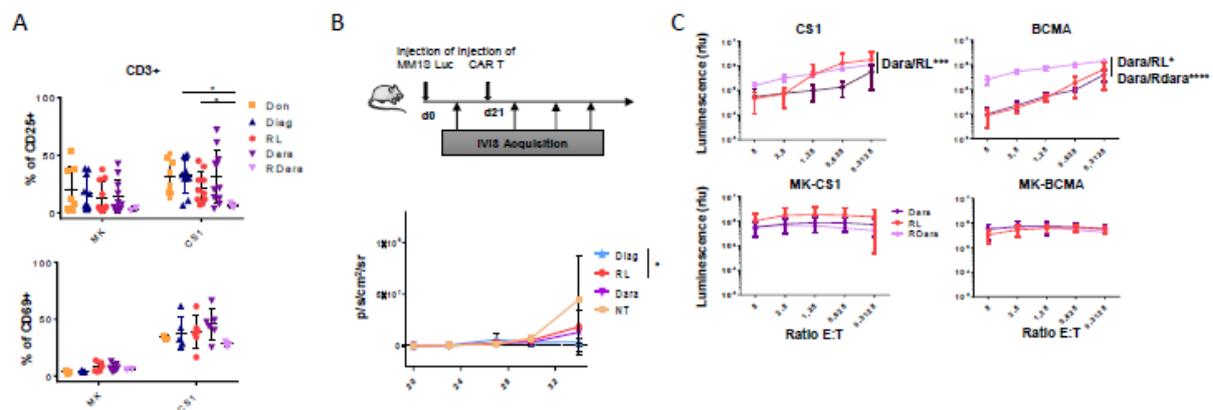
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



II. Etude d'un nouvel anticorps bispécifique anti-CD38/CD3

Dans le cadre de ma thèse, et indépendamment de notre activité liée à la thèse Cifre, nous avons participé au développement d'un nouvel anticorps bispécifique anti-CD38/CD3.

Ces dernières années les anticorps monoclonaux (AcMo) ciblant CD38, comme le Daratumumab, ont montré de très bonnes efficacités chez les patients atteints de myélome multiple (MM) en monothérapie mais également en association. Malgré ces progrès, les malades rechutent du fait de mécanismes d'échappement tels que la baisse de l'expression de CD38 via le Récepteur Fc, mais également de l'inhibition des voies du complément, dépendante des anticorps ou de la phagocytose. Les anticorps de type Bi spécifiques T-cell Engager (BiTE) représentent une nouvelle classe d'agents immuno- thérapeutiques, reconnaissant d'un côté l'antigène spécifique de la tumeur, et de l'autre les lymphocytes T en ciblant le plus souvent la chaîne CD3 ϵ . Ainsi, en recrutant les LT sur leur cible et en les activant, les BiTEs favorisent la lyse tumorale.

Nous avons développé un BiTEs reconnaissant, d'une part, l'antigène CD38, fortement exprimé à la surface des plasmocytes tumoraux, et, d'autre part, le récepteur CD3 ϵ . Nos résultats montrent que ce BiTE, Bi38-3, est capable de reconnaître spécifiquement les plasmocytes tumoraux. En présence de Bi38-3, les lymphocytes T issus de donneurs sains sont capables de développer une forte activité cytotoxique, spécifique des lignées cellulaires de MM *in vitro*. D'une façon intéressante, Bi38-3 ne présente pas d'effet cytotoxique contre les cellules B, T et NK qui expriment de faibles niveaux de CD38, en comparaison aux cellules de MM. Enfin, le Bi38-3 est capable de contrôler de manière efficace la croissance tumorale dans un modèle murin de xénogreffe de cellules myélomateuses.

Ces résultats démontrent que Bi38-3 représente un nouvel agent immuno- thérapeutique anti-myélomateux, qui, utilisé seul ou en association avec les immunomodulateurs, pourrait améliorer le pronostic des malades réfractaires aux traitements actuellement disponibles.

L'article relatif à ce travail est situé dans la section annexes de ce manuscrit.

Discussion et perspectives

I. Discussion

Au cours des dernières années, des avancées majeures ont été réalisées dans le traitement du MM. Les thérapies de référence associant les Immunomodulateurs, les inhibiteurs du Protéasome et plus récemment les anticorps monoclonaux tel que le Daratumumab, ont permis une amélioration de la prise en charge des malades et un allongement de la survie des patients, la portant à 7 ans. (Nijhof, 2018) Cependant, le MM est une pathologie hétérogène dans laquelle existent de nombreux sous-groupes de patients, définis par des altérations génétiques récurrentes, responsables de chimiorésistances. (Herve Avet-Loiseau, 2007) (Paiva, 2012) Ainsi, en dépit de ces améliorations récentes, le MM reste à ce jour incurable nécessitant l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le succès incontestable des CAR T dans le traitement des hémopathies lymphoïdes laisse espérer que l'adaptation de cette stratégie au MM pourrait apporter une solution aux patients réfractaires aux traitements conventionnels. Dans cette pathologie, les CAR-T ciblant l'antigène BCMA ont donné des résultats intéressants chez des patients ayant reçu plusieurs lignes de chimiothérapie, avec des taux de réponse d'environ 80%. (D'Agostino, 2020) (Raje, 2019) (Brudno, 2018) Cependant, la persistance des CAR T reste limitée, donnant des survies sans progression entre 6 et 15 mois. (Wudhikarn, 2020) L'identification des mécanismes associés à la progression du MM après CAR T thérapie pourrait permettre d'améliorer la prise en charge de ces malades.

Dans ce travail de thèse, nous avons pu construire deux CARs, dirigés contre des antigènes tumoraux spécifiques du MM. Le premier est un CAR anti-CS1 décrit dans la littérature, associant les domaines de signalisation intracellulaire CD28 et CD3 ζ , et efficace contre les cellules de MM. Le second est constitué du scFv d'un anticorps anti-BCMA, associé aux domaines intracellulaires 41BB et CD3 ζ , dans une construction originale. Grâce aux modèles cellulaires que nous avons contribué à constituer au sein du laboratoire (article en annexe), nous avons pu montrer que ces deux CAR T, obtenus par transduction lentivirale dans des LyT de donneurs, avaient une activité lytique spécifique contre les lignées de MM *in vitro*. De plus, une collaboration étroite avec le département d'immuno- hématologie clinique de l'hôpital Saint-Louis, nous a permis d'obtenir des prélèvements sanguins d'une large cohorte de patients au diagnostic (Diag), en rechute de chimiothérapie (RL), sous Daratumumab (Dara) mais

également en rechute de Daratumumab (RDara). Cela nous a permis de générer des CAR T de patients à différents stades du MM.

Ainsi, les CAR T anti-CS1 de patients au diagnostic montrent une forte activité antitumorale, alors que ceux transduits dans des cellules de patients en RL montrent une fonctionnalité altérée (Figure 2C de l'article). Cette observation est appuyée par les résultats observés dans les modèles murins (Figure 2D et 2E de l'article) laissant penser que ce défaut des CAR T RL n'est pas dû aux conditions de culture. De plus, les CAR T anti-BCMA RL présentent également une baisse de leur capacité lytique *in vitro*. Par ailleurs, comme discuté plus tôt, le domaine de costimulation peut donner des propriétés spécifiques au CAR. Alors que CD28 permettrait une réponse rapide, favorisant la prolifération, 4-1BB orienterait le développement de CAR T persistants. (Sadelain, 2017) Ainsi, nos données indiquent que les défauts fonctionnels des CAR T RL sont indépendants de la structure du CAR (cible et signal de costimulation), mais reposeraient davantage sur des altérations intrinsèques aux cellules utilisées pour la thérapeutique.

Au regard de cette conclusion et appuyé par la baisse des propriétés lytiques des CAR T RL et RDara par rapport aux Diag, nous avons analysé les aspects phénotypiques des LyT utilisés. Il se trouve que les cohortes de patients traités (RL, Dara et RDara) présentent une inversion du Ratio CD4/CD8. Nos résultats confirment ceux de la littérature, qui suggèrent que l'inversion du ratio CD4/CD8 est associé à de mauvaises réponses cliniques chez les patients traités par CAR T anti-BCMA. (Cohen, 2019) (Garfall, 2019)

De plus, alors que ces études montrent un défaut d'expansion des CAR T, de patients en rechutes, dans un modèle de culture « artificielles » (billes anti-CD3/CD28), nos données indiquent que les CAR T RL ont une faible prolifération en réponse à la liaison CAR T/Ag (Figure 2A de l'article). Cependant, en réponse à l'Ag, les CAR T Dara présentent de meilleurs niveaux de prolifération par rapport aux RL, alors qu'ils possèdent un ratio CD4/CD8 plus faible. Ceci implique donc que la modification du ratio CD4/CD8 n'est pas un élément majeur dans les dysfonctions des CAR T chez les patients traités du MM.

D'autre part, les caractéristiques des patients montrent un âge similaire pour l'ensemble des cohortes (autours de 67 ans) et qu'environ 50% d'entre eux ont bénéficié d'une autogreffe de cellules souches. Enfin, les patients traités (RL, Dara et RDara) ont en majorité reçu au moins

une ligne d'IMiDs, d'IP ou de Melphalan. De ce fait, la diminution de l'efficacité des CAR T RL n'est pas un processus irréversible, puisqu'elle est partiellement restaurée chez les patients traités par Daratumumab.

D'une façon intéressante, notre travail révèle que les marqueurs d'épuisement PD1 et LAG3 sont exprimés préférentiellement sur les LyT des patients RL ou Dara, par rapport aux patients Diag (Figure 1B). Or, il faut noter que ces marqueurs sont associés à des programmes d'inhibition et donc à une baisse de la fonctionnalité des T. (Stock, 2019) De la même façon, le pourcentage de CAR T CD4+ exprimant PD1 est augmenté chez ces patients après 7 jours de stimulation antigénique (Figure 2B de l'article). Parallèlement, les marqueurs d'activation, notamment CD69, sont induits de façon similaire sur les CAR T stimulés chez les Diag, RL et Dara (Figure S4A de l'article). Ces données suggèrent qu'ils ont la capacité de répondre à la stimulation chimérique, mais que cette activation se traduit différemment en fonction de l'histoire de la maladie.

Ainsi, nous pouvons observer que les CAR T Diag montrent une prolifération robuste, alors que les CAR T Dara présentent une capacité d'expansion limitée. Il faut noter que les CAR T RL montrent une altération de cette propriété encore plus marquée (Figure 2A de l'article). Ce qui suggère que bien que les interactions PD1/PDL ne soient probablement pas reproduites dans notre système, le défaut de prolifération des CAR T de patients traités pourrait être du, au moins en partie, par l'induction d'un programme d'épuisement. Des résultats similaires ont été observés dans les LLC, où les patients présentant des réponses complètes ont une faible expression de PD1 sur les CAR T. (Fraieta, 2018)

D'autres processus, comme l'induction du suppresseur de tumeurs p16(INK4a) associé à certains mécanismes de vieillissement des cellules T, pourraient également participer aux défauts fonctionnels des CAR T chez les patients poly-traités. (Liu, 2009) L'analyse des profils transcriptomiques des CAR T des différentes cohortes, pourrait jeter un éclairage nouveau sur ces mécanismes moléculaires, et à terme pourrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies de production.

La progression du myélome et les rechutes s'accompagnent d'altérations majeures des sous populations T, présentant des défauts phénotypiques et fonctionnels. (Busch, 2016) (Seder, 2003) (Kay, 2001) (Suen, 2016) Notre étude phénotypique montre une diminution des LyT CD4 naïfs chez les patients traités, et une augmentation des TCD4 centrales mémoires chez les patients Dara (Figure 1A de l'article). Une tendance similaire semble affecter le compartiment

CD8, même si les variations mesurées ici ne sont pas significatives. Des travaux dans la littérature ont montré l'existence d'une corrélation entre le niveau de T CD8 mémoires (CD27+CD45RO) dans les aphérèses (et/ou les CAR T) et la réponse clinique. (Cohen, 2019) (Garfall, 2019) Un phénotype T_{CM}, confèrerait aux CAR T une meilleure persistance. (Singh, 2016) Cependant, l'implication des CAR T CD4, possédant une activité cytotoxique, n'avait pas été explorée. (Varadarajan, 2013)

Ainsi, notre travail suggère que la présence de de LyT CD4 naïves ou centrales mémoires, comme chez les patients Diag et Dara, pourrait être un marqueur prédictif de réponse clinique des CAR T dans le MM.

Plusieurs perspectives d'optimisation semblent s'ouvrir.

II. Perspectives pour améliorer l'efficacité des T en clinique

1. Étudier le génome de ces patients

Les aspects dont nous venons de discuter, donnent des explications sur le fait que l'activité des CAR T anti-BCMA ne dure pas dans le temps. Ceci étant, nous ne savons pas d'un point de vue moléculaire ce qu'il se passe dans les cellules. C'est pour cela que nous aurions pu étudier l'ARN des CAR T de chaque cohorte, afin de mettre en évidence d'éventuelles différences de transcriptome.

2. Utiliser des T plus précoces

Nos résultats indiquent que les CAR T de patients au diagnostic sont les plus efficaces. Aussi, il pourrait être envisagé d'utiliser cette stratégie thérapeutique plus tôt. Soit en adoptant les CAR T directement au diagnostic, soit en conservant les PBMCs des patients au diagnostic, pour les transduire au moment de la rechute. Afin d'observer les bénéfices de ce genre de stratégie, il aurait fallu obtenir dans notre projet, des PBMCs du même patient au diagnostic et à la rechute, pour générer des CAR T et les utiliser sur des plasmocytes tumoraux de ce patient à la rechute. Cependant les CAR T ne pourront pas remonter les lignes de traitement tant que les essais cliniques sur des patients peu traités n'auront pas donnés de résultats concluants.

Nous aurions pu également pousser notre analyse sur des cohortes de patients asymptomatiques pour voir si leurs propriétés phénotypiques et fonctionnelles étaient meilleures que celles des patients au diagnostic. Si cela était vérifié nous pourrions même envisager de prélever et

conserver les T de patients MGUS et SMM, afin de les utiliser au moment du diagnostic ou des rechutes. Nous pourrions également commencer à traiter les patients MGUS et SMM, dans l'idée de bloquer de façon extrêmement précoce la prolifération monoclonale des plasmocytes. Cependant il faut se demander s'il serait éthique de traiter un patient dont la balance bénéfique/risque n'est pas encore critique.

3. CAR T Allogéniques

Dans la même logique, l'utilisation de LyT allogéniques, provenant de donneurs sains, semblerait être une solution alternative. Cependant ce type de stratégie pourrait présenter des inconvénients majeurs, comme la non compatibilité des donneurs et des receveurs déclenchant une réaction des lymphocytes T du donneur contre le receveur (GVHD) ou un rejet de la greffe par le receveur. Dans les deux cas la persistance et l'efficacité des CAR T seraient limitée. Des techniques d'édition du génome sont utilisées pour palier à ces inconvénients, notamment en éteignant l'expression du TCR endogène dans les cellules à greffer.

Cinq CAR T sont actuellement en développement, quatre ciblant BCMA et un CS1.

ALLO-715

ALLO-715 est le CAR de 2^{ème} génération (4-1BB) anti-BCMA allogénique d'Allogene Therapeutics, développé en partenariat avec Cellectis. Dessiné pour exprimer un scFv humain, il possède également un « safety switch ». Afin d'éviter les réactions immunitaires de l'hôte vers la greffe ou de la greffe vers l'hôte, des stratégies de « Gene Editing » sont utilisées. Ici, il s'agit de TALEN® (Transcription Activator-like Effector Nucleases) qui éteint l'expression du TCR α et du CD52, rendant le produit résistant aux anti-CD52 utilisés dans le régime de lymphodépletion. Il est actuellement testé en phase I UNIVERSAL (NCT04093596), où les premiers résultats montrent une bonne efficacité clinique. Il est important de noter qu'aucune GvHD n'a été observée. (Sommer, 2018) (Mailankody, 2020) (Allogene Therapeutics, 2020)

PBCAR269A/CTX120

Respectivement de Precision Bioscience et de Crispr Therapeutics, ces deux CARs allogéniques ciblent BCMA et sont en phase clinique I/IIa (NCT04171843) et I (NCT04244656). Ils éteignent tous deux l'expression du TCR via des techniques de « Gene Editing » comme ARCUS une plateforme utilisée par Precision bioscience ou par Crispr/Cas 9 plus connue. Ces deux techniques permettent également d'intégrer le gène du CAR au niveau

du locus du TRAC endogène, favorisant une expression plus homogène. (Dar, 2018) (Precision Biosciences, 2020)

P-BCMA-ALLO1

Est le CAR anti-BCMA allogénique de Poseida. Son design comprend un gène codant pour un domaine variable de la chaîne légère, associé au gène du CAR. Il est construit pour permettre une sélection des CAR⁺ par addition d'une molécule chimique dans le milieu de culture, possède un « safety switch », et il est « édité » par Cas-Clover, pour éteindre l'expression du TCR et de la B2 microglobuline, diminuant l'expression du CMH 1. De plus, la transduction non virale utilisée par Poseida, favorise les cellules T « Naive » et « Stem Cell Memory » donnant une meilleure persistance que les Lentivirus qui eux transduiraient plus facilement les LyT centrales mémoires et les effectrices mémoires. (Cranert, 2019) (Richter, 2019)

UCAR T-CS1

Cellectis a également développé un CAR allogénique anti-CS1 (α CS1-CD8-41BB), utilisant la technologie TALEN® éteignant l'expression du TCR, mais également de CS1 limitant ainsi l'effet fratricide sur les Ly T CD8. La préservation des CAR T CD8⁺ se traduit par une augmentation de la capacité lytique. Par ailleurs, le CAR est doté d'un « safety switch » RQR8. Après de bons résultats *in vitro* et *in vivo*, un premier essai clinique (NCT04142619 MELANI-01) a été mis en place fin 2019, avec une première administration à l'homme en octobre 2019. (Galetto, 2015) (Mathur, 2017) Aucun résultat n'est pour le moment disponible

Nous n'avons pas encore de recul sur cette stratégie et si nous nous penchons sur les résultats que nous avons obtenus au cours de ce travail de thèse, nous sommes en droit de nous demander si elle montre un réel avantage. Effectivement, il ne semble pas y avoir de différences entre les CAR T de patients au Diagnostic par rapport aux CAR T de Donneurs. Dans certaines manips, nous observons même un avantage à l'utilisation de CAR T de patient au diagnostic. Je me permettrais d'émettre l'hypothèse suivante, à savoir que les cellules T des patients, de par leur contact avec la tumeur, pourraient avoir été « éduquées » pour reconnaître l'antigène tumoral. Mais cette hypothèse est à prendre avec pincette, effectivement les cellules de MM sont en majorité nichées dans la moëlle osseuse, ce qui limite les interactions des LyT avec l'antigène tumoral.

III. Perspectives pour améliorer l'efficacité des CAR en clinique

D'autres stratégies peuvent être envisagées visant à soutenir l'action des T, soit en renforçant l'activité du CAR en lui-même, soit en l'associant. Il est également possible de cibler plusieurs antigènes, dans l'objectif d'éliminer les cellules tumorales qui pourraient exprimer un autre antigène que BCMA et qui seraient responsables des rechutes BCMA.

1. Améliorer l'expression du CAR à la surface

Indépendamment des capacités physiologiques des cellules effectrices, l'amélioration des techniques de génétique utilisées dans la transduction, pourrait améliorer cette stratégie. Notamment en choisissant d'intégrer le CAR par « Gene Editing » à l'aide de Crispr Cas9, sous le control du gène TCR α endogène. Cette stratégie, combinée à un plasmide viral AAV donne en préclinique, une expression du CAR homogène, une amélioration de l'efficacité et une inhibition de la différenciation mémoire et de l'exhaustion. (Shah, 2019) (Eyquem, 2017)

2. Adapter le domaine de Costimulation en fonction du stade de la pathologie

Par ailleurs, en utilisant des CAR anti-CS1 CD28 et anti-BCMA 4-1BB, j'ai pu remarquer qu'il semblerait que ce dernier permette aux CAR T RL et Dara de récupérer une capacité proliférative et lytique. Nous sommes en droit de nous demander s'il s'agit de l'antigène ou du signal de Co Stimulation. Nous pouvons tout de même émettre l'hypothèse qu'il pourrait être intéressant d'utiliser préférentiellement un domaine plutôt qu'un autre, en fonction du stade de la pathologie. Ainsi sur des lignes précoces, le CAR CD28 pourrait apporter un avantage en provoquant une réponse forte, et sur les lignes plus tardives le 4-1BB pourrait apporter une réponse plus lente ce qui permettrait aux Ly T épuisés de s'activer dans le temps et ainsi d'apporter une réponse plus tardive mais maintenue. Cependant, il faudrait vérifier cette hypothèse en testant en parallèle les réponses aux CAR T anti-CS1 CD28 et CS1 4-1BB sur l'ensemble de ces cohortes. Nous pourrions également adapter le design du CAR aux caractéristiques physiopathologiques du patient, mais cela générerait un coup non négligeable dans la stratégie thérapeutique.

3. Associer les stratégies

Comme discuté plus haut, la stratégie CAR T pourrait être soutenue par une Co administration de chimiothérapie ou d'immunothérapie passive.

3.1. CAR T anti-BCMA/Checkpoint inhibitors

Plusieurs anticorps anti-point de control sont actuellement autorisés sur le marché et testés dans les hémopathies malignes, ciblant CTLA-4, PD1 ou PD-L1. Le rationnel est basé sur leurs excellents résultats en monothérapie et leurs capacités à réactiver des lymphocytes T potentiellement épuisés. Cela a déjà été étudié chez des enfants traités par CAR T anti-CD19 pour une LAL-B, montrant une meilleure persistance des CAR T. (Wang, 2019)

3.2. CAR T anti-BCMA/Daratumumab

Appuyé par ce rationnel d'association et par les résultats que nous avons obtenu, il serait intéressant d'étudier en clinique l'administration de Daratumumab en parallèle de la CAR T thérapie. Effectivement, nous pourrions nous attendre à une rémission de la pathologie plus longue chez ces patients-là par rapport à ceux en rechute.

4. CAR anti-BCMA NK

D'autres optimisations sont en cours de développement en faisant varier par exemple l'origine des cellules transduites. Par exemple, la transduction de cellules Natural-Killer pourrait être une bonne piste. Effectivement, les NK possèdent naturellement une forte activité antitumorale indépendante de l'expression du CMH-I. Contrairement aux cellules T, elles ont un profil effecteur plus sûr puisqu'elles ne provoquent pas de syndrome de relargage cytokinique, de syndrome de lyse tumorale, ni d'effet « on-target/off-tumor ». Transduit par vecteur viral, les CAR NK ont montré *in vitro* et *in vivo* une bonne efficacité lytique contre les lignées tumorales de MM. Cependant les CAR NK peuvent avoir des limites dues à leur faible prolifération, nécessitant, lors de la production, l'utilisation de lignées NK GMP comme NK-92. (Chu, 2014) Par ailleurs, un premier essai clinique administrant des CAR NK-92 anti-CD33 à des patients est reporté par le groupe Tang et Al dans l'AML. Dans cet essai, le CAR CD28-4-1BB est transduit par lentivirus dans des NK92 préalablement irradiés. Effectivement, aux vues de l'origine tumorale de la lignée et afin d'éviter une prolifération incontrôlable chez le patient, les cellules doivent être irradiées. Afin d'optimiser cette technologie, il est envisagé d'associer un « gène suicide » afin de pouvoir contrôler ces CAR NK chez le patient. (Tang, 2018) Actuellement un CAR NK anti-BCMA est en essai clinique de Phase I/II (NCT03940833).

5. CAR de 4^{ème} génération dans le MM ?

D'autre part, les CAR T ont montré d'excellent résultats et une bonne persistance principalement dans les leucémies dont la principale caractéristique est de présenter des cellules tumorales dans le sang périphérique. Cette caractéristique permet une reconnaissance puis une élimination rapide et facilitée de l'ensemble des cellules tumorales. Or dans le MM, la localisation des cellules cancéreuses est principalement la moëlle osseuse. Ces niches tumorales deviennent ainsi opaques à la pénétration des CAR T. Ce milieu impénétrable n'est pas sans rappeler les caractéristiques des tumeurs solides pour lesquelles l'un des challenges principaux est de renforcer les propriétés lytiques des cellules effectrices, dans un modèle hypoxique. Ainsi, l'utilisation de CAR de 4^{ème} génération pourrait peut-être apporter de bons résultats dans ce contexte pathologique. (Roex, 2020)

Conclusion

Dans le MM, les CAR-T ciblant le BCMA induisent de bonnes réponses chez des patients ayant reçu plusieurs lignes de chimiothérapie. Mais la rémission reste limitée et les malades rechutent dans l'année. Au regard des résultats obtenus dans ce travail de thèse, nous pouvons donc affirmer que les lignes de traitement ont un impact sur l'efficacité antitumorale des CAR T. Notamment en affectant la différenciation mémoire des LyT utilisés lors de la transduction des CAR, mais aussi en augmentant l'épuisement de ces cellules. Cela se traduit par une diminution des capacités fonctionnelles, de prolifération et de lyse, principalement pour les CAR T générés à partir de cellules T de patients à la rechute. Cependant, le Daratumumab semble réactiver ces propriétés. Et cela est confirmé *in vivo*, puisque les résultats montrent une persistance et un control de la tumeur, semblables entre les CAR T Diag et CAR T Dara.

Par ailleurs, les patients traités par Daratumumab sont de plus en plus nombreux à rechuter et les essais cliniques CAR T élargissent leurs critères de sélection afin d'inclure ces patients. Au regard de ce que nous avons pu observer, il semblerait que ces patients RDara aient un phénotype proche de celui des patients en rechute de chimiothérapie, laissant penser qu'ils ne fournissent pas des LyT suffisamment robustes pour la thérapie CAR T. De plus, nos données montrent des dysfonctions plus importantes pour les CAR T des patients en Rechute de Dara que pour les Rechute.

L'identification des patients susceptibles de répondre d'une façon robuste et persistante aux CAR-T représente aujourd'hui un enjeu clinique majeur. Notre travail montre que les analyses phénotypiques et fonctionnelles que nous avons développées pourraient contribuer à mieux cibler les malades éligibles aux CAR-T thérapies.

Annexes



Bi 38-3 is a novel CD38/CD3 bispecific T-cell engager with low toxicities for the treatment of multiple myeloma

by Maxime Fayon, Carolina Martinez-Cingolani, Audrey Abecassis, Nathalie Roders, Elisabeth Nelson, Caroline Choisy, Alexis Talbot, Armand Bensussan, Jean-Paul Fermand, Bertrand Arnulf, and Jean-Christophe Bories
Haematologica 2020 [Epub ahead of print]

Citation: Maxime Fayon, Carolina Martinez-Cingolani, Audrey Abecassis, Nathalie Roders, Elisabeth Nelson, Caroline Choisy, Alexis Talbot, Armand Bensussan, Jean-Paul Fermand, Bertrand Arnulf, and Jean-Christophe Bories. Bi 38-3 is a novel CD38/CD3 bispecific T-cell engager with low toxicities for the treatment of multiple myeloma. Haematologica. 2020; 105:xxx doi:10.3324/haematol.2019.242453

Publisher's Disclaimer.

E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.

Bi 38-3 is a novel CD38/CD3 bispecific T-cell engager with low toxicities for the treatment of multiple myeloma.

Maxime Fayon¹, Carolina Martinez-Cingolani¹, Audrey Abecassis¹, Nathalie Roders¹, Elisabeth Nelson¹, Caroline Choisy¹, Alexis Talbot^{1,2}, Armand Bensussan¹, Jean-Paul Fermand^{1,2}, Bertrand Arnulf^{1,2} and Jean-Christophe Bories¹.

¹ INSERM, UMR 976, Institut de Recherche Saint-Louis, Université de Paris, Paris, France.

² Immuno-Hematology, Saint-Louis Hospital, Paris, France.

Running head: A novel CD38/CD3 BiTE for multiple myeloma.

Correspondance to : Jean-Christophe Bories, INSERM UMR 976, Institut de Recherche Saint-Louis, Hôpital St. Louis, 1 Avenue Claude Vellefaux, Paris cedex 10, France;

Telephone : 33 1 57 27 67 88. Email : jean-christophe.bories@inserm.fr

Word count: 1496; 3 figures; 1 supplemental file.

This work was supported by grants from the “Cancéropole Ile de France” and from the “Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies monoclonales”. M. Fayon and C. Martinez-Cingolani were supported by fellowships from the French “Agence National pour la Recherche”, programme d’Investissements d’avenir (ANR- 10-IDEX-03-02). M. Fayon was also supported by a fellowship from the “Société Française d’Hématologie”. A. Abecassis was supported by a fellowship from the “Agence Nationale pour la Recherche Scientifique, CIFRE” in partnership with Servier.

Monoclonal antibodies (mAb) targeting CD38, such as daratumumab, have shown good therapeutic efficacy in Multiple Myeloma (MM), both alone (1) and in combination with normal standard of care regimens (2, 3). However, many patients eventually relapse because of resistance mechanisms, including Fc γ R dependent down regulation of CD38 on tumor cells as well as inhibition of complement dependent cytotoxicity, antibody-dependent cellmediated cytotoxicity and antibody dependent cellular phagocytosis (4). Bi-specific T-cell engaging (BiTE) antibodies belong to a new class of immunotherapeutic agents that can recognize, on the one hand, a specific antigen on the surface of the target cells (i.e. tumor antigen) and, on the other hand, the CD3 ζ chain on T lymphocytes (5). By activating T cells via the CD3 complex and recruiting them in proximity of target cells, BiTEs efficiently induce T-cell mediated cytotoxicity (6). In MM, bi-specific antibodies recognizing B-cell maturation antigen (BCMA) or FcRH5 (CD307) have been shown to eliminate tumor plasma cells in preclinical models (7-9). However, FcRH5 expression is not limited to tumor plasma cells and BCMA is abundantly secreted in MM patients (10, 11). These two features may

therefore limit the specificity or efficiency of these cognate bi-specific antibodies *in vivo*. Recently, an anti-CD38 bispecific antibody, AMG424, has been shown to eliminate MM cells in preclinical models, but also to trigger “off tumor” T cell cytotoxicity on B, T and NK cells *in vitro* (12). Thus, development of efficient and safer bi-specific antibody could contribute to improve the treatment of MM.

We have developed a new BiTE (Bi38-3) that consists of two single-chain variable fragments derived from mouse hybridomas, producing anti-human CD38 and CD3 Σ (Online Supplementary Figure S1A and B). Purified Bi38-3 efficiently and specifically recognizes CD38 on MM cells and binds CD3 Σ expressing Jurkat T cells (Online Supplementary Figure S1C and D). To assess the function of Bi38-3 on the cytotoxic activity of T cells, we performed co-culture assays with effector T cells, isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy donors, on firefly luciferase expressing target KMS11 and MM1.S MM cell lines. We observed that T cells readily killed KMS11 cells (as measured by luciferase activity) in a Bi38-3 dose dependent manner, with a half maximal effective concentration (EC_{50}) around 5 ng/mL, the equivalent of 0.09 nM for this 55.6 Kd protein (Figure 1A). Bi38-3 mediated T cell cytotoxic activity was also observed in co-culture with MM1.S cells (Figure 1B). However, in this cell line, which expresses heterogeneous levels of CD38, the EC_{50} was tenfold lower (0.5 ng/mL), indicating that Bi38-3 also triggered a strong T cell cytotoxicity in MM cells with weaker CD38 expression. In line with this, stimulation of donor T cells with Bi38-3 in the presence MM1.S cells led to robust proliferation, expression of activation markers CD25 and CD69, as well as production of Interferon-gamma (IFN γ), Tumor necrosis factor-alpha (TNF α) and Interleukin-2 (IL-2) in a Bi38-3 dose dependent manner (Online Supplementary Figure S1E-H). The viability of MM1.S or KMS11 MM cells was not affected by co-culture with T cells or Bi38-3 alone (Figure 1A and B, right). In addition, Bi38-3 induced poor T cell-mediated killing of CD38 deficient MM1.S cells (MM1.SKO), with around half of CD38-deficient MM1.S cells surviving the co-culture even at the highest dose of Bi38-3 (1 μ g/mL) (Figure 1C). These results indicate that, at lower doses, similar to those that are expected in patients, Bi38-3 directs efficient T-cell-cytotoxic activity specifically towards CD38 expressing MM cells. We next analyzed the potential of Bi38-3 to induce lysis of target (T) tumor plasma cells, isolated from 4 patients at diagnosis, by autologous effector (E) T cells. FACS analysis of overnight E:T co-cultures revealed that the numbers of viable CD138 positive MM cells were reduced in a Bi38-3 dose dependent manner, with the EC_{50} ranging from 0.028 to 1.29 ng/mL, depending on the patient (Figure 1D and Online Supplementary Figure S2). Importantly, in the absence of T cells, Bi38-3 exhibited no toxicity against fresh tumor cells. Bi38-3-induced cytotoxicity of autologous T cells was further investigated on tumor plasma cells from 3 MM patients at relapse and demonstrated similar efficacy, with EC_{50} ranging from 0.2 to 0.86 ng/mL (Figure 1E). These results indicate that, Bi38-3 triggered autologous T cell-mediated killing of tumor plasma cells from patients both at diagnosis and at relapse.

To investigate potential toxic effects of Bi38-3 on blood cells, PBMC from donors were treated with various concentrations of Bi38-3 for 24 hours and the mononuclear cell populations were

individually analyzed by FACS (Online Supplementary Figure S3). We observed that the percentages of CD14 expressing monocytes included in the live gate were markedly reduced in a Bi38-3 dose dependent manner (Figure 2A). In contrast, the percentage of CD4 and CD8 T lymphocytes, that together represented around 60% of total PBMC cells, slightly increased in response to Bi38-3 probably due to the decrease in live CD14 positive cells. Similarly, the B (CD19⁺) and NK (CD56⁺) cell populations remained at similar levels (around 10% and 5% respectively), even at high concentrations of Bi38-3 (100ng/mL) (Figure 2A). Next, we investigated whether expression of CD38 at the surface of blood cells was downregulated by Bi38-3. FACS analysis indicated that CD38 Mean Fluorescence Intensity (MFI) on T, B and NK cells remained similar in cultures containing increasing doses of Bi38-3 (Figure 2B). In line with this, CD38 expression was not dramatically reduced on CD14⁺ monocytes. Of note, this analysis could not be performed at high doses because these cells, which express higher levels of CD38, were sensitive to elevated concentrations of Bi38-3 (above 1ng/mL). To compare the activity of Bi38-3 on CD38 high MM versus CD38 intermediate cells, we performed co-culture assays with MM1.S, expressing high levels of CD38, freshly isolated B cells, expressing intermediate levels of CD38 (Figure 2C) and autologous T cells. Following an overnight culture, the percentages of viable CD20⁺ B cells and CD138⁺ MM1.S cells were analyzed by flow cytometry (Online Supplementary Figure S4A). We observed that the percentages of MM1.S cells dropped at Bi38-3 concentrations of 0.1ng/mL and this reduction was more dramatic at higher doses (Figure 2C). In contrast, compared to untreated conditions, the percentages of viable CD20⁺ B cells remained unchanged even at high concentrations of Bi38-3 (Figure 2C). We developed a similar autologous tri-culture assay to investigate potential toxic effects of Bi38-3 on CD34⁺ bone marrow hematopoietic progenitors and on regulatory T cells (Treg), which both express low levels of CD38. While Bi38-3 readily induced MM cell killing at low concentrations (10⁻² ng/mL and above), we found that it triggered no significant T cell mediated cytotoxicity on Foxp3⁺ Treg (Figure 2D). Similarly, there was no significant toxicity on CD34⁺ hematopoietic progenitors at concentrations below 10ng/mL and moderate toxicity (> 40% survival) at the highest concentrations (Figure 2E). Altogether, our results indicate that Bi38-3 does not impair the surface expression of CD38 and only triggers T cell mediated killing of cells expressing high levels of CD38 with no or limited toxicity against cells expressing intermediate levels of CD38, such as hematopoietic progenitors, B, T or NK cells.

The antitumor activity of Bi38-3 was further assessed *in vivo* using a human MM xenograft, mouse model. MM1.S cells expressing luciferase (MM1.Sluc) were injected in the tail vein of immunodeficient (NSG) mice and luciferase levels measured by IVIS Imaging System every 3 or 4 days. Thirteen days after MM1.S injection, purified human T cells were transplanted I.V. with or without Bi38-3 (0.1 mg/kg). Treatments with Bi38-3 or vehicle were repeated daily for 9 days (Figure 3A). Seven days following tumor cell injection, all mice showed similar levels of Radiance (luciferase), indicating that MM cells had effectively engrafted in host animals prior to Bi38-3 treatment (Figure 3B). While control mice showed rapid tumor progression, all Bi38-3 treated

animals displayed a marked reduction in tumor growth within the first 5 days of Bi38-3 treatment (Figure 3C). At the end of treatments, the level of luciferase expressing MM cells in Bi38-3 treated mice was only one tenth of the initial level and was on average thirty-fold lower than untreated controls (Figure 3C). These results show that Bi38-3 is able to efficiently control MM tumor progression *in vivo*.

We report here the development of Bi38-3, a new anti-CD38/CD3 BiTE, which triggers T cell mediated lysis of CD38-positive MM cells *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. Interestingly, Bi38-3 provokes no toxicity on B, T and NK cells *in vitro* and, therefore, is likely to have less "off tumor" effects than AMG424, a recently developed anti-CD38 bispecific antibody (12). Importantly, Bi38-3 efficiently triggers killing of MM cells from patients that are resistant to standard treatments. Furthermore, because it recognizes a specific epitope on CD38 and is devoid of the Fc region, Bi38-3 is expected to also be efficient in relapse patients following daratumumab therapy. Altogether, the data presented in this study identifies Bi38-3 as a selective and efficient compound for the treatment of MM, that could be used both as a frontline agent or at relapse (alone or in combination with additional drugs), and which should be evaluated further in MM patients.

Acknowledgments

This work was supported by grant from the "Cancéropole Ile de France" and from the "Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies monoclonales". M. Fayon and C. Martinez-Cingolani were supported by fellowships from the French "Agence Nationale pour la Recherche", programme d'Investissements d'avenir (ANR-10-IDEX-03-02). M. Fayon was also supported by a fellowship from the "Société Française d'Hématologie". A. Abecassis was supported by a fellowship from the "Agence Nationale pour la Recherche Scientifique, CIFRE" in partnership with Servier. We thank M. Goodhardt, and D. Garrick for criticism of the manuscript. We are also grateful to the animal facility and to the pole of cytometry of the "Institut de recherche Saint-Louis" for technical help.

References

1. Usmani SZ, Weiss BM, Plesner T, et al. Clinical efficacy of daratumumab monotherapy in patients with heavily pretreated relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(1):37-44.
2. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(14):1319-1331.
3. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(8):754-766.
4. van de Donk N, Usmani SZ. CD38 Antibodies in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Modes of Resistance. *Front Immunol*. 2018;9:2134.
5. Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front Immunol*. 2017;8:1603.
6. Brischwein K, Schlereth B, Guller B, et al. MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors. *Mol Immunol*. 2006;43(8):1129-1143.
7. Hipp S, Tai YT, Blanset D, et al. A novel BCMA/CD3 bispecific T-cell engager for the treatment of multiple myeloma induces selective lysis *in vitro* and *in vivo*. *Leukemia*. 2017;31(10):2278.

8. Li J, Stagg NJ, Johnston J, et al. Membrane-Proximal Epitope Facilitates Efficient T Cell Synapse Formation by Anti-FcRH5/CD3 and Is a Requirement for Myeloma Cell Killing. *Cancer Cell*. 2017;31(3):383-395.
9. Seckinger A, Delgado JA, Moser S, et al. Target Expression, Generation, Preclinical Activity, and Pharmacokinetics of the BCMA-T Cell Bispecific Antibody EM801 for Multiple Myeloma Treatment. *Cancer Cell*. 2017;31(3):396-410.
10. Ise T, Nagata S, Kreitman RJ, et al. Elevation of soluble CD307 (IRTA2/FcRH5) protein in the blood and expression on malignant cells of patients with multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia, and mantle cell lymphoma. *Leukemia*. 2007;21(1):169-174.
11. Sanchez E, Li M, Kitto A, et al. Serum B-cell maturation antigen is elevated in multiple myeloma and correlates with disease status and survival. *Br J Haematol*. 2012;158(6):727-738.
12. Zuch de Zafra CL, Fajardo F, Zhong W, et al. Targeting Multiple Myeloma with AMG 424, a Novel Anti-CD38/CD3 Bispecific T-cell-recruiting Antibody Optimized for Cytotoxicity and Cytokine Release. *Clin Cancer Res*. 2019;25(13):3921-3933.

FIGURE LEGENDS

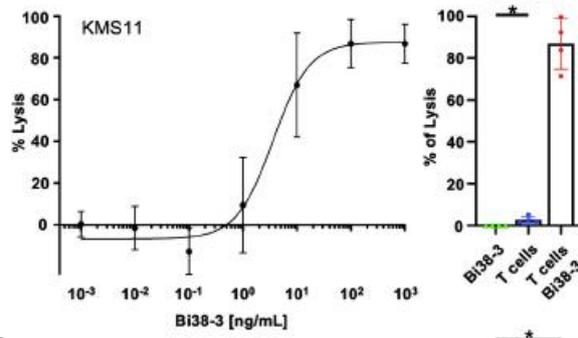
Figure 1: Bi38-3 induces CD38-dependent T cell mediated MM cell lysis *in vitro*. KMS11-luc (A), MM1.S-luc (B) and CD38 deficient MM1.S-luc (MM1.S-KO-luc) (C) MM cell lines were co-cultured with T cells, isolated from peripheral blood samples from healthy donors, at an E:T cell ratio of 5:1 with increasing concentrations of Bi38-3 for 24 hours. Curves represent target cell lysis, monitored by luciferase activity and expressed as the percentage of the untreated condition (0% lysis). Data are the means of independent experiments with 4 (A), 9 (B) and 4 (C) different donors. Standard deviations (SD) are shown for each concentration. Histograms on the left show target cell lysis induced by Bi38-3 alone, donor T cells alone and T cells with Bi38-3 (10¹ ng/mL) on KMS11-luc (A), MM1.S-luc (B) and MM1.S-KO-luc (C). (D and E) Fresh tumor plasma cells were collected from buffy coat of bone marrow aspirates from myeloma patients, then CD138⁺ cells were purified and co-cultured with autologous CD3⁺ T cells isolated from PBMC at an E:T cell ratio of 5:1 for 24 hours. Cultures were analyzed by FACS to monitor the number of CD138⁺ cells falling into the live gate. The average percentages of lysis of CD138⁺ cells (relative to the untreated condition) in 4 different patients at diagnosis (D) and 3 different patients at relapse (E) are shown and the error bars indicate the SD. Histograms show the average effects of Bi38-3 alone, T cells alone and T cells with Bi38-3 (10² ng/mL) on tumor plasma cells from the same 4 patients at diagnosis (D) and 3 patients at relapse (E). Standard deviations are shown and P values were determined by two-sided Mann–Whitney *U*-test (* *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001).

Figure 2: Sensitivity of blood cells and bone marrow hematopoietic progenitors to Bi38-3. (A) PBMC from healthy donors (*n*=3) were cultured with medium (M) or various concentrations of Bi38-3 for 24 hours and the percentages of live T, myeloid, B and NK cells were determined by FACS analysis. Histograms show the average percentages of live CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD14⁺ monocytes, CD19⁺ B cells and CD56⁺ NK cells in Bi38-3 cultures compared to untreated controls in 3 independent donors and the error bars indicate the SD. (B) Mean Fluorescence Intensity (MFI) were measured in MM.1S WT cells and in CD4, CD8, CD14, CD19 and CD56 expressing cell subsets based on FACS analysis of CD38 expression levels in PBMC cell populations cultured with various concentrations of Bi38-3 as in A. Histograms show average CD38 MFI of MM.1S cells and PBMC cells populations and error bars indicate the SD. ND: Not Determined due to lack of sufficient numbers of events. (C) Relative Bi38-3 mediated T cell lysis of B versus MM1.S cells. Purified paired B and T cells from healthy donors (*n*=5) were co-cultured with increasing concentrations of Bi38-3 for 24 hours in the presence of MM1.S cells. (D) Relative Bi38-3 mediated T cell lysis of Treg versus MM1.S cells. Purified T cells from healthy donors (*n*=3) were co-cultured with increasing concentrations of Bi38-3 for 24 hours in the presence of MM1.S cells. (E) Relative Bi38-3 mediated T cell lysis of CD34⁺ bone marrow hematopoietic progenitors versus MM1.S cells. Paired CD34⁺ hematopoietic progenitors and T cells purified from the bone marrow of healthy donors (hip surgery) (*n*=4) were co-cultured with increasing concentrations of Bi38-3 for 24 hours

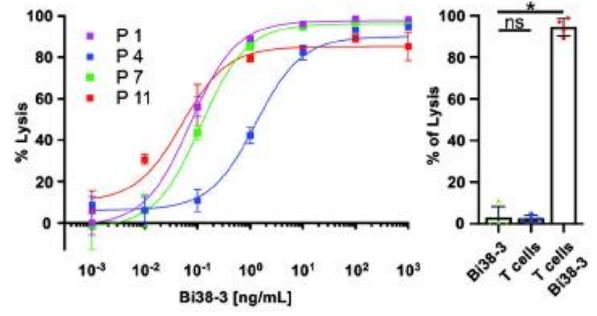
in the presence of MM1.S cells. In C, D and E, the numbers of live CD20+ (B cells), FoxP3+ (Treg cells), CD34+ (Hematopoietic progenitors) and CD138+ (MM1.S cells) were calculated by FACS using counting beads and expressed as a ratio to untreated controls, respectively. Histograms show the ratios of B, Treg, CD34+ hematopoietic progenitor and MM.1S cells for each Bi38-3 concentrations and error bars indicate the SD. The normality of the CD34+ populations was established with a Shapiro-Wilk normality test and P-values were determined by an unpaired Student's t test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure 3: In Vivo Activity of Bi38-3 in the MM1.SLuc Xenograft mouse model. (A) Treatment schedule. Six to 12-week-old NOD/SCID/IL-2R γ null mice were inoculated with 5.106 MM1.SLuc cells by tail vein injection (i.v) at day 0, followed, 13 days later, by infusion of 5.106 purified human T cells, isolated from healthy donors, with (or without) Bi38-3 at 0.1mg/kg (blue arrow). Treatment was initiated at day 13 when similar levels of luciferase expressing MM cells were detected in all mice. Tail veins injections of Bi38-3 (0.1 mg/Kg) or PBS (for controls) were repeated daily for 9 days (black arrows). Bioluminescence was measured with the IVIS Imaging System at day 7, 11, 13, 15, 18 and 21 (or 22) after tumor injection (red arrows). (B) Serial bioluminescence imaging to assess myeloma progression/regression. Radiance was measured on the entire body of mice. Images on the left indicate bioluminescence at 7 days after inoculation with MM.1S myeloma cells and before the beginning of the treatment. Images on the right indicate 18 days after inoculation with MM.1S cells and 4 days after treatment with Bi38-3 (lower panel) or with vehicle (upper panel). The radiance color scale is represented on the right. (C) Longitudinal radiance levels of vehicle (blue lines) and Bi38-3 (red lines) treated mice. Red and blue curves represent, a group of 9 and 11 mice inoculated with MM.1SLuc and T cells and then treated with Bi38-3 (0.1 mg/Kg) and PBS, respectively. Black filled triangles indicate the first injection of Bi38-3 or PBS with T cells and white filled triangles indicate Bi-38 or PBS injections every day for 9 days. These experiments were performed from 2 independent donors. The normality of populations was established with the Shapiro-Wilk normality test, and P-values were calculated based on unpaired Student's t test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

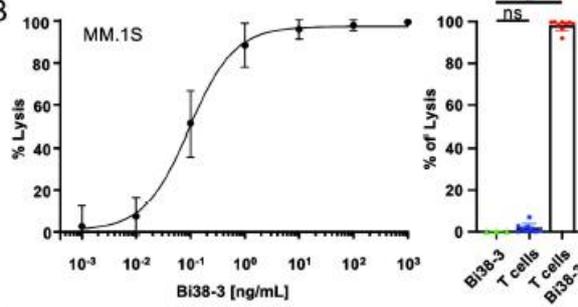
A



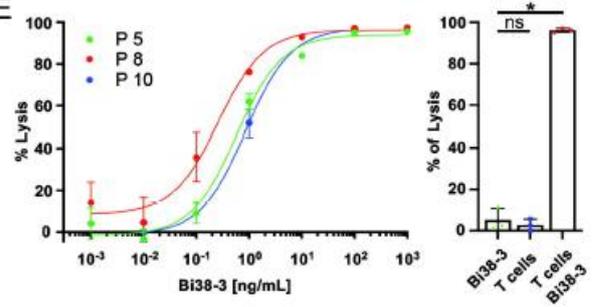
D



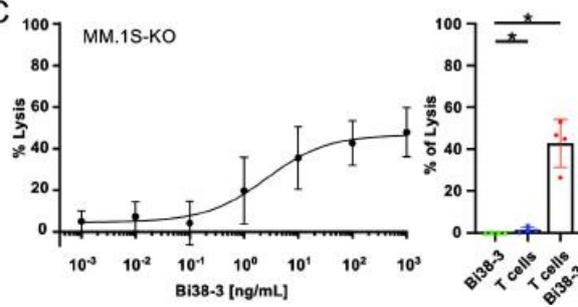
B

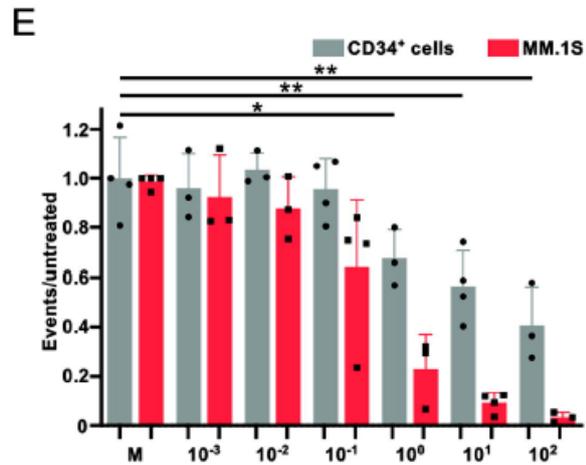
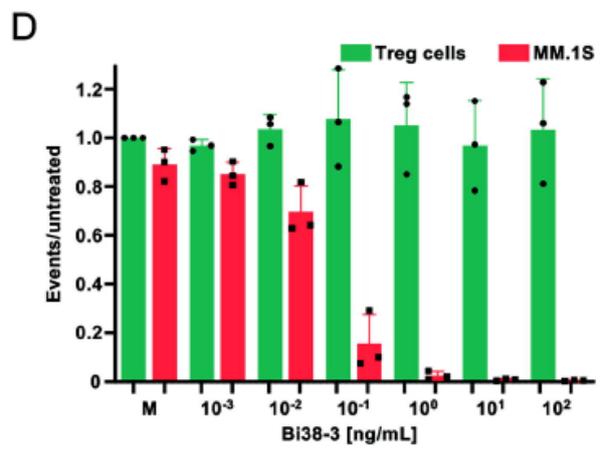
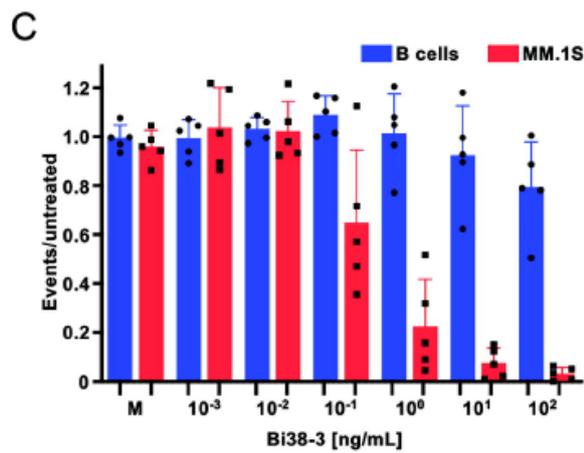
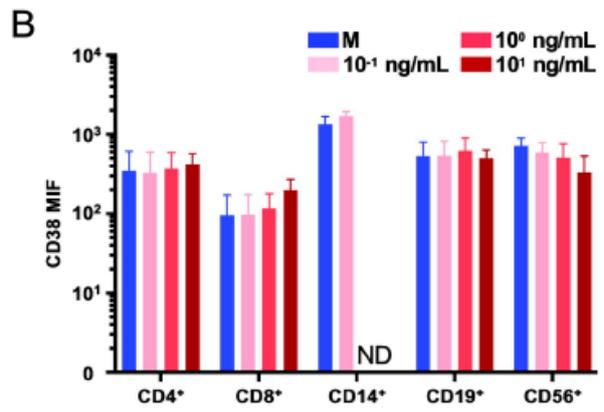
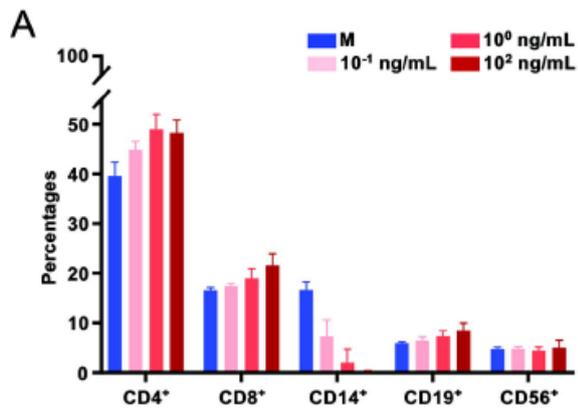


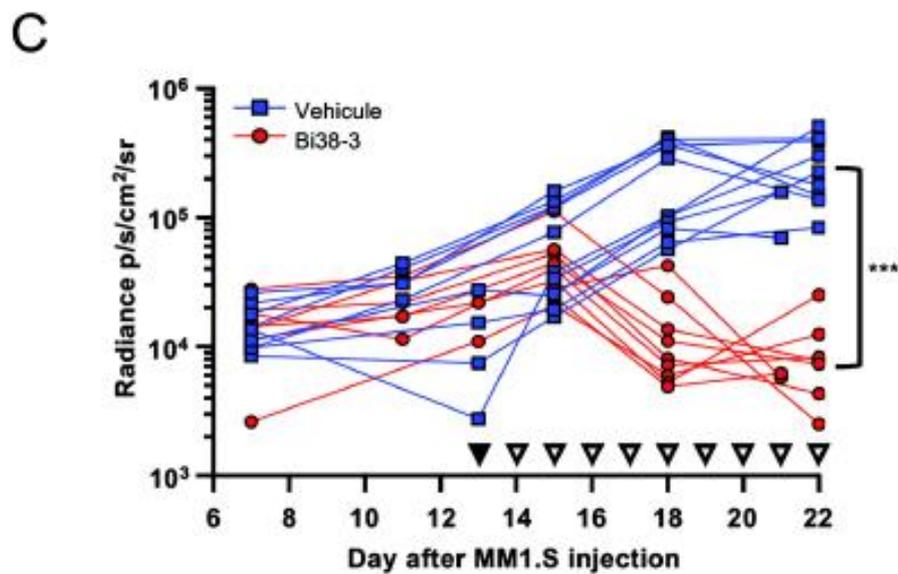
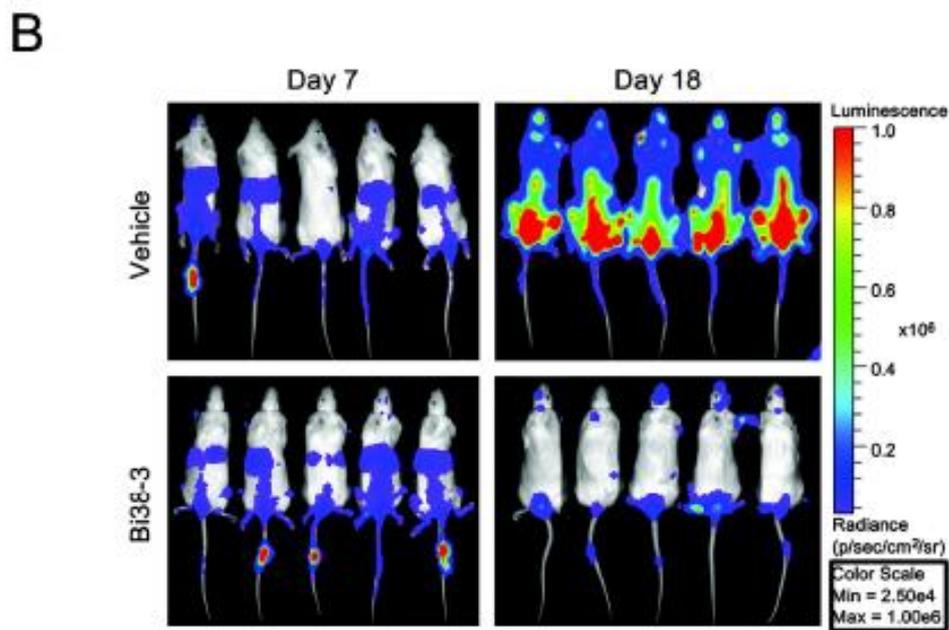
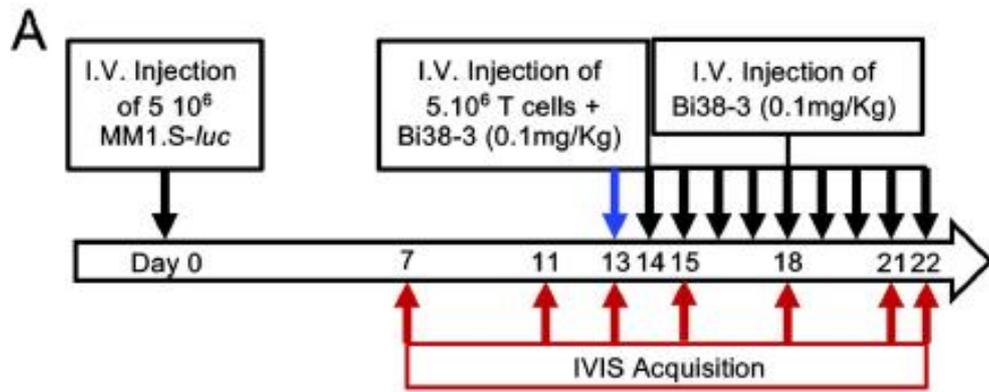
E



C







Legends for Supplementary figures

Supplementary figure S1: Structural and functional characterizations of Bi38-3. (A) Schematic of Bi38-3. The anti-human CD38 scFv and the anti-human CD3 ϵ scFv domains are represented in red and blue respectively. Plain lines represent 15-amino-acid glycine–serine spacers. Myc-tag and His-tag are indicated by green and brown boxes respectively. (B) (Left) Western blot analysis of HEK293 cells transfected with Bi38-3 expression vector or an empty vector. Bi38-3 was detected with an anti-Myc antibody. β -actin was used as a loading control. (Right) Analysis of purified Bi38-3 by gel electrophoresis and Coomassie blue staining. (C) Binding of Bi38-3 to MM cell lines. (Left panel) FACS analysis of NCI-H929, KMS11, MM1.S and CD38-deficient MM1.S (MM1.S-KO) cells stained with PE-anti-CD38 (red) or isotype control (blue). (Right panel) Cells were stained with Bi38-3 (red) or left untreated (blue) and revealed with APC-anti-Fab' antibody. The percentage of cells falling in the gate are indicated in the histogram. Representative of 3 independent experiments. (D) Binding of Bi38-3 to CD3 $^+$ Jurkat cells deficient or not for CD38 (KO). (First and second panels) FACS analysis of Jurkat and Jurkat-KO cells stained with, respectively, APC-anti-CD3/PE-anti-CD38 (red) or isotype control (blue). (Third panel) Cells were stained with Bi38-3 (red) or left untreated (blue) and revealed with APC-anti-Fab' antibody. (E and F) Proliferation assessed by violet CellTrace dye dilution. Purified T cells, isolated from healthy donors (n=4), were stained with CellTrace violet dye and co-cultured with (or without) MM1.S target cells or CD38 deficient MM1.S (MM1.SKO) at an E:T ratio of 1:1 with fixed concentration of Bi38-3 (101 ng/mL) for 96 hours. T cell expansion index was calculated after a 96-hours culture in medium alone (M), CD3/CD28 beads (3/28) or Bi38-3 (101 ng/mL). Histograms show the average expansion indexes of T cells in 4 independent experiments with 4 different donors. Standard deviations are shown and P values were determined by two-sided Mann–Whitney U-test (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001). (G) Activation markers CD25 and CD69 on CD4-positive and CD8-positive T cells was determined by FACS analysis. T cells were grown in medium (M) or stimulated with Bi38-3 at 100 or 102 ng/mL, with (or without) MM1.S or CD38 deficient MM1.S (MM1.S-KO) at an E:T ratio of 5:1. Histograms show average percentages of CD25 $^+$ and CD69 $^+$ on CD4-positive and CD8 positive T cells and error bars indicate the SD. (H) Production of Interferon gamma (IFN γ), Interleukin 2 (IL-2) and Tumor necrosis factor (TNF α) in MM1.S/T cell co-cultures at an E:T ratio of 5:1. Data represent the average of 4 independent experiments with 4 different donors. The normality of populations was established with the Shapiro-Wilk normality test and P-values were determined by the unpaired Student's t test (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

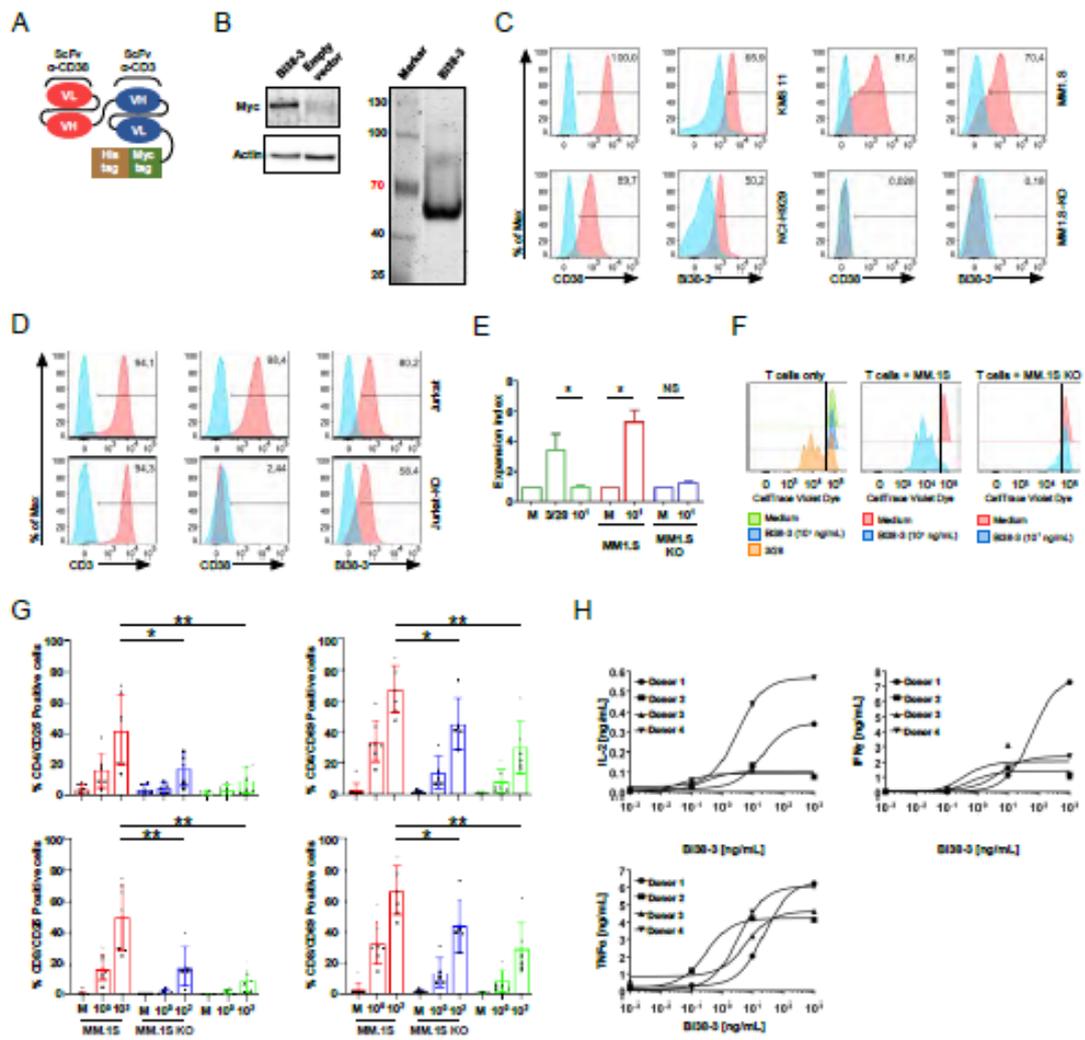
Supplementary Figure S2: Shown are the gating strategies to determine Bi38-3 mediated autologous T cell cytotoxicity on fresh tumor plasma cells used in Figure 1B. Purified bone marrow CD138 $^+$ plasma cells from patients were co-cultured with autologous PBMC CD3 $^+$ T cells at an E:T cell ratio of 5:1 for 24 hours. Cultures were analyzed by FACS to monitor the number of CD138 $^+$

cells falling into the live gate as measured with counting beads. Culture conditions are indicated above each dot plot pair: FSC/SSC (top) and SSC/CD138 (bottom). Representative of 4 different patients at diagnosis and 3 at relapse.

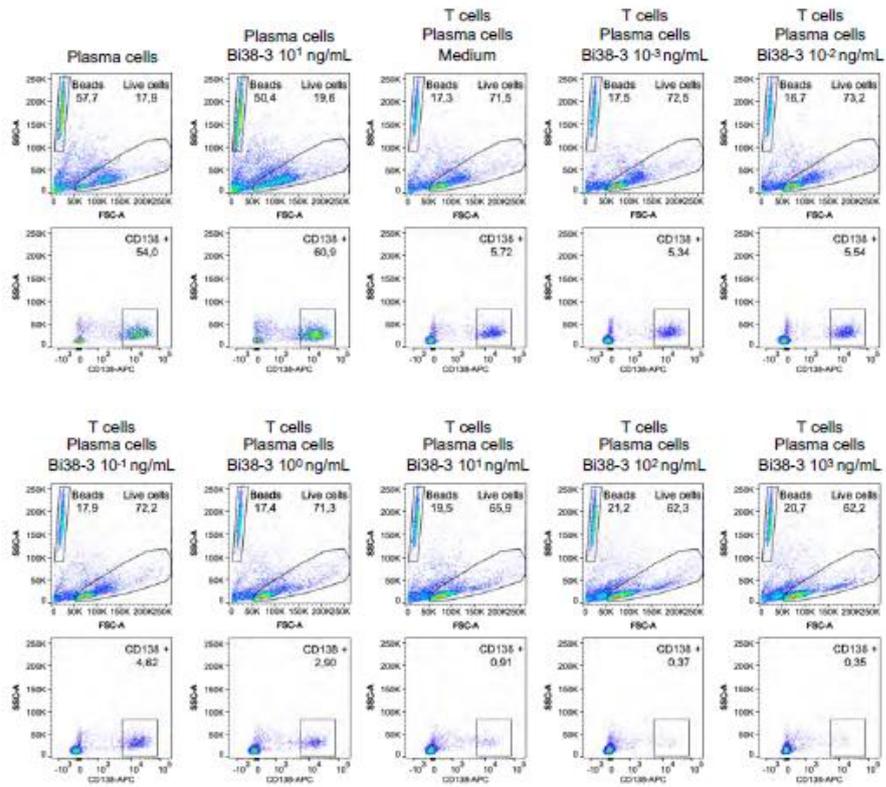
Supplementary Figure S3: Shown are the gating strategies to determine Bi38-3 mediated autologous T cell cytotoxicity on PBMC cell subsets cells used in Figure 2A. PBMC from healthy donors (n=3) were cultured with various concentrations of Bi38-3 for 24 hours and the percentages of T, myeloid, B, NK cells were determined by FACS. Dot plots depict the percentages of live CD4+ T cells, CD8+ T cells, CD14+ monocytes, CD19+ B cells, and CD56+ NK cells in the culture. Culture conditions are indicated on the left. The percentages of cells falling into the gates are shown in each dot plot. Representative of 3 independent experiments.

Supplementary Figure S4: (A) Shown are the gating strategies to determine Bi38-3 mediated T cell cytotoxicity on MM1.S and autologous B cells co-culture used in Figure 2C. Purified paired T and B cells from healthy donors (n=5) were co-cultured with MM1.S cells at an E:T cell ratio of 5:1 for 24 hours. (B) Shown are the gating strategies to determine Bi38-3 mediated T cell cytotoxicity on MM1.S and FoxP3+ Treg cells co-culture used in Figure 2D. Purified T cells from donors were co-cultured with MM1.S cells at an E:T cell ratio of 5:1 for 24 hours. (C) Shown are the gating strategies to determine Bi38-3 mediated T cell cytotoxicity on MM1.S and CD34+ bone marrow hematopoietic progenitors cells co-culture used in Figure 2E. Purified paired CD34+ hematopoietic progenitors and T cells from bone marrow samples from healthy donors (from hip surgery) (n=4) were co-cultured with MM1.S cells at an E:T cell ratio of 5:1 for 24 hours. Cultures were analyzed by FACS to monitor, respectively, the number of CD138+ cells (MM1.S), B cells (CD20+), Treg cells (FoxP3+) and hematopoietic progenitors (CD34+) falling into the live gate as measured with counting beads. Culture conditions are indicated above each dot plot pair: FSC/SSC (top) and CD20/CD138 (bottom A), FoxP3/CD138 (bottom B) or CD34/CD138 (bottom C). Data are representative of 5 (A), 3 (B) and 4 (C) independent donors.

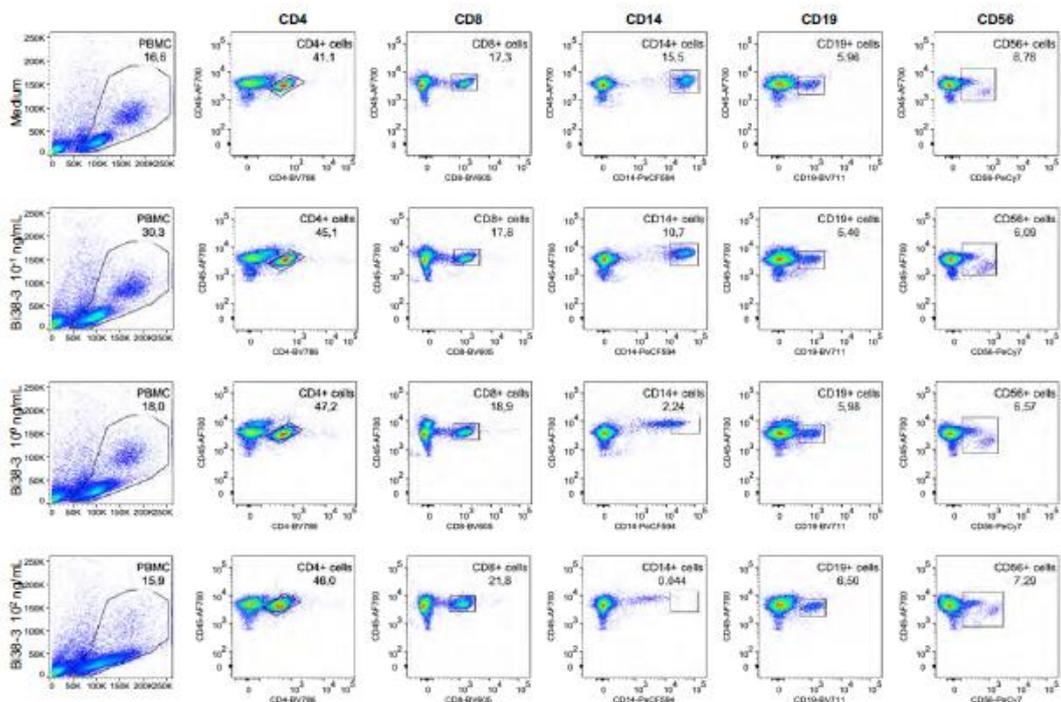
SUPPLEMENTARY FIGURE 1



SUPPLEMENTARY FIGURE 2

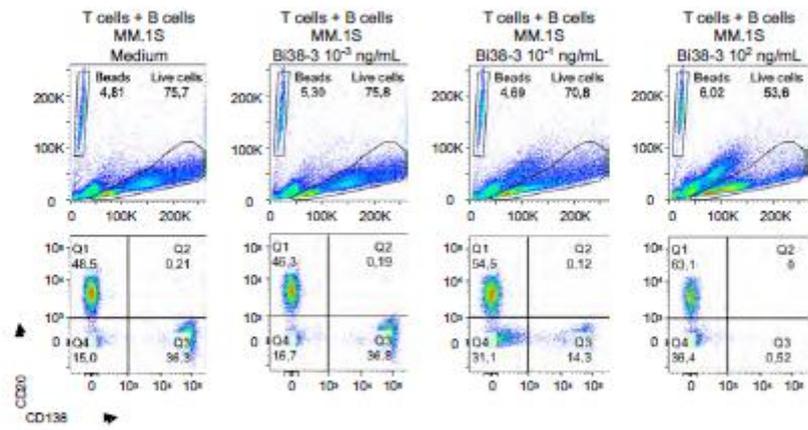


SUPPLEMENTARY FIGURE 3

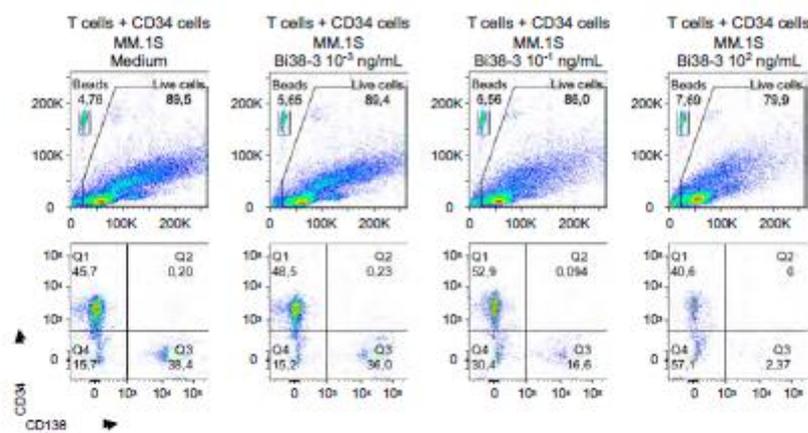


SUPPLEMENTARY FIGURE 4

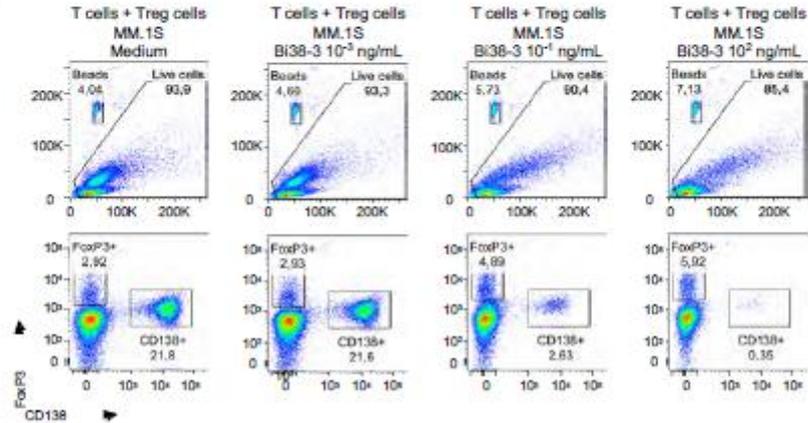
A



B



C



Bibliographie

- Agence Européenne du Médicament** Darzalex, INN-daratumumab [En ligne] // ema.europea.eu. - Mai 2016.
- Ailawadhi Sikander** A Phase I Study to Assess the Safety and [Revue] // Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia. - 2019.
- Ali Syed Abbas** T cells expressing an anti B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2016.
- Allogene Therapeutics** Allogene Therapeutics and SpringWorks Therapeutics Announce Clinical Collaboration to Evaluate ALLO-715 in Combination with Nirrogacestat in Multiple Myeloma [Conférence]. - 2020.
- Alsina Melissa** Updated Results from the Phase I CRB-402 Study of Anti-Bcma CAR-T Cell Therapy bb21217 in Patients with Relapsed and Refractory Multiple Myeloma: Correlation of Expansion and Duration of Response with T Cell Phenotypes [Revue] // Blood. - 2020.
- An Gang** An Anti-Bcma CAR T-Cell Therapy (C-CAR088) Shows Promising Safety and Efficacy Profile in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma [Revue] // Blood. - 2020.
- Anderson Kenneth C.** Pathogenesis of Myeloma [Revue] // Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.. - 2011.
- Arcellx** Arcellx Platform A new paradigm to revolutionize cell therapy [En ligne] // Arcellx. - 2020.
- Atamaniuk Johanna** Overexpression of G protein-coupled receptor 5D in the bone marrow is associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : European Journal of Clinical Investigation , 2012.
- Atanackovic Djordje** Surface molecule CD229 as a novel target for the diagnosis and treatment of multiple myeloma [Revue] // Haematologica. - 2011.
- Attal Michel** Isatuximab plus pomalidomide and low-dose dexamethasone versus pomalidomide and low-dose dexamethasone in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (ICARIA-MM): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study [Revue] // The Lancet. - 2019.
- Bae Joeeun** Selective targeting of multiple myeloma by B cell maturation antigen (BCMA)-specific central memory CD8+ cytotoxic T lymphocytes: immunotherapeutic Application in vaccination and adoptive Immunotherapy [Revue]. - [s.l.] : Leukemia, 2019.
- Bandyopadhyay Sanmay** Transcriptional regulation of T cell tolerance [Revue]. - [s.l.] : Seminars in Immunology, 2007.
- Barber Amorette** Chimeric NKG2D receptor-expressing T cells as an immunotherapy for multiple myeloma [Revue] // Experimental Hematology. - 2008.
- Barnett Burton Earle** Development of Novel Non-Immunoglobulin Centyrin-Based Cars (CARTyrins) Targeting Human Bcma [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2016.
- Baumeister Susanne H.** Phase I Trial of Autologous CAR T Cells Targeting NKG2D Ligands in Patients with AML/MDS and Multiple Myeloma [Revue] // Cancer immunology research. - 2019.
- Benjamin Reuben** CD56 targeted chimeric antigen receptors for immunotherapy of multiple myeloma [Revue] // Cancer research. - 2012. - pp. Abstract nr 3499. doi:1538-7445.AM2012-3499.
- Berdeja Jesus G.** Efficacy and Safety of Idecabtagene Vicleucel (ide-cel, bb2121) in Elderly Patients with Relapsed and Refractory Multiple Myeloma: KarMMa Subgroup Analysis [Revue] // Blood. - 2020.
- Berdeja Jesus G.** Updated Results from an ongoing phase 1 clinical study of bb21217 anti BCMA CAR T cell therapy [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2019.

Berdeja Jesus Lorvotuzumab mertansine: antibody-drug-conjugate for CD56+ multiple myeloma [Revue] // *Frontiers in Bioscience*. - 2014.

Boudreault Jean-Samuel The role of SLAMF7 in multiple myeloma: impact [Revue] // *Expert Review of clinical Immunology*. - 2016.

Bräuner-Osborne Hans Cloning and characterization of a human orphan family C G-protein coupled receptor GPRC5D [Revue]. - [s.l.] : *Biochimica et biophysica acta*, 2001.

Bräuninger Andreas Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human [Revue]. - [s.l.] : *European Journal of Haematology*, 2001.

Brigle Kevin Pathobiology and diagnosis of multiple myeloma [Revue] // *Seminars in Oncology Nursing*. - 2017.

Bristol-Myers Squibb Bluerbird and BMS present updated data from ongoing phase 1 study of BCMA targeted CAR T cell therapy bb21217 in RRMM at 61st ASH Annual meeting and exposition [Conférence]. - 2019.

Brownlie Rebecca J. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded [Revue]. - [s.l.] : *Nature Reviews Immunology*, 2013.

Brudno Jennifer N. T Cells Genetically Modified to Express an Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor Cause Remissions of Poor-Prognosis Relapsed Multiple Myeloma [Revue]. - [s.l.] : *Journal of clinical oncology*, 2018.

Buelow Ben TNB383B 0001: A multicenter Phase 1 open label, dose escalation and expansion study of TNB-383B [En ligne] // Abstract 1874 *Tenebio*. - 2019.

Busch Dirk H. Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy [Revue]. - [s.l.] : *Seminars in immunology*, 2016.

CARAMBA The CARAMBA project [En ligne] // CARAMBA. - 2020.

Carrabba Matteo Giovanni Phase I-IIa Clinical Trial to Assess Safety and Efficacy of MLM-CAR44.1, a CD44v6 Directed CAR-T in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML) and Multiple Myeloma (MM) [Revue] // *Blood*. - 2018.

Cartesian Therapeutics Descartes-08 clinical trials [En ligne] // Cartesian therapeutics. - 2020. - <https://www.cartesiantherapeutics.com/descartes-08-clinical-trial/>.

Casucci Monica Co-Expression of a Suicide Gene in CAR-Redirected T Cells Enables the Safe Targeting of CD44v6 for Leukemia and Myeloma Eradication [Revue] // *Blood*. - 2012.

Chan Wing Keung A CS1-NKG2D Bispecific Antibody Collectively Activates Cytolytic Immune Cells against Multiple Myeloma [Revue] // *Cancer immunology Research*. - 2018.

Cheng Jiali Understanding the mechanisms of resistance to CAR T-cell therapy in malignancies [Revue] // *Frontiers in oncology*. - 2019.

Chmielewski Markus TRUCKs: the fourth generation of CARs [Revue] // *Expert Opinion on Biological Therapy*. - 2015.

Cho Shih-Feng Targeting B cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: potential uses of BCMA-based immunotherapy [Revue]. - [s.l.] : *Frontiers of Immunology*, 2018.

Chu J CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma [Revue] // *Leukemia*. - 2014.

Chu Jianhong Genetic Modification of T Cells Redirected toward CS1 Enhances Eradication of Myeloma Cells [Revue] // *Clinical Cancer research*. - 2014.

ClinicalTrials A Study of Subcutaneous Daratumumab Regimens in Combination With Bispecific T Cell Redirection Antibodies for the Treatment of Participants With Multiple Myeloma [En ligne] // *ClinicalTrials.gov*. - 6 Décembre 2019.

ClinicalTrials Dose Escalation Study of JNJ-64407564 in Participants With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma [En ligne] // *ClinicalTrials.gov*. - 2019.

ClinicalTrials Study of ATLCAR.CD138 Cells for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma [En ligne] // ClinicalTrials.gov. - Mai 2019.

Cohen Adam CAR T cells and other cellular therapies for multiple myeloma: 2018 Updates [Revue]. - [s.l.] : Asco Educational Book, 2018.

Cohen Adam D. B cell maturation antigen–specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma [Revue] // The journal of clinical Investigation. - [s.l.] : The journal of Clinical Investigation, 2019.

Cohen Adam D. B-Cell Maturation Antigen (BCMA)-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells (CART-BCMA) for Multiple Myeloma (MM): Initial Safety and Efficacy from a Phase I Study [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2016.

Costa Luciano J. First Clinical Study of the B-Cell Maturation Antigen (BCMA) 2+1 T Cell Engager (TCE) CC-93269 in Patients (Pts) with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM): Interim Results of a Phase 1 Multicenter Trial [Revue] // Blood. - 2019.

Costello Caitlin L. Phase 2 Study of the Response and Safety of P-Bcma-101 CAR-T Cells in Patients with Relapsed/Refractory (r/r) Multiple Myeloma (MM) (PRIME) [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2019.

Cowan Andrew J. Efficacy and Safety of Fully Human Bcma CAR T Cells in Combination with a Gamma Secretase Inhibitor to Increase Bcma Surface Expression in Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma [Revue] // Blood. - 2019.

Cranert Stacey A Manufacture of an Allogeneic CAR-T Stem Cell Memory Product Candidate for Multiple Myeloma, P-Bcma-ALLO1, Is Robust, Reproducible and Highly Scalable [Revue] // Blood. - 2019.

D'Agostino Mattia Anti-BCMA CAR T cell therapy in multiple myeloma: can we do better? [Revue]. - [s.l.] : Leukemia, 2020.

Dar Henia Preclinical Development of CTX120, an Allogeneic CAR-T Cell Targeting Bcma [Revue] // Blood. - 2018.

Deaglio Silvia CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target [Revue] // Cell press. - 2008.

Deaglio Silvia Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors [Revue] // Leukemia research. - 2001.

Delforge Michel KarMMA-3: A Phase 3 Study of Idecabtagene Vicleucel (ide-cel, bb2121), a BCMA-Directed CAR T Cell Therapy Vs Standard Regimens in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma [Revue] // Blood. - 2020.

Dimopoulos Meletios An Open-label, Randomised, Phase 3 Study of Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone (Rd) in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma (RRMM): POLLUX [En ligne] // ir.genmab.com. - 2018.

Dimopoulos Meletios Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma [Revue] // The New England Journal of Medicine. - 2016.

Drai Hanren Bispecific CAR-T cells targeting both CD19 [Revue] // Journal of Hematology & oncology. - 2020.

Drent Esther A rational Strategy for Reducing On target off tumor effects of CD38-Chimeric Antigen Receptors by Affinity Optimization [Revue] // American society of Gene & Cell therapy. - 2017.

Drent Esther Feasibility of controlling CD38-CAR T cell activity with a Tet-on inducible CAR design [Revue] // Plos one. - 2018.

Duan Shixin Natural killer group 2D receptor and its ligands in cancer immune escape [Revue] // Molecular Cancer. - 2019.

Durie Brian A Clinical staging system for multiple myeloma [Revue] // Cancer. - 1975.

EMA Farydak, INN-panobinostat-Europa EU [En ligne] // www.ema.europa.eu.

Eureka Therapeutics Eureka therapeutics announces publication of preclinical study demonstrating GPRC5D as a promising target for antibody based therapies in Multiple Myeloma [Conférence]. - 2019.

Eyquem Justin Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection [Revue]. - [s.l.] : Nature, 2017.

Farber Donna L. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis [Revue]. - [s.l.] : Nature Review immunology, 2014.

Ferrero Enza Human CD38, a Leukocyte Receptor and Ectoenzyme, Is a Member of a Novel Eukaryotic Gene Family of Nicotinamide Adenine Dinucleotide'Xonverting Enzymes [Revue] // The journal of immunology. - 1997.

Fonseca Rafael The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid [Revue] // Blood. - 2003.

Fraietta Joseph A. Determinants of response and resistance to CD19 [Revue]. - [s.l.] : Nature Medicine, 2018.

Frigault Matthew Phase 1 Study of CART-Ddbcma, a CAR-T Therapy Utilizing a Novel Synthetic Binding Domain for the Treatment of Subjects with Relapsed and Refractory Multiple Myeloma [Revue] // Blood. - 2020.

Gaballa Mahmoud R Management of myeloma-associated renal [Revue] // Expert Review of Hematology. - 2014.

Galetto Roman Bypassing the Constraint for Chimeric Antigen Receptor (CAR) Development in T-Cells Expressing the Targeted Antigen: Improvement of Anti-CS1 CAR Activity in Allogenic TCRA/CS1 Double Knockout T-Cells for the Treatment of Multiple Myeloma (MM) [Revue] // Blood. - 2015.

Garfall Alfred L. Anti-CD19 CAR T cells with high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation for refractory multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Clinical Medicine, 2018.

Garfall Alfred L. Chimeric Antigen Receptor T cells against CD19 for multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : The new england journal of Medicine, 2015.

Garfall Alfred L. Combination Anti-Bcma and Anti-CD19 CAR T Cells As Consolidation of Response to Prior Therapy in Multiple Myeloma [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2019.

Garfall Alfred L. Pilot study of anti-CD19 Chimaric antigen receptor T cell (CTL019) in conjunction with salvage autologous Stem cell trnasplantation for advanced multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2016.

Garfall Alfred T-cell phenotypes associated with effective CAR T-cell therapy in postinduction vs relapsed multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Blood advances, 2019.

Gattinoni Luca Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell [Revue]. - [s.l.] : Nature Review cancer, 2012.

Ge Haitao Tumor associated CD70 expression is involved in promoting tumor migration and macrophage infiltration in GBM [Revue] // International journal of Cancer. - 2017.

Gee Adrian GMP CAR-T cell production [Revue] // Best Practice & Research Clinical Haematology. - 2018.

Gerecke Christian The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma [Revue] // Deutsches Arzteblatt international. - 2016.

Gogishvili Tea SLAMF7-CAR T cells eliminate myeloma and confer selective fratricide of SLAMF7 normal lymphocytes [Revue] // Blood. - 2017.

Golubovskaya Vita Different Subsets of T Cells, Memory, Effector [Revue]. - [s.l.] : Cancers, 2016.

Gravestein Loes A. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system [Revue]. - [s.l.] : Seminars in immunology, 1998.

Green Damian J. CD38-bispecific antibody pretargeted radioimmunotherapy for multiple myeloma and other B-cell malignancies [Revue] // Blood. - 2018.

Green Damian J. Fully Human Bcma Targeted Chimeric Antigen Receptor T Cells Administered in a Defined Composition Demonstrate Potency at Low Doses in Advanced Stage High Risk Multiple Myeloma [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2018.

Gregory Tara Efficacy and safety of P-BCMA-101 CAR-T cells in patients with relapsed/refractory (r/r) multiple myeloma (MM) [En ligne] // cms.cws.net. - 2018.

Greipp Philip R. International Staging System for Multiple Myeloma [Revue] // Journal of Oncology. - 2005.

Guo Bo CD138-directed adoptive immunotherapy of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells for multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Journal of cellular Immunotherapy, 2016.

Hao Siguo Two-Year Follow-up of Investigator-Initiated Phase 1 Trials of the Safety and Efficacy of Fully Human Anti-Bcma CAR T Cells (CT053) in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2020.

Harris Daniel T. Adoptive T Cell Therapies: a comparison of T cell Receptors and Chimeric Antigen Receptors [Revue] // Trends in Pharmacological Sciences. - 2016.

Harrison Simon A Phase 1 First in Human (FIH) Study of AMG 701, an Anti-B-Cell Maturation Antigen (BCMA) Half-Life Extended (HLE) BiTE® (bispecific T-cell engager) Molecule, in Relapsed/Refractory (RR) Multiple Myeloma [Revue]. - 2020.

Hermanson David A Novel BCMA-Specific, Centyrin™-Based CAR-T Product for the Treatment of Multiple Myeloma [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2016.

Hernandez Randi MCAH171, a BCMA-Targeted CAR-T in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Phase 1 Readout [En ligne] // Cancer therapy advisor. - December 2018.

Herve Avet-Loiseau Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2007.

Hipp S. A novel BCMA/CD3 bispecific T-cell engager for the treatment of multiple myeloma induces selective lysis in vitro and in vivo [Revue] // Leukemia. - 2017.

Hsi Eric D. CS1, a potential New therapeutic antibody target for the treatment of multiple myeloma [Revue] // Clinical cancer research. - 2008.

Huang Manley Abstract 2312: Anti-CS1 x anti-CD3 bispecific antibody (BiAb)-armed anti-CD3 activated T cells (CS1-BATs) specifically kill CS1+ myeloma cells and release type-1 cytokines [Revue] // Cancer research. - 2019.

InfoCancer L'épidémiologie-Le myélome multiple en quelques mots [En ligne] // InfoCancer. - 2020.

Institut de Cancérologie Privé Hémopathies malignes [En ligne] // Institut Cancérologie Privé.fr. - 2017.

Institut national du cancer Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 [En ligne] // Santé publique France. - 2019.

Institut National du Cancer Lymphome non hodgkinien: point clés [En ligne] // Institut National du cancer. - 2019.

International Myeloma Foundation Comprendre Pomalyst(R)/Imnovid(R) (pomalidomide) gélules [En ligne] // www.af3m.org.

Jagannath Sundar Indatuximab Ravtansine (BT062) Monotherapy in Patients With Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma [Revue] // Clinical Lymphoma Myeloma Leukemia. - 2019.

Josefowicz Steven Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function [Revue]. - [s.l.] : Annual Review of Immunology, 2012.

Jungbluth Achim A. Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues [Revue] // International journal of cancer. - 2001.

Kaleem Zahid Lack of expression of surface immunoglobulin light chains in b cell non hodgkin lymphomas [Revue]. - [s.l.] : Hematopathology, 2000.

Kalos Michael T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent [Revue] // Science translational Medicine. - 2011.

Kay N E Blood levels of immune cells predict survival in myeloma patients: results of an Eastern Cooperative Oncology Group phase 3 trial for newly diagnosed multiple myeloma patients [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2001.

Kazandjian Dickran Multiple Myeloma epidemiology and survival, a unique malignancy [Revue] // Seminars in Oncology. - 2016.

Kazandjian Dickran Smoldering Multiple Myeloma: [Revue]. - [s.l.] : Clinical advances in Hematology & Oncology, 2014.

Kelly Kevin R. Indatuximab Ravtansine (BT062) in Combination with Lenalidomide and Low-Dose Dexamethasone in Patients with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma: Clinical Activity in Patients Already Exposed to Lenalidomide and Bortezomib [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2014.

Kerjean Elodie L'immunothérapie : cellules T à récepteurs antigéniques chimériques, inhibiteurs de check-points et anticorps bispécifique [Revue] // John Libbey. - 2020.

Kodama Tatsushi Anti-GPRC5D/CD3 Bispecific T-Cell--Redirecting Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma [Revue]. - [s.l.] : Molecular Cancer Therapeutics, 2019.

Kriegsmann Katharina Cell based immunotherapy approaches for multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : British Journal of Cancer, 2018.

Kristine A Preclinical Activity of JNJ-7957, a Novel BCMAxCD3 Bispecific Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma, Is Potentiated by Daratumumab [Revue] // Clinical Cancer Research. - 2020.

Krug Lee M. Targeting Lewis Y (Ley) in Small Cell Lung Cancer with a Humanized Monoclonal Antibody, hu3S193: A Pilot Trial Testing Two Dose Levels [Revue] // Journal of Thoracic Oncology. - 2007.

Kumar Shaji K. Phase 1, First-in-Human Study of MEDI2228, a BCMA-Targeted ADC in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma [Revue] // Blood. - 2020.

Kumar Shaji The multiple myelomas — current [Revue] // Nature Review-Clinical Oncology. - 2018.

Kyle Robert A. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma [Revue] // Leukemia. - 2009.

Kyle Robert A. Multiple Myeloma [Revue] // Blood. - 2008.

Kyle Robert A. Multiple Myeloma [Revue] // The New England Journal of Medicine. - 2004.

Lanier Lewis L. NKG2D receptor and its ligands in host defense [Revue] // Cancer immunology research. - 2015.

Larocca Alessandra Optimizing Treatment for Elderly Patients With [Revue] // Journal of Clinical oncology. - 2016.

Larrea Carlos Fernandez de Defining an Optimal Dual-Targeted CAR Construct Simultaneously Targeting Bcma and GPRC5D Prevents Bcma-Escape Driven Relapse in Multiple Myeloma [Revue]. - [s.l.] : Blood Cancer Discovery, 2020.

LeBien Tucker B cell Development [Section] // Fetal and Neonatal Physiology (Fifth Edition). - [s.l.] : Elsevier, 2017. - Vol. Volume 2, pages 1202-1207.

Leleu Xavier Thalidomide : mécanismes d'action et indications en hématologie [Revue] // La revue de médecine interne. - 2004.

Li Chenggong A Bispecific CAR-T Cell Therapy Targeting Bcma and CD38 for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Updated Results from a Phase 1 Dose-Climbing Trial [Revue]. - 2019.

Li Chunrui Clinical responses and pharmacokinetics of fully human BCMA targeting CAR T-cell therapy in relapsed/refractory multiple myeloma. [Revue]. - [s.l.] : Journal of Clinical Oncology, 2019.

Liebisch Peter CD44v6, a target for novel antibody treatment [Revue] // Haematologica/ the hematology journal. - 2005.

Lin Liang Preclinical Evaluation of CD8+ Anti-Bcma mRNA CAR T-Cells for the Control of Human Multiple Myeloma [Revue] // Blood. - 2019.

Lin Quande Recent updates on CAR T clinical trials for Multiple Myeloma [Revue]. - [s.l.] : Molecular Cancer, 2019.

Liu Yan Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging [Revue]. - [s.l.] : Aging Cell, 2009.

Lonial Sagar Elotuzumab Therapy for Relapsed or refractory multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : The New England journal of Medicine, 2015.

Ma Tiantian Chimeric antigen receptor T cell targeting B cell maturation antigen immunotherapy is promising for multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Annals of hematology, 2019.

Mackay Fabienne BAFF and APRIL: a tutorial on B cell survival [Revue]. - [s.l.] : Annual review Immunology, 2003.

Madduri Deepu ASH Annual Meeting [En ligne] // Results from CARTITUDE-1: A phase 1b/E study of JNJ-4528, a CAR-T cell therapy directed against B-Cell maturation antigen, in patients with RRMM. - 9 Décembre 2019. - <https://ash.confex.com/ash/2019/webprogram/Paper121731.html>.

Madduri Deepu CARTITUDE-1: Phase 1b/2 Study of Ciltacabtagene Autoleucel, a B-Cell Maturation Antigen-Directed Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy, in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma [Revue] // Blood. - 2020.

Madduri Deepu REGN5458, a BCMA x CD3 Bispecific Monoclonal Antibody, Induces Deep and Durable Responses in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma [Revue]. - 2020.

Mailankody Sham Clinical Responses and Pharmacokinetics of MCarH171, a Human-Derived Bcma Targeted CAR T Cell Therapy in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Final Results of a Phase I Clinical Trial [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2018.

Mailankody Sham JCARH125, Anti-BCMA CAR T-cell Therapy for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Initial Proof of Concept Results From a Phase 1/2 Multicenter Study (EVOLVE) [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2018.

Mailankody Sham Minimal residual disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside [Revue] // Nature Reviews-clinical oncology. - 2015.

Mailankody Sham Universal: An Allogeneic First-in-Human Study of the Anti-Bcma ALLO-715 and the Anti-CD52 ALLO-647 in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2020.

Malaer Joseph D. 2B4 (CD244, SLAMF4) and CS1 (CD319, SLAMF7) in systemic lupus erythematosus and cancer [Revue] // Clinical Immunology. - 2018.

Malavasi Fabio Human CD38: a coprotem in search of a function [Revue] // Immunology today. - 1994.

Manier Salomon Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications [Revue] // Nature. - 2017.

Manier Salomon Myérome Multiple: des critères diagnostiques et pronostiques renouvelés et de forts espoirs thérapeutiques [Revue] // Presse Med. - 2019.

Mariuzza Roy The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An [Revue] // J. Biol. Chem. - 2020.

Mateo Gema Prognostic value of immunophenotyping in myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high dose therapy [Revue]. - [s.l.] : Journal of clinical oncology, 2008.

Mathur Rohit Universal SLAMF7-Specific CAR T-Cells As Treatment for Multiple Myeloma [Revue] // Blood. - 2017.

Matsui William Characterization of clonogenic multiple myeloma cells [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2004.

Maude Shannon CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute [Revue] // Acute lymphoblastic leukemia. - 2015.

Maude Shannon Tisagenlecleucel in Children and Young [Revue] // The New England Journal of Medicine. - 2018.

Maus Marcela Antibody modified T cells: CARs Take the Front Seat for Hematologic [Revue] // Blood. - 2013.

McEarchern JulieA. Engineered anti-CD70 antibody with multiple effect or functions exhibits in vitro and in vivo antitumor activities [Revue] // Blood. - 2007.

Morandi Fabio CD38: A target for immunotherapeutic Approaches in multiple myeloma [Revue] // Frontiers in immunology. - 2018.

Moreau Philippe Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study [Revue] // The Lancet. - 2019.

Moreau Philippe Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines [Revue] // Anals of Oncology (Supplement 4). - 2017.

Moreau Philippe Multiple Myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [Revue] // Clinical ^practice guidelines. - 2013.

Morgan Gareth J The genetic architecture of multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Nature Reviews Cancer, 2012.

Nau Konrad Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment [Revue] // American Family Physician. - 2008.

Nausch N. NKG2D ligands in tumor immunity [Revue] // Nature. - 2008.

Neelapu S. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy [Revue] // The New England Journal of medicine. - 2017.

Ng Lai Guan B Cell-Activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF Receptor facilitating BAFF co stimulation of circulating T and B cells [Revue]. - [s.l.] : The journal of Immunology, 2004.

Nijhof Inger S. Current and new therapeutics strategies for relapsed and refractory multiple myeloma: an update [Revue] // Drugs. - 2018.

Nishida Hiroko Monoclonal Antibody Therapies in Multiple Myeloma: A [Revue] // Journal of Oncology. - 2019.

O'Connor Brian P. BCMA is essential for the survival of long-lived Bone Marrow Plasma Cells [Revue]. - [s.l.] : The journal of experimental Medicine, 2004.

Paiva B Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance [Revue]. - [s.l.] : Leukemia, 2016.

Paiva Bruno High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2012.

Palumbo Antonio Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma [Revue] // The New England Journal of Medicine. - 2016.

Palumbo Antonio Multiple Myeloma [Revue] // The New England of Journal of Medicine. - 2011.

Paramore Andrew Bortezomib [Revue]. - 2003.

Peinert S Gene-modified T cells as immunotherapy for multiple myeloma and acute myeloid leukemia expressing the Lewis Y antigen [Revue] // Gene Therapy. - 2010.

Pentcheva-Hoang Tsvetelina Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections [Revue]. - [s.l.] : Immunological reviews, 2009.

Pitte Morgan Physiopathologie de l'Hématopoïèse [En ligne] // Soins-Infirmiers.com. - 2019.

Popat Rakesh Phase 1 First-in-Human Study of AUTO2, the First Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Targeting APRIL for Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM) [Revue] // Blood. - 2019.

Poret Nicolas These de docteur en sciences de l'université de Lille // Impact de CD38 dans la leucémie à Tricholeucocytes. - Lille : [s.n.], 30 Septembre 2015.

Poseida Poseida Therapeutics [En ligne] // poseida.com. - <https://poseida.com/technology/#piggybac>.

Poseida Poseida Therapeutics Presents Preclinical Data Demonstrating Tumor Response from BCMA-Specific CAR-T Program at American Society of Hematology Annual Meeting [Conférence]. - 2016.

Precision Biosciences GlobeNeswire [En ligne] // Precision BioSciences Announces FDA Acceptance of IND for PBCAR269A, a BCMA Targeted Genome Edited Allogeneic CAR T Therapy Candidate for Multiple Myeloma. - 2020.

Quarona Valeria CD38 and CD157: A Long Journey from Activation Markers to Multifunctional Molecules [Revue] // International Clinical Cytometry society. - 2013.

Radhakrishnan Sabarinath Venniyil CD229 CAR T cells eliminate multiple myeloma and tumor propagating cells without fratricide [Revue] // Nature communications. - 2020.

Radhakrishnan Sabarinath Venniyil Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells Specific for CD229: A Potentially Curative Approach for Multiple Myeloma [Revue] // Blood. - 2017.

Rafiq Sarwish Engineering strategies to overcome [Revue] // Nature Reviews-Clinical Oncology. - 2020.

Raje Noopur Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in relapsed or refractory Multiple Myeloma [Revue]. - [s.l.] : The New England Journal of Medicine, 2019.

Raje Noopur S. Safety, Clinical Activity, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics from a Phase I Study of PF-06863135, a B-Cell Maturation Antigen (BCMA)-CD3 Bispecific Antibody, in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM) [Revue] // Blood. - 2019.

Rajkumar Vincent Multiple myeloma: Every year a new standard? [Revue] // Hematological oncology. - 2019.

Rajkumar Vincent Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma [Revue] // ASCO education book. - 2016.

Ramos Carlos A. Clinical responses with lymphocytes targeting malignancy-associated k light chains [Revue]. - [s.l.] : Clinical medicine, 2016.

Rasche Leo Immunologic Approaches for the treatment of multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Cancer treatment review, 2017.

Restifo Nicholas P. Big bang theory of stem-like [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2014.

Richter Joshua Ryan Phase 1, multicenter, open-label study of single-agent bispecific antibody t-cell engager GBR 1342 in relapsed/refractory multiple myeloma. [Revue] // Journal of clinical oncology. - 2018.

Richter Maximilian poseida.com [En ligne] // P-BCMA-ALLO1 — a non-viral allogeneic anti-BCMA CAR T therapy with potent antitumor function for the treatment of multiple myeloma. - 2019.

Ritchie David Mechanisms of Action and Clinical Development of Elotuzumab [Revue]. - [s.l.] : Clinical and Translational science, 2017.

Robbins Paul F Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy and Neoantigens [Revue]. - [s.l.] : Cancer Journal, 2017.

Roex Gils Safety and clinical efficacy of BCMA [Revue]. - 2020.

Sadelain Michel Chimeric Antigen Receptors: [Revue] // Annu. Rev. Cancer Biol.. - 2017.

Sadelain Michel Therapeutic T cell engineering [Revue] // Nature. - 2017.

Salmund Robert J T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance [Revue]. - [s.l.] : Immunological Reviews, 2009.

Sanchez Eric Serum B cell maturation antigen is elevated in multiple myeloma and correlates with disease status and survival [Revue]. - [s.l.] : British journal of Haematology, 2012.

Sanchez Eric The role of B-cell maturation antigen in the biology and management of, and as a potential therapeutic target in, multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Targeted Oncology, 2018.

Sanofi Sanofi: la FDA approuve Sarclisa(R) pour le traitement du myélome multiple en rechute ou réfractaire [Conférence]. - 2020.

Schmidts Andrea Rational design of a trimeric APRIL-based CAR-binding domain enables efficient targeting of multiple myeloma [Revue] // Blood Advances. - 2019.

Schroeder Harry W. B-Cell Development and Differentiation [Livre]. - [s.l.] : Clinical Immunology , 2008. - Vol. Third edition.

Schuberth PC Effector memory and central memory NY-ESO-1-specific re-directed T cells for treatment of multiple myeloma [Revue] // Nature. - 2013.

Schuster Stephen J. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed [Revue] // The New England Journal of Medicine. - 2018.

Seder Robert A Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation [Revue]. - [s.l.] : Nature Immunology, 2003.

Senbanjo Linda T. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of cancer cells [Revue] // Frontiers in cell and developmental biology. - 2017.

Shaffer Donald R. TcellsredirectedagainstCD70fortheimmunotherapyofCD70-positive malignancies [Revue] // Blood. - 2011.

Shah Nina Initial Results from a phase 1 clinical study of bb21217, a next generation anti BCMA CAR T therapy [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2018.

Shah Nirali N. Mechanisms of resistance to CAR [Revue] // Nature reviews-Clinical oncology. - 2019.

Sharma Padmanee The future of immune checkpoint therapy [Revue]. - [s.l.] : Science, 2015.

Shi Xiolan Combined Infusion of Anti-CD19 and Anti-Bcma CART Cells after Early or Later Transplantation in the Front Line Was Superior to Salvage Therapy for High Risk MM [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2019.

Singer Alfred Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4-versus CD8-lineage choice [Revue]. - [s.l.] : Nature Reviews Immunology, 2008.

Singh Nathan Early memory phenotypes drive T cell proliferation in [Revue] // Science translational Medicine. - 2016.

Singh Nathan Mechanisms of resistance to CAR T cell therapies [Revue] // Seminars in cancer biology. - 2019.

Smith Emily EBMT 2019 | Dual-targeting CAR T-cells with autologous stem cell transplant for high-risk multiple myeloma [En ligne] // Multiple Myeloma Hub. - 2019.

Smith Eric L. CAR T Cell Therapy Targeting G Protein-Coupled Receptor Class C Group 5 Member D (GPCR5D), a Novel Target for the Immunotherapy of Multiple Myeloma [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2018.

Solly Samuel Remarques on the pathology of mollities ossium with cases. [Revue] // Medico-Chirurgical transactions. - 1844.

Sommer Cesar ALLO-715, an Allogeneic BCMA CAR T Therapy Possessing an Off-Switch for the Treatment of Multiple Myeloma [Revue] // Blood. - 2018.

Sondergeld Pia Monoclonal Antibodies in Myeloma [Revue] // clinical Advances in Hematology and Oncology. - 2015.

Song Moo-Kon Resistance Mechanisms to CAR T-Cell Therapy and overcoming strategy in B-cell hematologic malignancies [Revue] // International Journal of Molecular Sciences. - 2019.

Sorrento therapeutics Sorrento Provides Updates on CD38 Immunotherapies and Implementation of Disruptive GMP Manufacturing for “Off-The-Shelf” Cell Therapy [Conférence]. - 2019.

Spencer Andrew A preliminary study of the anti-K myeloma antigen monoclonal antibody KappaMab (MDX-1097) in pretreated patients with K-restricted multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Blood Cancer, 2019.

Spencer Andrew Phase 2a, open label, multi dose study of the anti-kappa monoclonal antibody, MDX-1097, in relapsed kappa-chain restricted multiple myeloma with stable measurable disease [En ligne]. - Haematologica, 2013. - <http://www.haemalogix.com/pdf/posters/2.pdf>.

Stock Sophia Optimizing Manufacturing protocols of chimeric antigen receptor T cells for improved anticancer immunotherapy [Revue] // International journal of molecular sciences. - 2019.

Straathof Karin C. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy [Revue] // Blood. - 2005.

Strassz Andras A First in Human Study Planned to Evaluate Hdp-101, an Anti-BCMA Amanitin Antibody-Drug Conjugate with a New Payload and a New Mode of Action, in Multiple Myeloma [Revue] // Blood. - 2020.

Suen H Multiple myeloma causes clonal T-cell immunosenescence: identification of potential novel targets for promoting tumour immunity and implications for checkpoint blockade [Revue]. - [s.l.] : Leukemia, 2016.

Sun Chuang Safety and efficacy of targeting CD138 with a chimeric antigen receptor for the treatment of multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Oncotarget, 2019.

Tai Yu-Tzu B cell maturation antigen (BCMA)-based immunotherapy for multiple myeloma [Revue] // Expert opinion on biological therapy. - 2019.

Tang Xiaowen First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia [Revue] // American Journal of Cancer research. - 2018.

Tarlinton David Plasma cell differentiation and survival [Revue]. - [s.l.] : Current opinion in Immunology, 2008.

Teng Yvone Hui-Fang Molecular functions of syndecan-1 in disease [Revue]. - [s.l.] : Matrix Biol, 2012.

The International Myeloma Working Group Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group [Revue] // British Journal of Haematology. - 2003.

Tian Chen Anti-CD138 chimeric antigen receptor-modified T cell therapy for multiple myeloma with extensive extramedullary involvement [Revue]. - [s.l.] : Annals of Hematology, 2017.

Timmers Marijke Chimeric Antigen Receptor modified T cell therapy in multiple myeloma: Beyond B cell maturation Antigen [Revue]. - [s.l.] : Frontiers in Immunology, 2019.

Topp Max S. Anti-B-Cell Maturation Antigen BiTE Molecule AMG 420 Induces Responses in Multiple Myeloma [Revue] // Journal of Clinical Oncology. - 2019.

Trudel Suzanne Antibody–drug conjugate, GSK2857916, in relapsed/refractory multiple myeloma: an update on safety and efficacy from dose expansion phase I study [Revue] // Blood cancer journal. - 2019.

Ulaner Gary A. CD38-targeted Immuno-PET of Multiple Myeloma: From Xenograft Models to First-in-Human Imaging [Revue] // Radiology. - 2020.

Van Camp Benjamin Plasma Cells in Multiple Myeloma Express a Natural Killer Cell-Associated [Revue] // Blood. - 1990.

Van de Donk Niels W. C. J. CD38 antibodies in multiple myeloma: back to the future [Revue] // Blood. - 2018.

Van Rhee Frits NY-ESO-1 highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses [Revue] // Blood. - 2005.

Varadarajan Navin Abstract 4745: Quantitative single-cell functional characterization of CD19-specific CAR+ T Cells for immunotherapy. [Revue]. - [s.l.] : Cancer Research, 2013.

Veillette André SLAM Family Receptors: immune regulators with or without SAP-Family Adaptors [Revue] // Cold Spring Harbor perspectives in Biology. - 2010.

Viville Stéphane Immunologie et recombinaison homologue: étude de l'ontogénèse des lymphocytes T [Revue] // Médecine sciences. - 1992.

Wang Bai-Yan Long term Follow up of a phase 1, first in human open label study of LCAR-B38M, a structural differentiated CAR T cell therapy targeting BCMA in patients with RRMM [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2019.

Wang Hao Immune checkpoint blockade and CAR-T [Revue]. - 2019.

Wang Kemeng CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy [Revue]. - [s.l.] : Experimental Hematology & Oncology, 2012.

Wang M. KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed [Revue] // The new england journal of medicine. - 2020.

Wang Qiong J. Preclinical Evaluation of Chimeric Antigen Receptors Targeting CD70-Expressing Cancers [Revue] // Clinical Cancer research. - 2016.

Wang Xiuli Lenalidomide Enhances the Function of CS1 Chimeric Antigen Receptor–Redirected T Cells Against Multiple Myeloma [Revue] // Clinical Cancer research. - 2017.

Weisel Katja Dream-3: A Phase 3, Open-Label, Randomized Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Belantamab Mafodotin (GSK2857916) Monotherapy Compared with Pomalidomide Plus Low-Dose Dexamethasone (Pom/Dex) in Participants with Relapsed/Refractory Multiple Myelo [Revue] // Blood. - 2019.

Westwood Jennifer A. Adoptive transfer of T cells modified with a humanized chimeric receptor gene inhibits growth of Lewis-Y-expressing tumors in mice [Revue] // Proceedings of the national academy of sciences. - 2005.

Winkler Thomas H The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance [Revue]. - [s.l.] : Frontiers in Immunology, 2018.

Wu Chao Chimeric antigen receptor T cell therapies for multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Journal of Hematology & oncology, 2019.

Wudhikarn Kitsada Future of CAR T cells in multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Hematology, 2020.

Xu Jie Exploratory of biepitopic CAR T targeting B cell maturation antigen in relapsed/refractory multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : PNAS, 2019.

Xu Shengli B-Cell Maturation Protein, Which Binds the Tumor Necrosis Factor Family Members BAFF and APRIL, Is Dispensable for Humoral Immune Responses [Revue]. - [s.l.] : Molecular and cellular biology, 2001.

Yan Zhiling A combination of humanised anti-CD19 and anti-BCMA CAR T cells in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a single-arm, phase 2 trial [Revue]. - [s.l.] : Lancet Haematology, 2019.

Yousef Sara CD229 is expressed on the surface of plasma cells carrying an aberrant phenotype and chemotherapy-resistant precursor cells in multiple myeloma [Revue] // Human Vaccines & Immunotherapeutics. - 2015.

Zafra Christina L. Zuch de Targeting Multiple Myeloma with AMG 424, a Novel Anti-CD38/CD3 Bispecific T-cell–recruiting Antibody Optimized for Cytotoxicity and Cytokine Release [Revue] // Clinical cancer research. - 2019.

Zah Eugenia Systematically optimized BCMA/CS1 bispecific CAR-T cells robustly control [Revue] // bioRxiv. - 2020.

Zhang Hua A Bcma and CD19 Bispecific CAR-T for Relapsed and Refractory Multiple Myeloma [Revue]. - [s.l.] : Blood, 2019.

Zhang Xinfu Design, synthesis and evaluation of anti-CD38 antibody drug conjugate based on Daratumumab and Maytansinoid [Revue] // Bioorganic & Medicinal Chemistry 27. - 2019.

Zhao Wan-Hong A phase I, open label study of LCAR-B38M, a chimeric antigen receptor T cell therapy directed against B cell maturation antigen in patients with relapsed of refractory multiple myeloma [Revue]. - [s.l.] : Journal of Hematology and Oncology, 2018.