

**Nouvelles approches  
immunothérapeutiques de la  
LLC : signalisation par des  
récepteurs de  
l'immunité innée**

# La leucémie lymphoïde chronique (LLC)

- La plus fréquente des hémopathies : 3 nouveaux cas / 100000 habitants / an
- Pas de facteur favorisant connu
- Adultes âgés (>65 ans), sex ratio = 2/1
- Accumulation de lymphocytes B clonaux dans le sang, la moelle osseuse, les organes lymphoïdes
- Lymphocytes B particuliers : CD19+/CD5+
- Cellules matures, mémoire ou naïves
- Avec ou sans mutation des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines

# Traitements actuels

- Chez les patients présentant une forme agressive
- Ciblage des cellules tumorales par anticorps anti-CD20 (Rituximab) associé à la Fludarabine et au Cyclophosphamide
- Essais de ciblage par anti-CD52 (Campath), toxicités importantes
- Permettent de réduire considérablement la masse tumorale
- Réémergence des cellules malignes
- Recherche de thérapies adjuvantes en fin de première ligne

# Voies de recherche

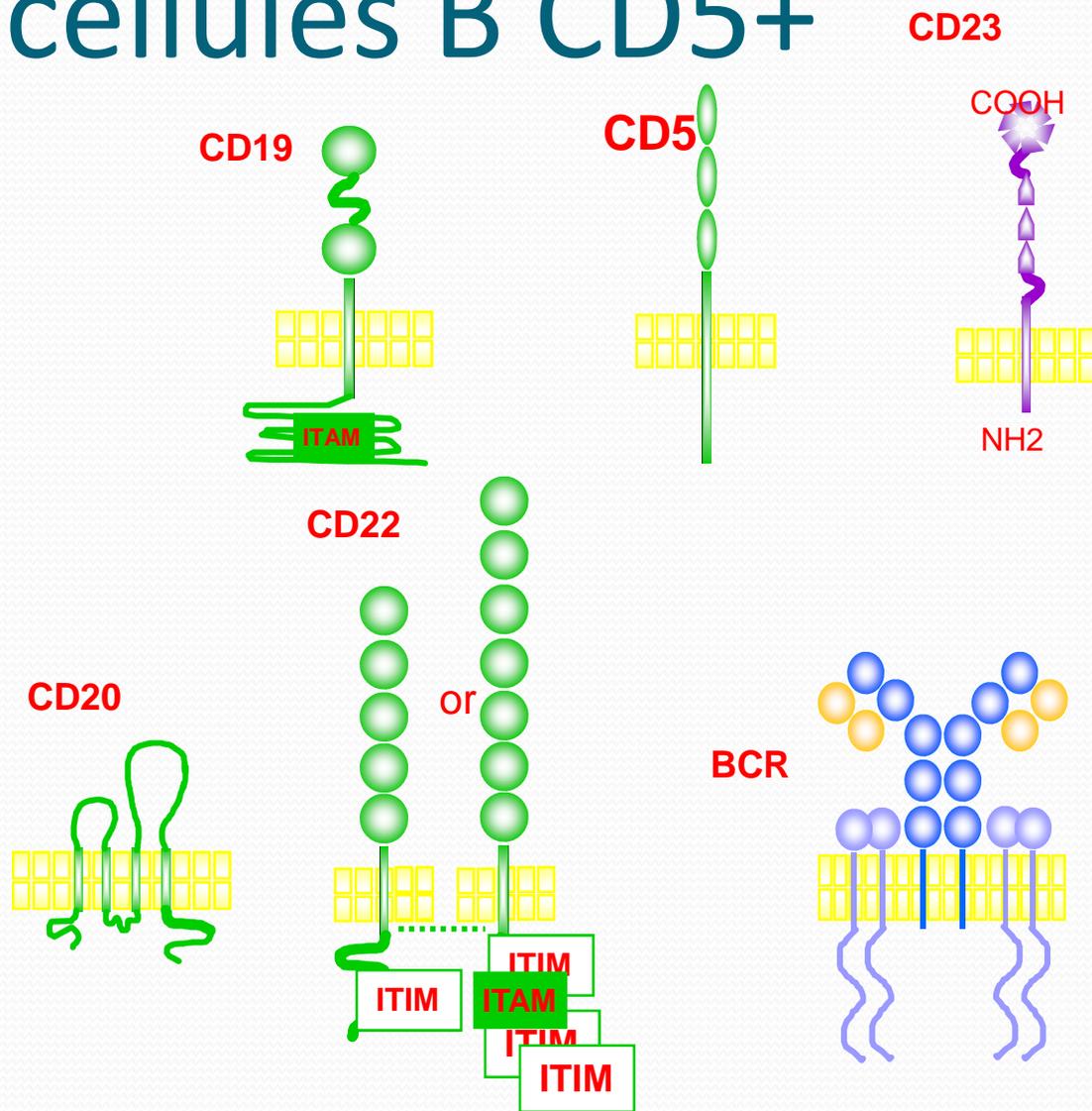
- Basées sur les caractéristiques des cellules B tumorales
- En prenant en compte le caractère clonal de la prolifération : les cellules présentent un idiotope homogène, « signature » de la tumeur
- Hypothèse séduisante d'une vaccination anti-tumorale
  - Ciblant l'idiotope anormal
  - En surmontant le déficit immunitaire associé à la LLC
  - Après élimination de la majorité de la masse tumorale
  - En permettant une accessibilité aux territoires-sanctuaires



# Caractéristiques des lymphocytes B de la LLC

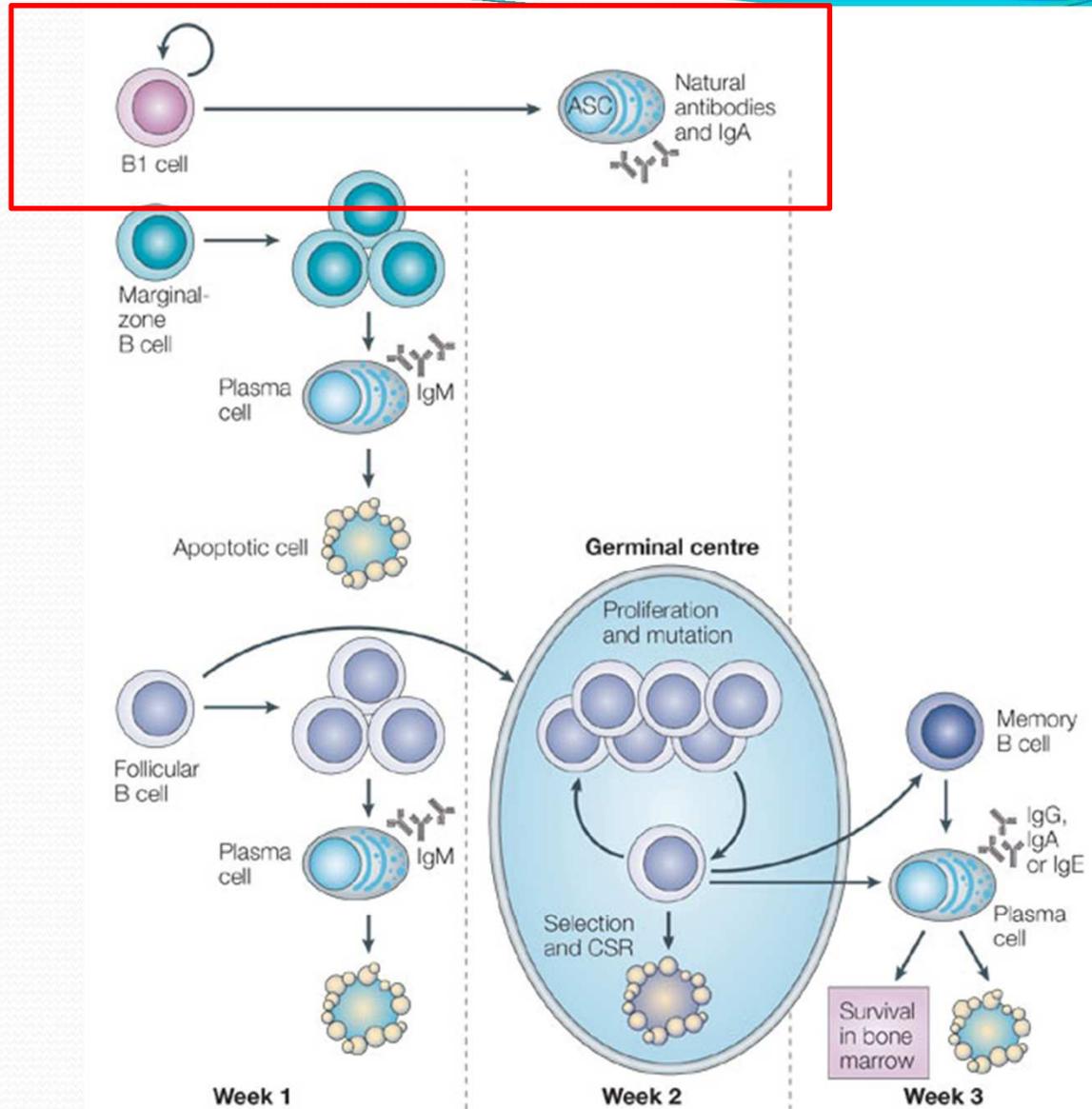
# Clone de cellules B CD5+

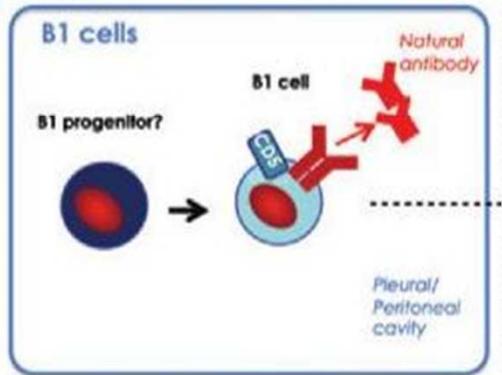
- CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>
- CD23<sup>+</sup>
- CD20<sup>lo</sup>
- CD22<sup>lo/-</sup>
- CD79<sup>lo/-</sup>
- sIg<sup>lo/-</sup>



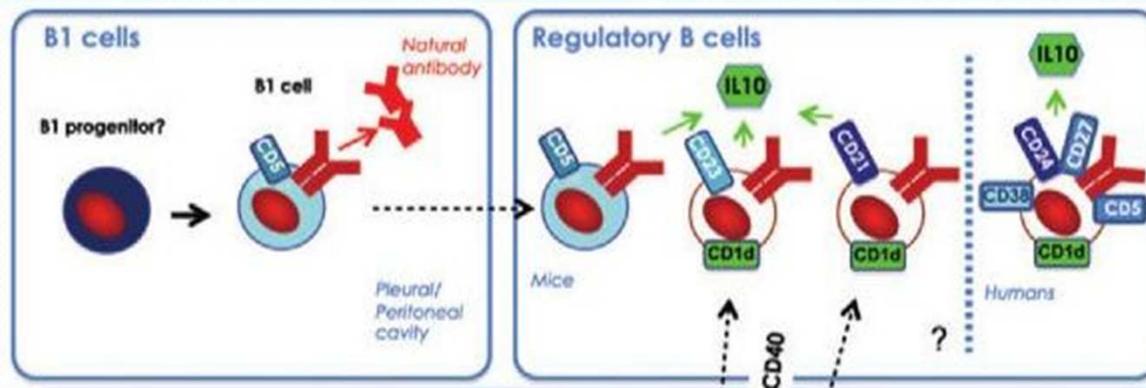
## Les cellules de la LLC sont proches des lymphocytes B1

- CD19/CD5/CD23<sup>+/-</sup>/CD43<sup>lo</sup>
- Prédominants à la naissance
- Persistants dans le péritoine, les amygdales et la rate
- Chez l'adulte : 10 à 25% des cellules B périphériques
- De 1 à 4  $10^{-4}$  globules blancs
- Cellules de l'immunité innée





- Production spontanée d'anticorps indépendamment de signaux T
- IgM de faible affinité, potentiellement autoréactives
- *Implication dans les stigmates auto-immuns des LLC?*



- Fonctions régulatrices identifiées plus récemment
- *Implication dans le déficit immunitaire des LLC?*

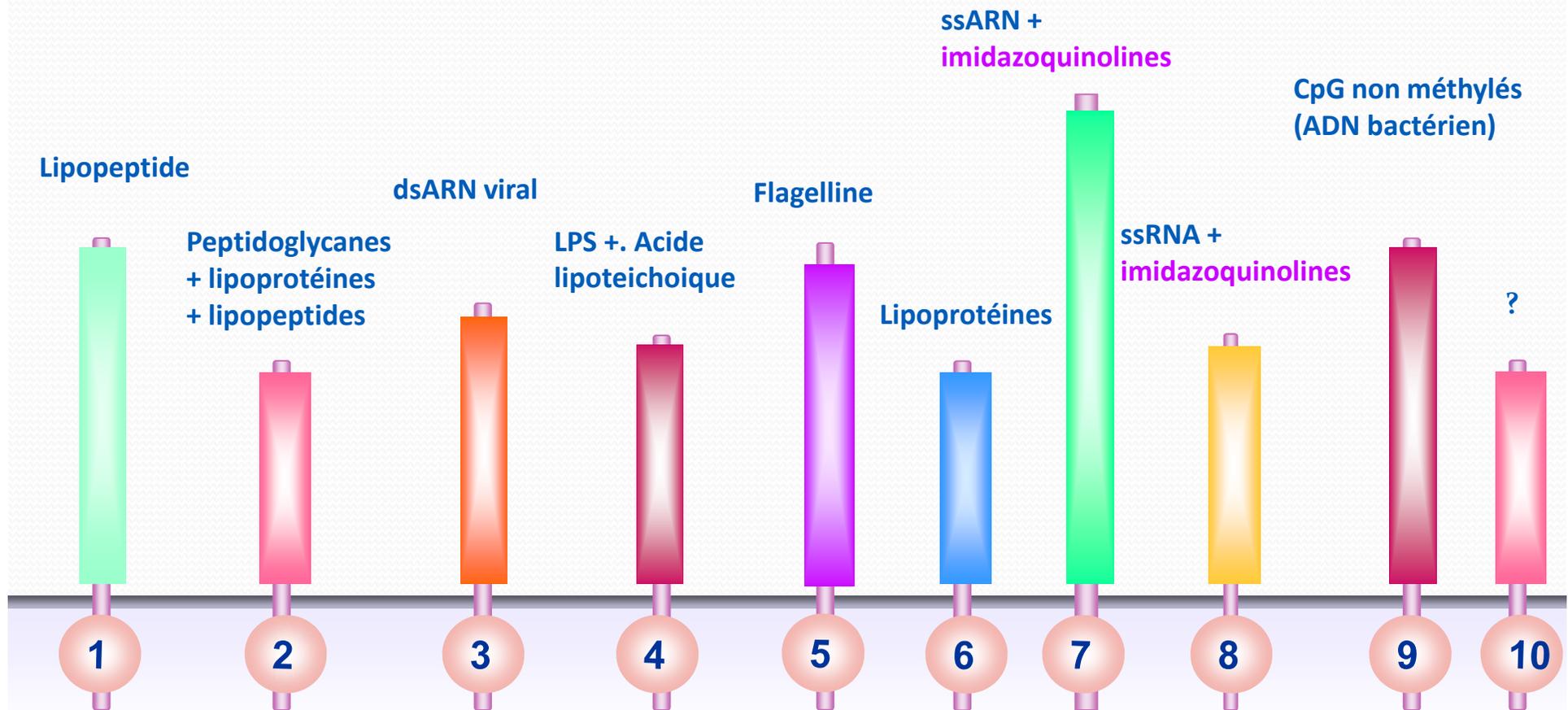
# Stimulation T-indépendante

- Autres stimuli possibles
  - Récepteurs de l'immunité innée
  - Pattern recognition receptors PRR :
    - Toll-like Receptors TLR
    - C-type lectine Receptors CLR
    - NOD-Like Receptors NLR
  - Stimulation par les antigènes de l'environnement
  - Essentiellement microbiens
    - Pathogen-associated microbial patterns PAMPS



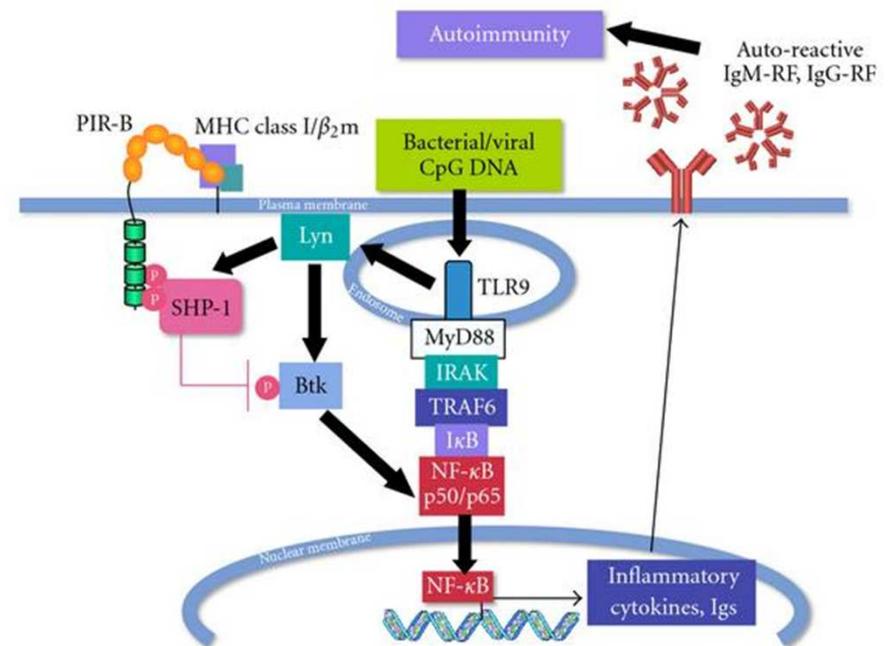
# Dix TLRs ont été identifiés chez l'homme

## Ils reconnaissent des PAMPs spécifiques



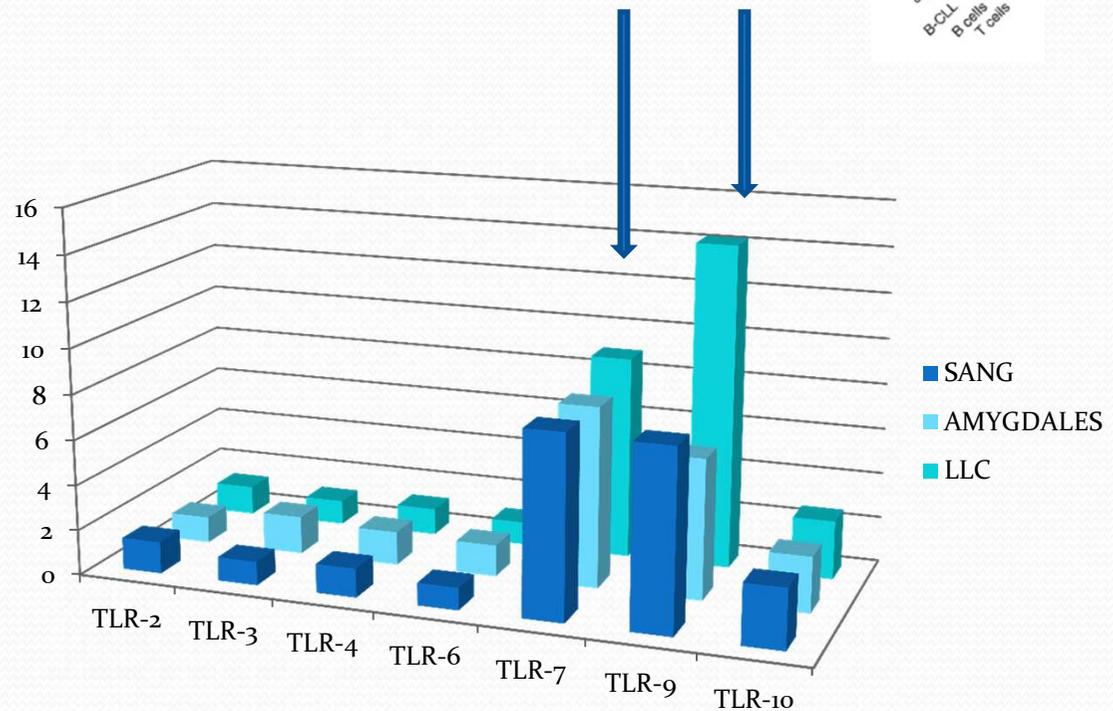
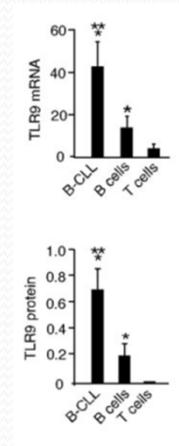
# Expression des TLR

- Sur les monocytes/macrophages
- Sur les cellules dendritiques
- Sur les lymphocytes B
  - Lymphocytes B normaux
  - Lymphocytes B<sub>1</sub> ?
  - Lymphocytes B de LLC?

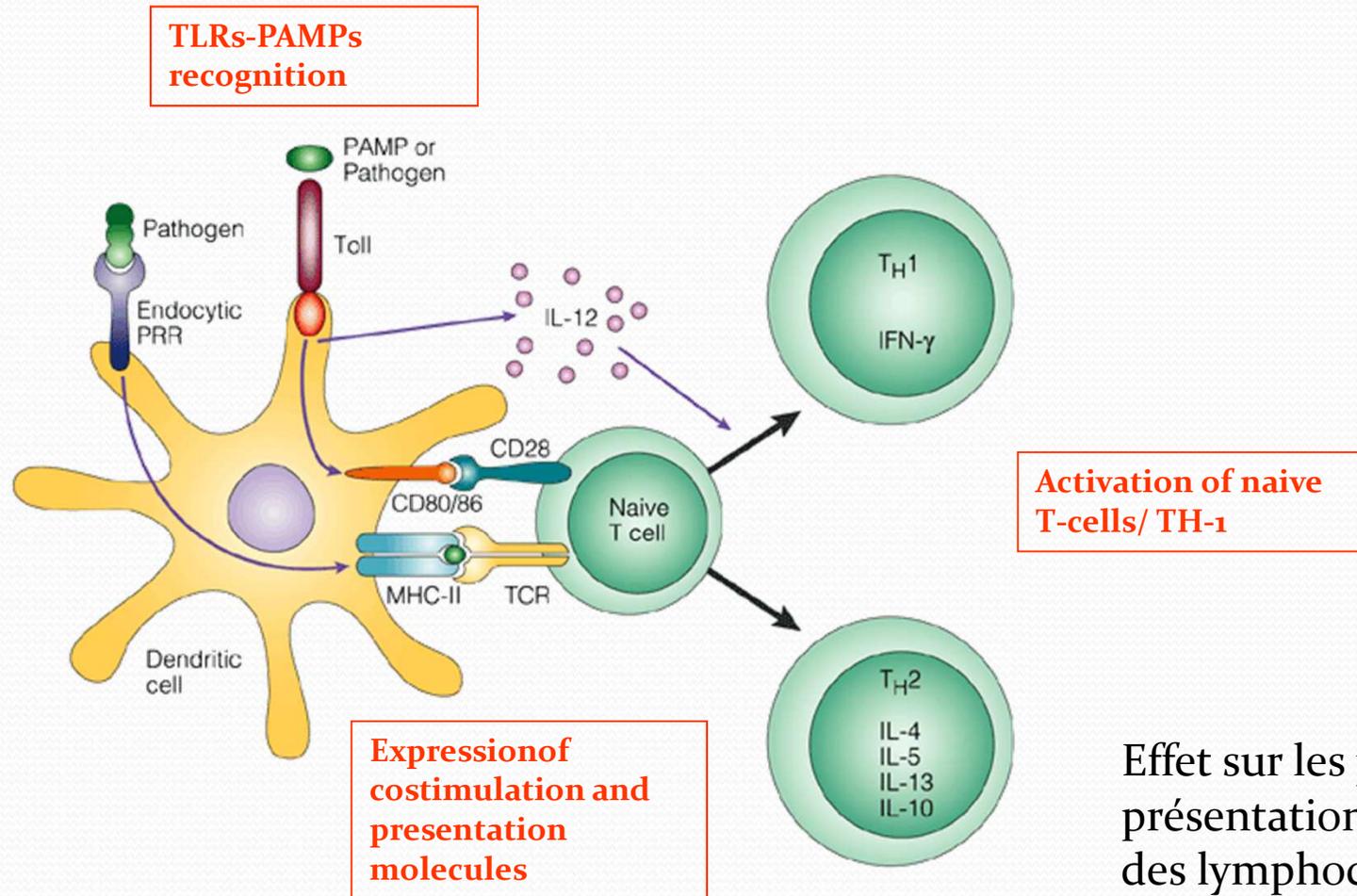


# TLR et cellules de LLC

- Identification de l'expression d'ARNm de TLR
- Quelques travaux sur l'expression protéique en cytométrie de flux
- Grandjenette 2008



# TLR, immunité innée et immunité adaptative

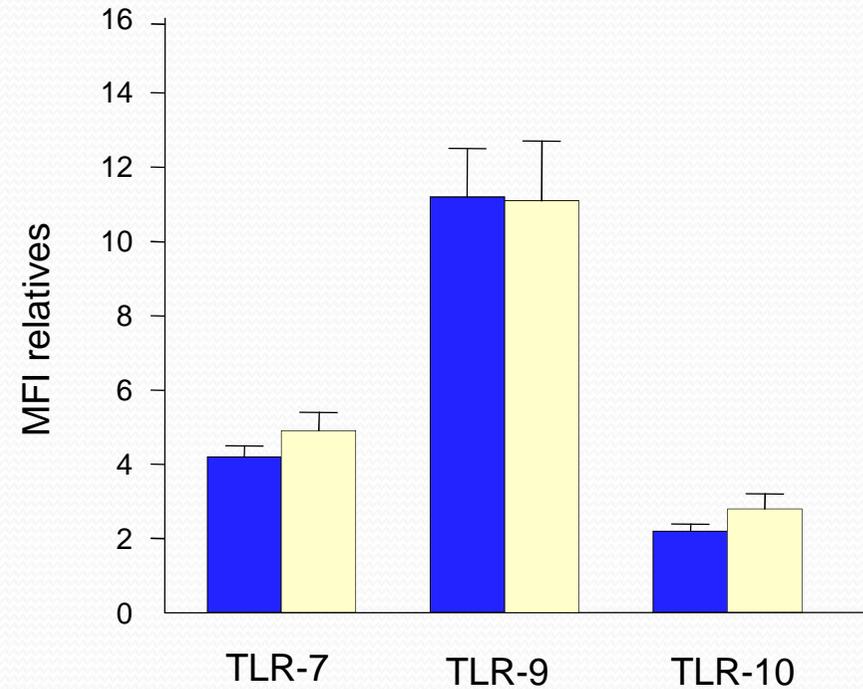
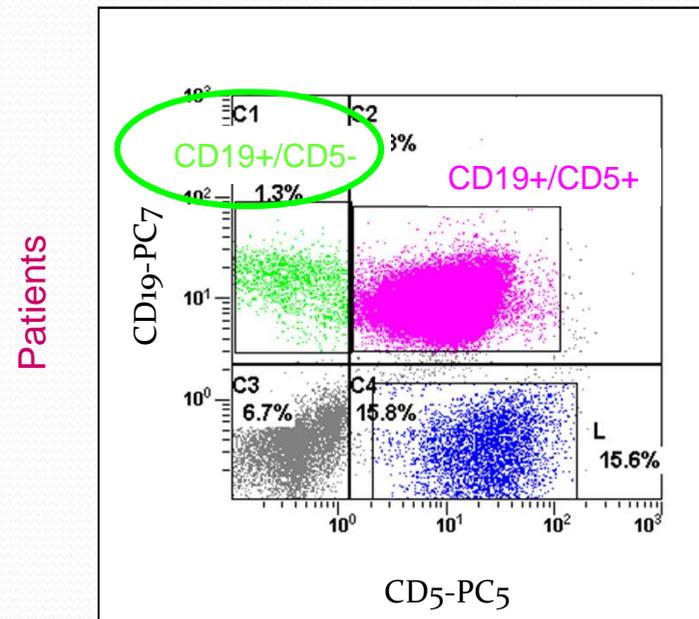
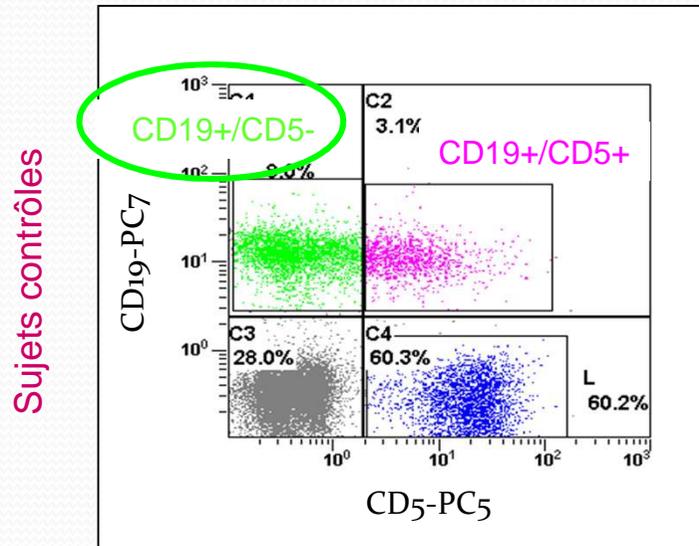


Effet sur les propriétés de présentation des antigènes des lymphocytes B?

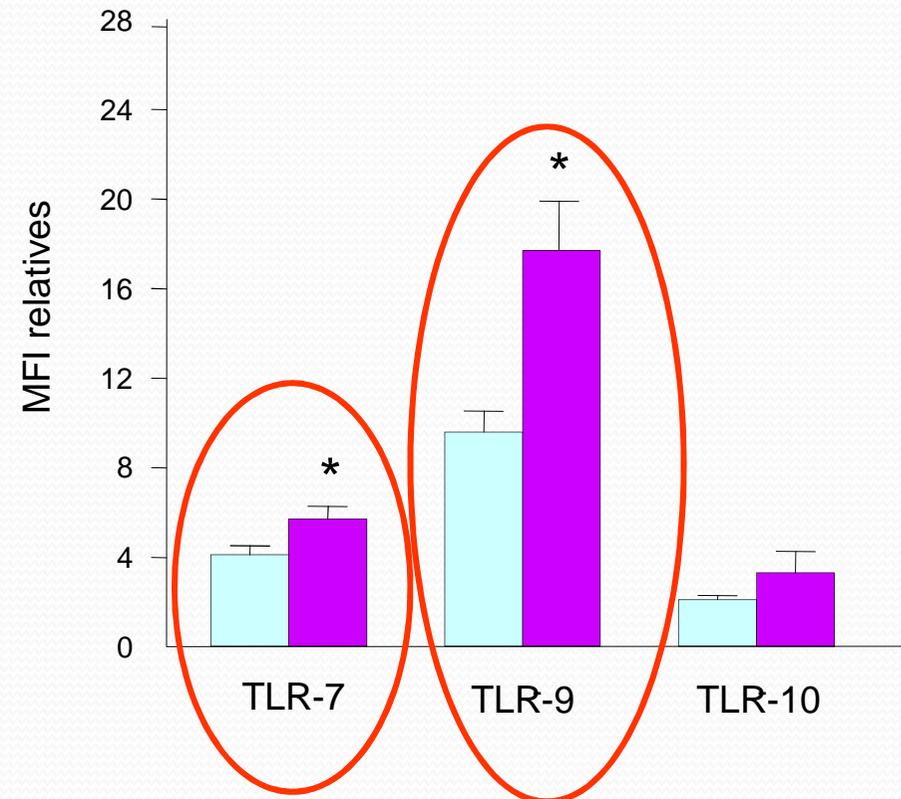
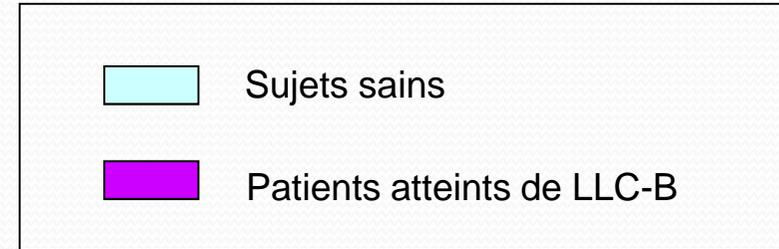
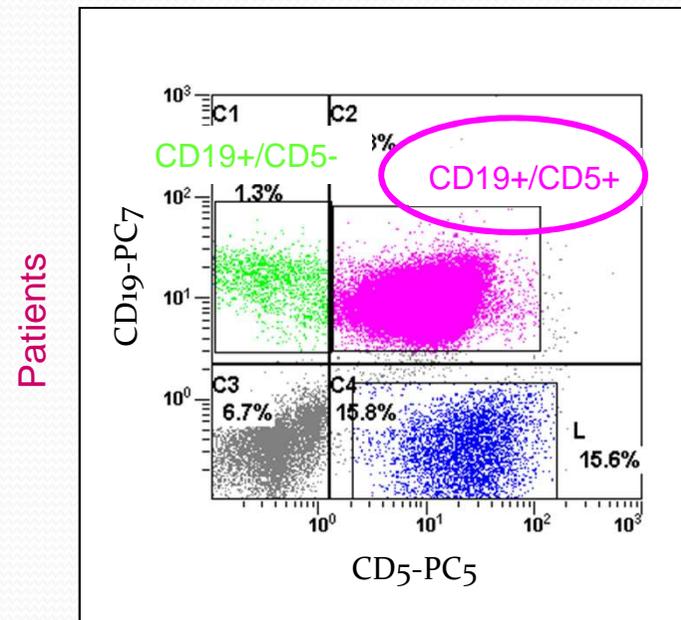
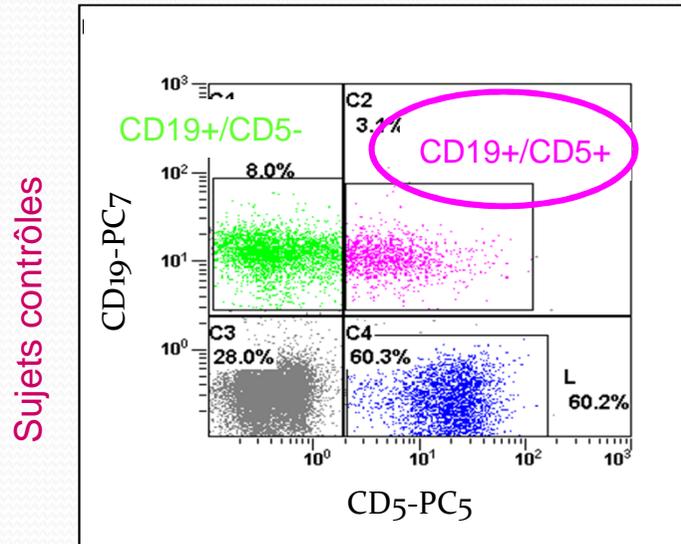
# Expression de TLR-7 et TLR-9

- Ligands synthétiques disponibles
  - Imidazoquinolines – Imiquimod
  - Oligo nucléotides C poly G : CpG ODN
- Utilisables pour tester la fonctionnalité des TLR en ciblant les cellules de LLC

# Pas de différence entre les B CD19+/CD5-



# Différence caractéristique des cellules tumorales





TLR-7 et TLR-9

Pistes pour une thérapie ciblée?

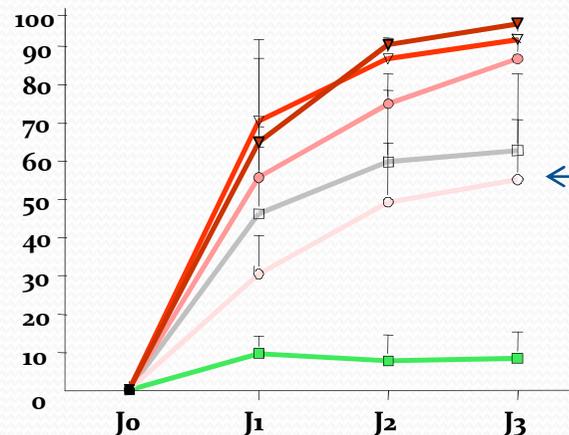
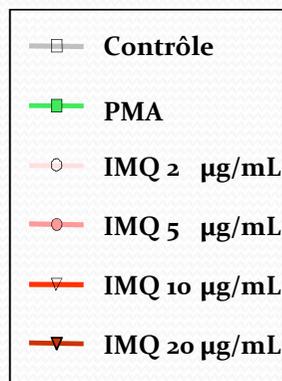
Caractéristiques fonctionnelles?

# Ligands de TLR-7 dans la littérature

- Imidazoquinolines utilisées en topique (Aldara®)
  - Infections à papilloma virus ou herpès
  - Traitement des carcinomes basocellulaires
  - Un cas rapporté de lymphome cutané
- Quelques travaux dans la LLC
  - Spaner et al 2006, Hammadi et al 2008, protection contre l'apoptose à faibles doses
  - Activité proapoptotique dans les basocarcinomes, le mélanome ou les tumeurs vasculaires à plus fortes doses (Schon et al, 2007)
  - Spaner 2006, 2007 : activation cellulaire, augmentation de la sensibilité des cellules de LLC aux lymphocytes cytotoxiques
  - Spaner 2011 : essai thérapeutique de phase I/II, patients agressifs, masse tumorale parfois très importante, probablement sous-dosé

# LLC, TLR-7 et Imiquimod

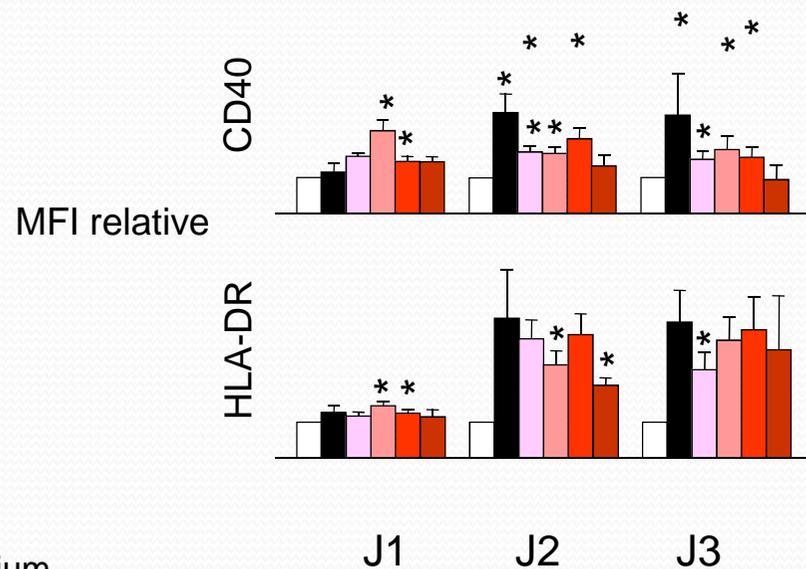
- Mesure de l'apoptose par méthode TUNEL
- Accélération de l'apoptose spontanée à partir de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$



Spaner et al.  
imidazoquinoline, S28690  
+ PMA

# LLC, TLR-7 et Imiquimod

- Activation cellulaire modérée
- Surtout HLA-DR et CD40

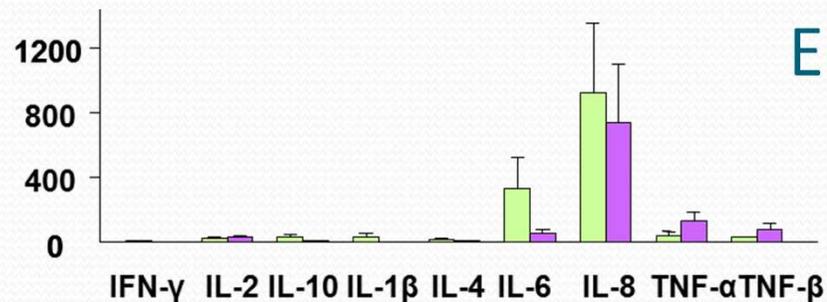


\* P<0.05 versus Medium

Contrôle PMA IMQ 2 µg/mL IMQ 5 µg/mL IMQ 10 µg/mL IMQ 20 µg/mL

# LLC, TLR-7 et Imiquimod

- Autres résultats (Cf. Min Chen)
  - Peu de prolifération cellulaire mesurée en CFSE (Min Chen)
  - Production de cytokines proinflammatoires (Min Chen)
    - Surtout IL-6 et IL-8
    - Concordant avec les quelques résultats de la littérature



En résumé, au-delà de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Activation spécifique

Production de cytokines

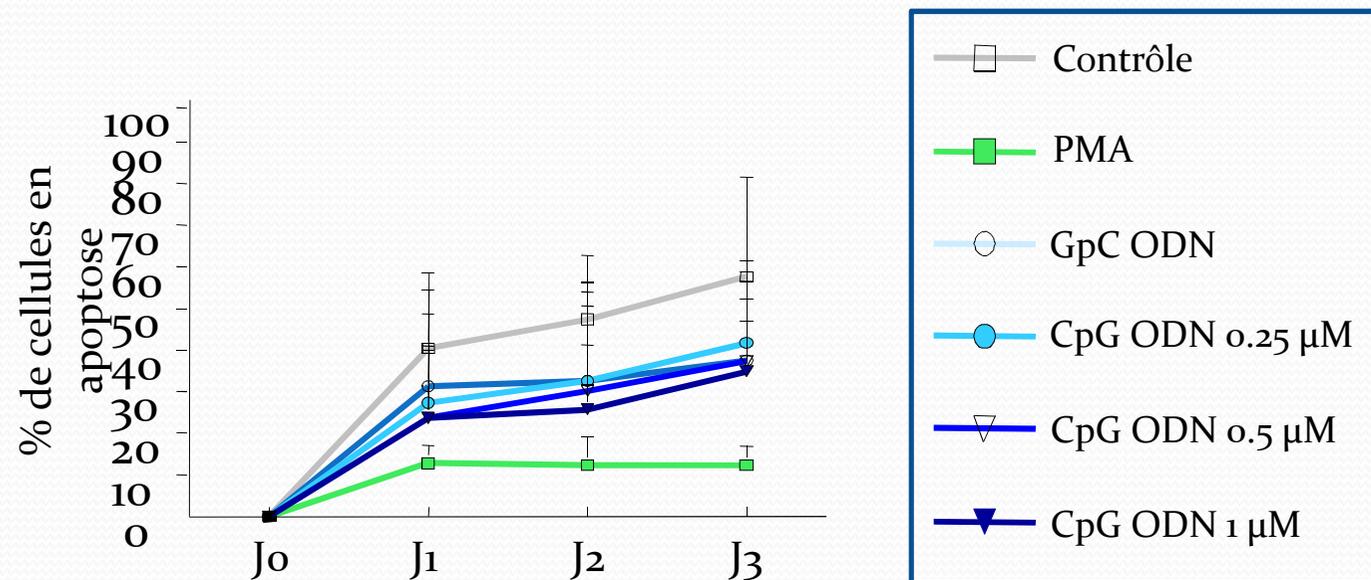
Apoptose rapide

# Ligands de TLR-9 dans la littérature

- Les CpG ODN miment les interactions naturelles entre de l'ADN bactérien et TLR-9
- Ils sont utilisés comme adjuvants de vaccins ou en cytogénétique
- Les ODN CpG de type C combinent les effets des ODN de type B et A : production d'IFN de type I par les cellules dendritiques plasmacytoïdes et activation des cellules B
- Dans la LLC
  - Decker et al. 2000, 2002, prolifération
  - Liang et al., 2010, CpG ODN type B (0.1-10 µg/mL) : apoptose, production d'IL-10

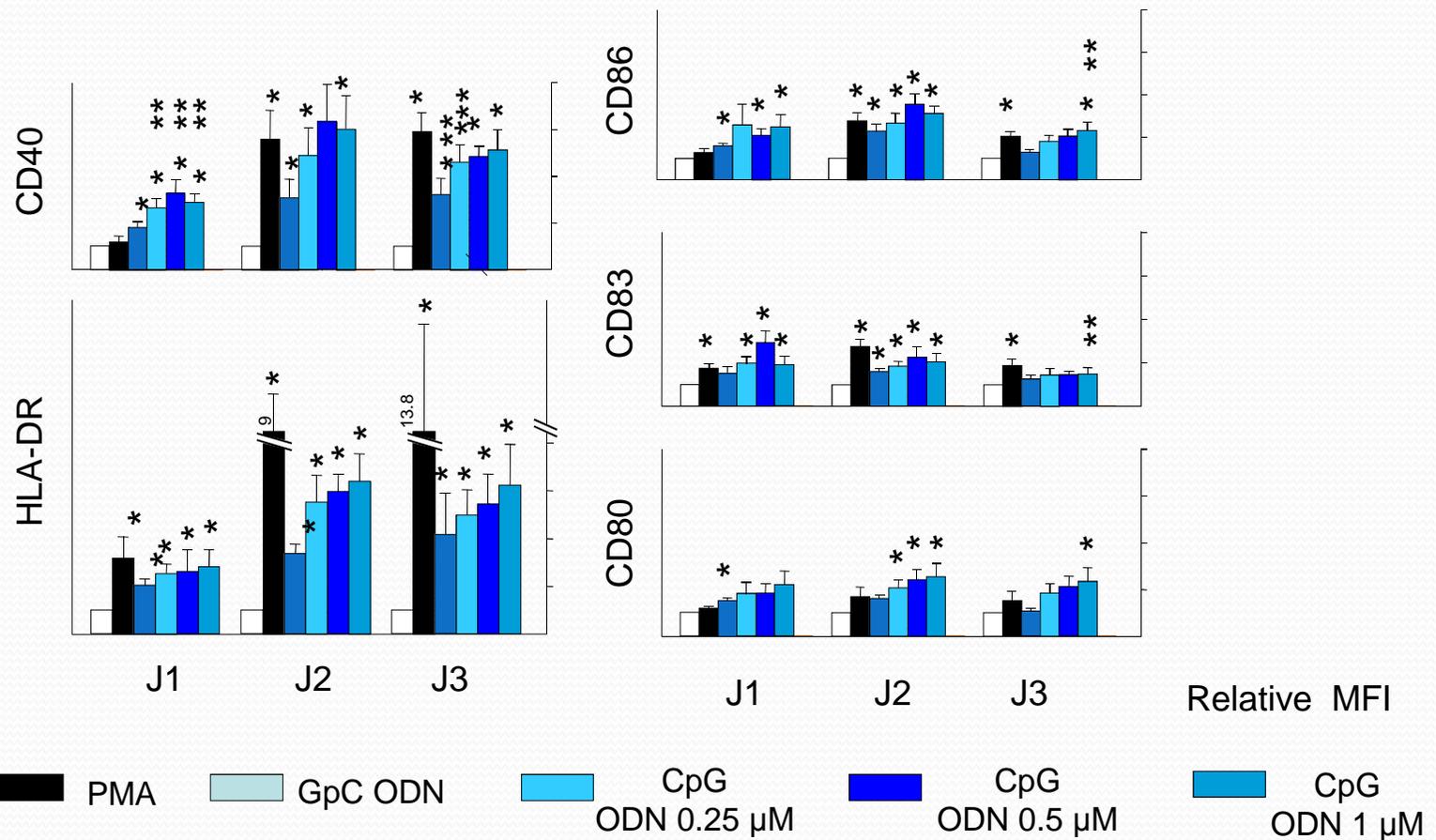
# LLC, TLR-9 et CpG ODN

- Mesure de l'apoptose par méthode TUNEL
- Protection contre l'apoptose spontanée



# LLC, TLR-9 et CpG ODN

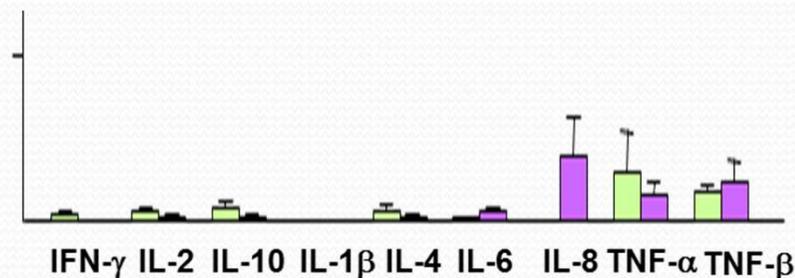
- Activation cellulaire importante



\*,  $P < 0.05$  versus Medium; \*\*,  $P < 0.05$  versus GpC ODN.

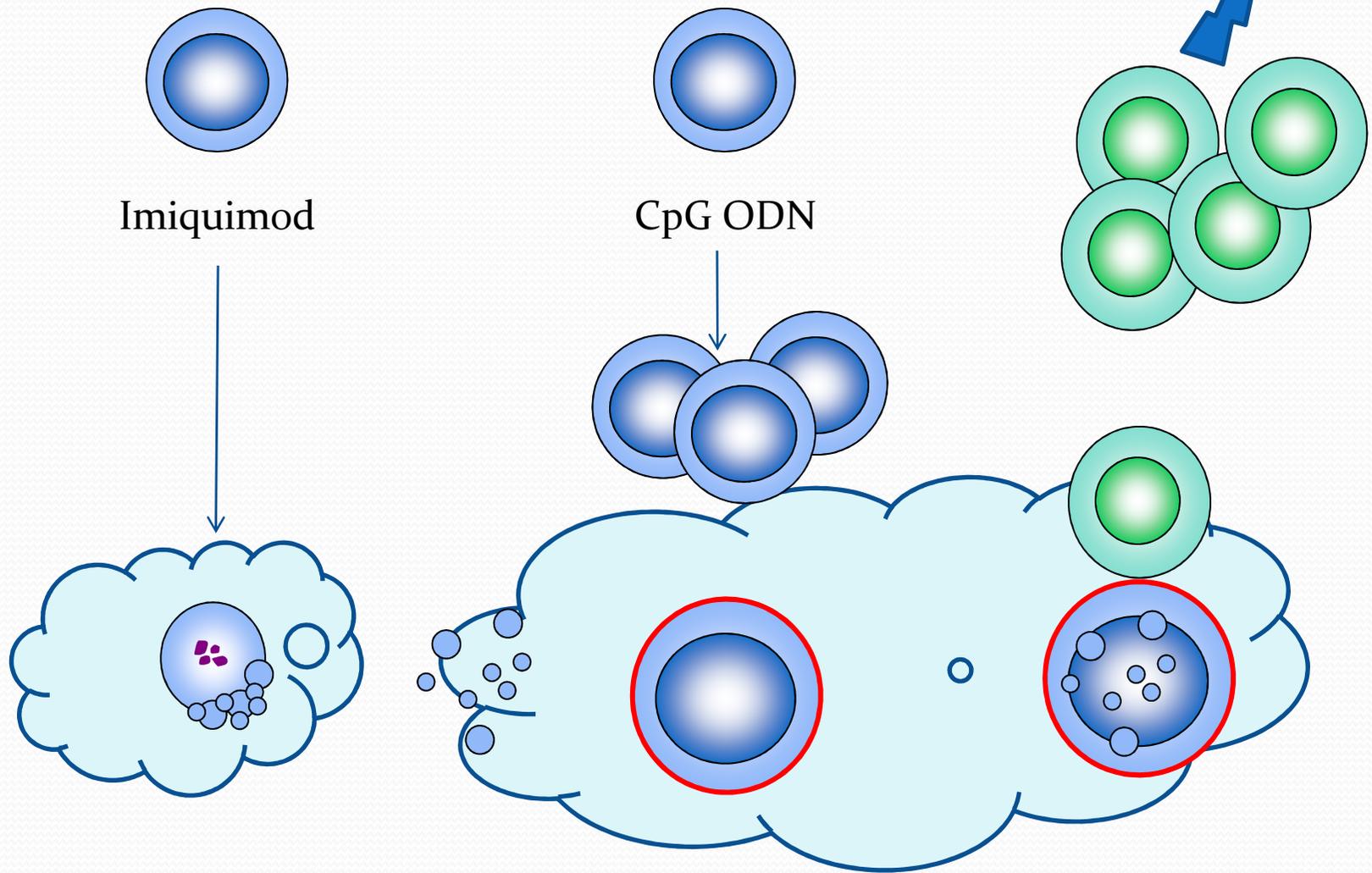
# LLC, TLR-9 et CpG ODN

- Autres résultats (Cf. Min Chen)
  - Prolifération cellulaire mesurée en CFSE
  - Faible production de cytokines (Grandjenette)



En résumé:  
Survie cellulaire  
Activation importante

# Au total





Cindy Grandjennette  
Min Chen

Marcelo de Carvalho Bittencourt  
Gilbert Faure

Pierre Feugier  
Aurore Perrot