

**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

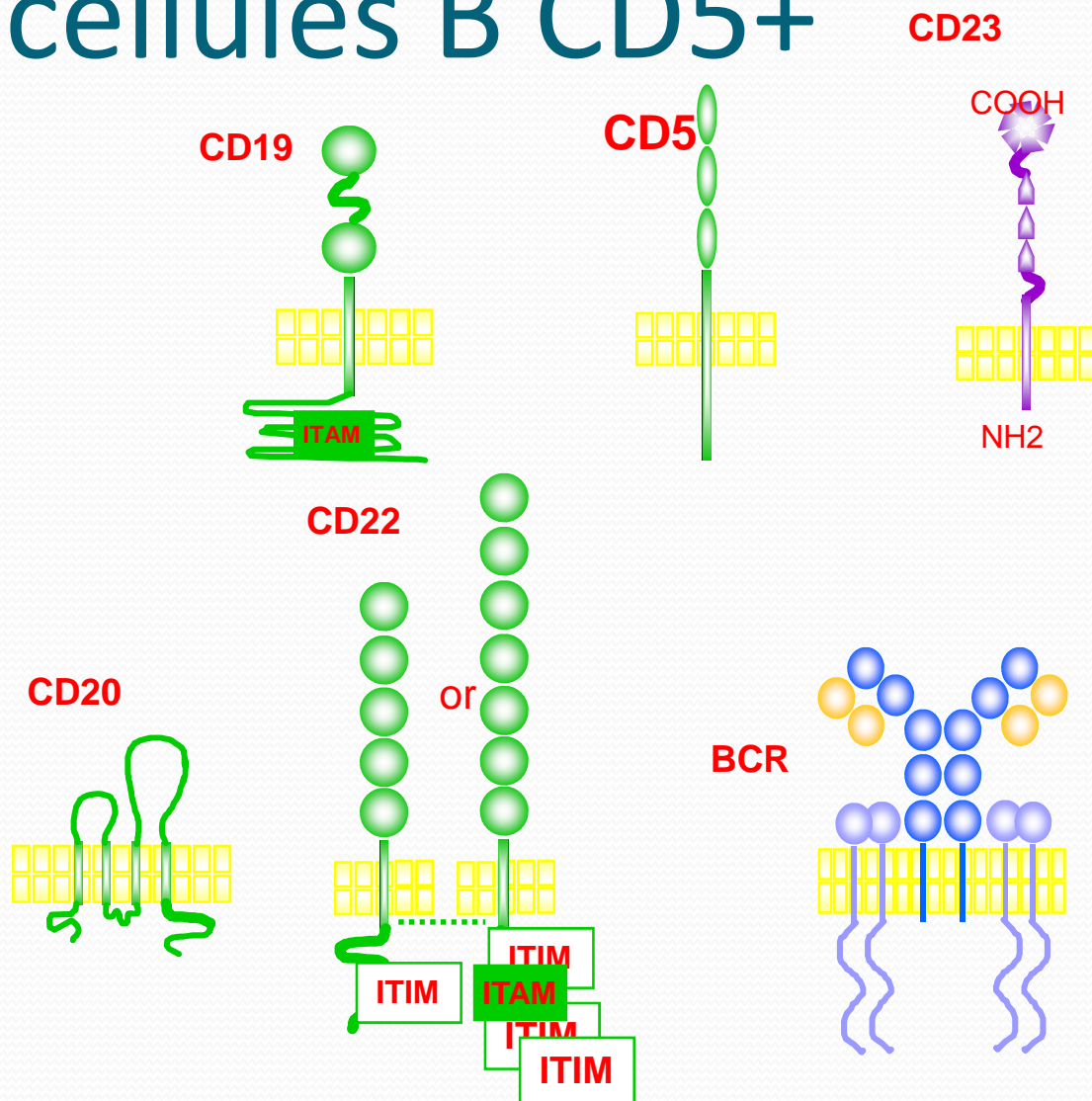
- Basées sur les caractéristiques des cellules B tumorales
- En prenant en compte le caractère clonal de la prolifération : les cellules présentent un idiotope homogène, « signature » de la tumeur
- Hypothèse séduisante d'une vaccination anti-tumorale
 - Ciblant l'idiotope anormal
 - En surmontant le 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

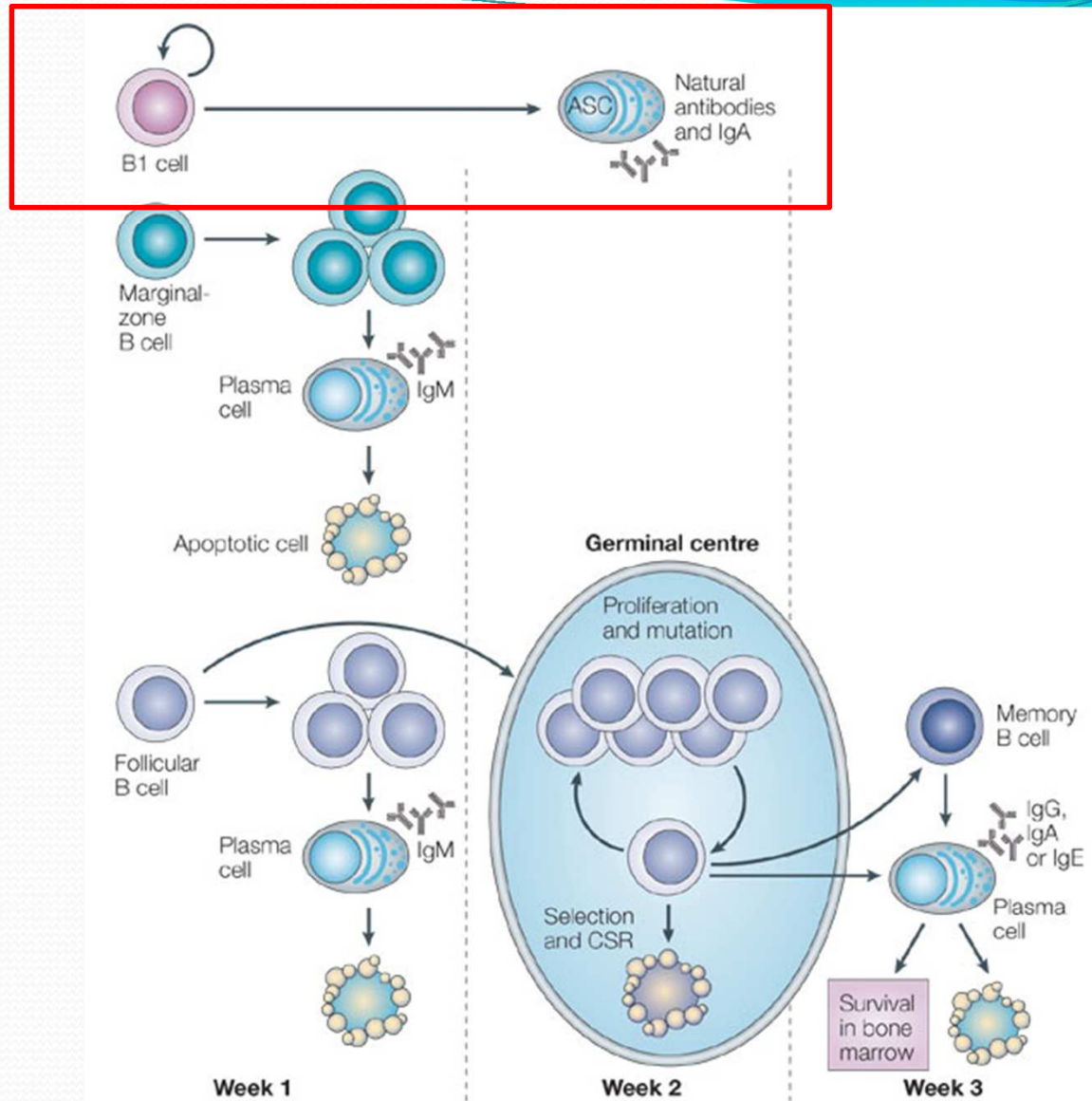
Clone de cellules B CD5+

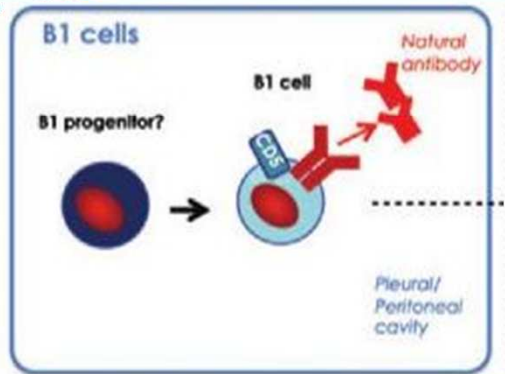
- CD19⁺ CD5⁺
- CD23⁺
- CD20^{lo}
- CD22^{lo/-}
- CD79^{lo/-}
- sIg^{lo/-}



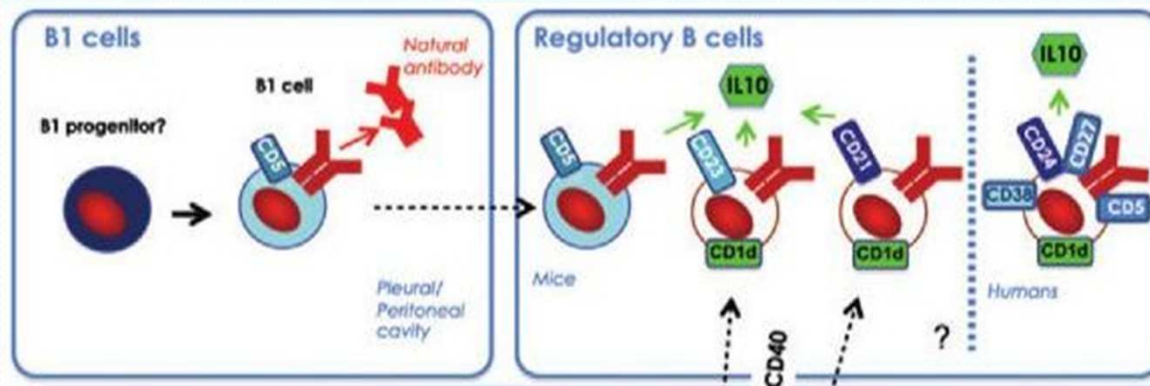
Les cellules de la LLC sont proches des lymphocytes B1

- CD19/CD5/CD23^{+/-}/CD43^{lo}
- 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?*

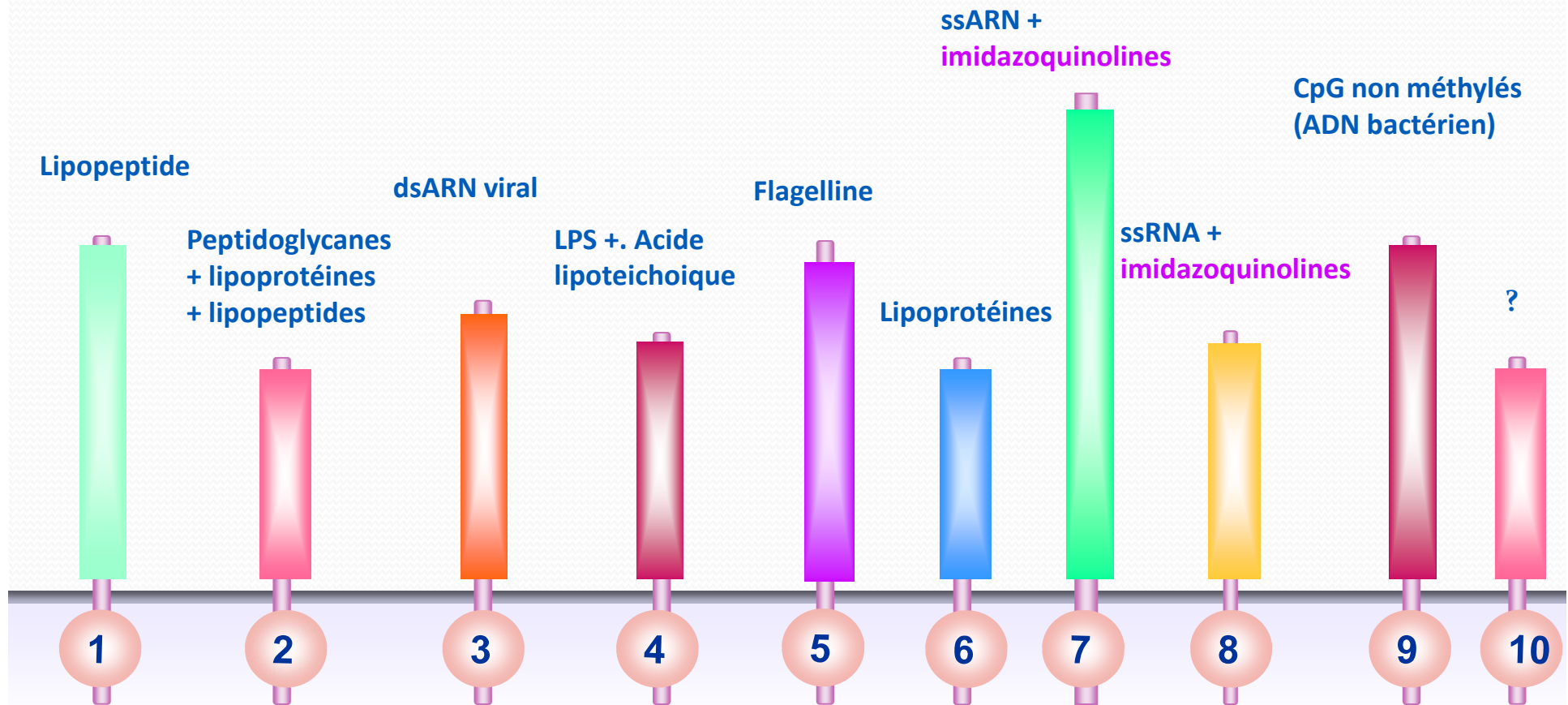
Stimulation T-indépendante

- 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



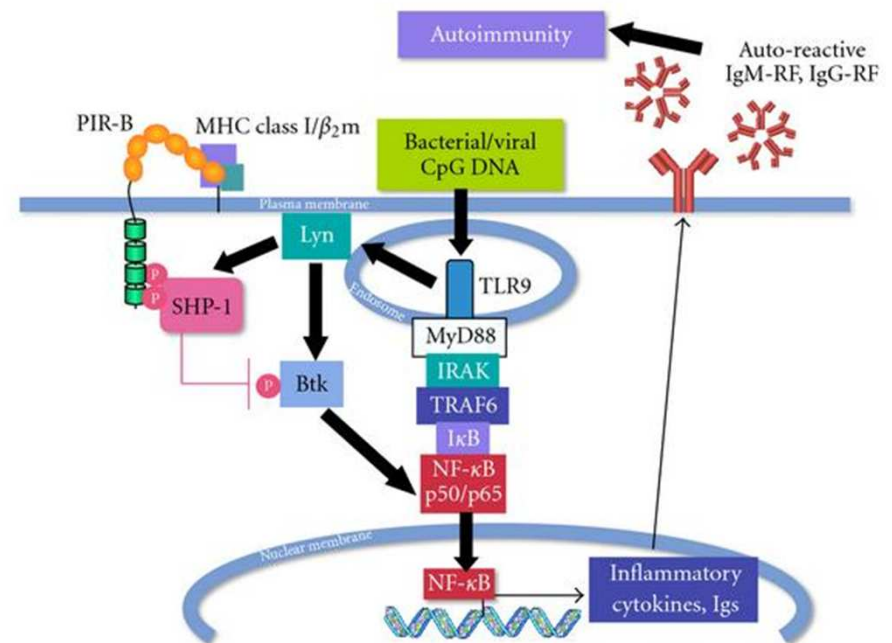
Dix TLRs ont été identifiés chez l'homme

Ils reconnaissent des PAMPs spécifiques



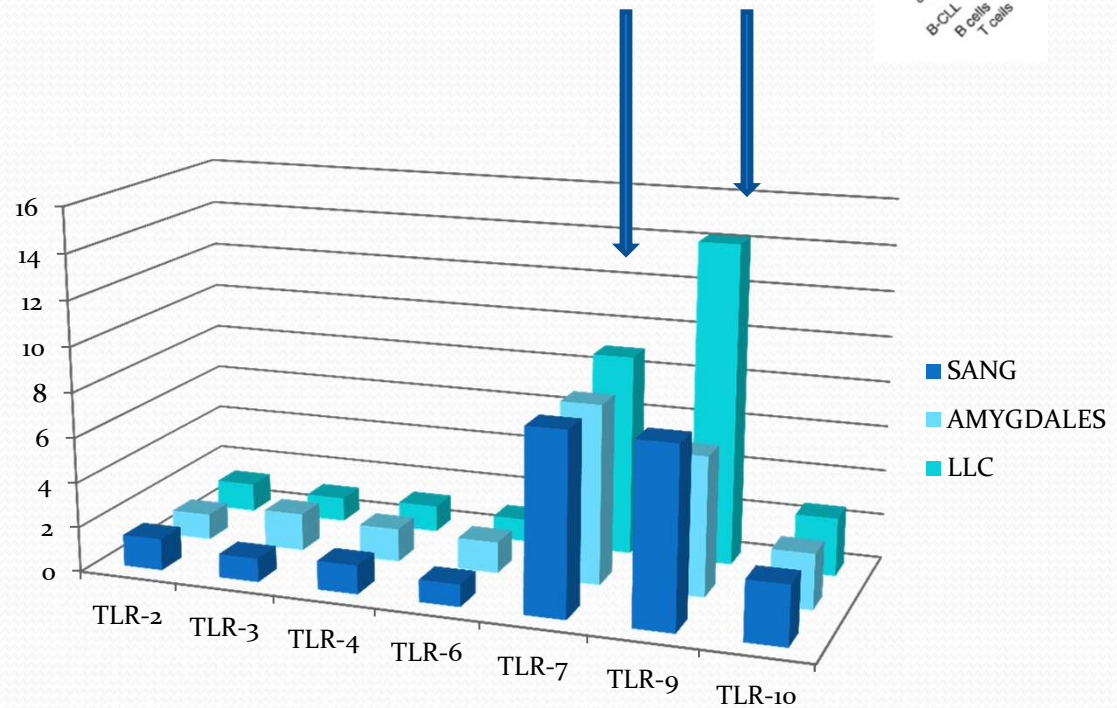
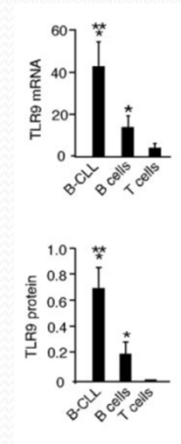
Expression des TLR

- Sur les monocytes/macrophages
- Sur les cellules dendritiques
- Sur les lymphocytes B
 - Lymphocytes B normaux
 - Lymphocytes B₁ ?
 - Lymphocytes B de LLC?

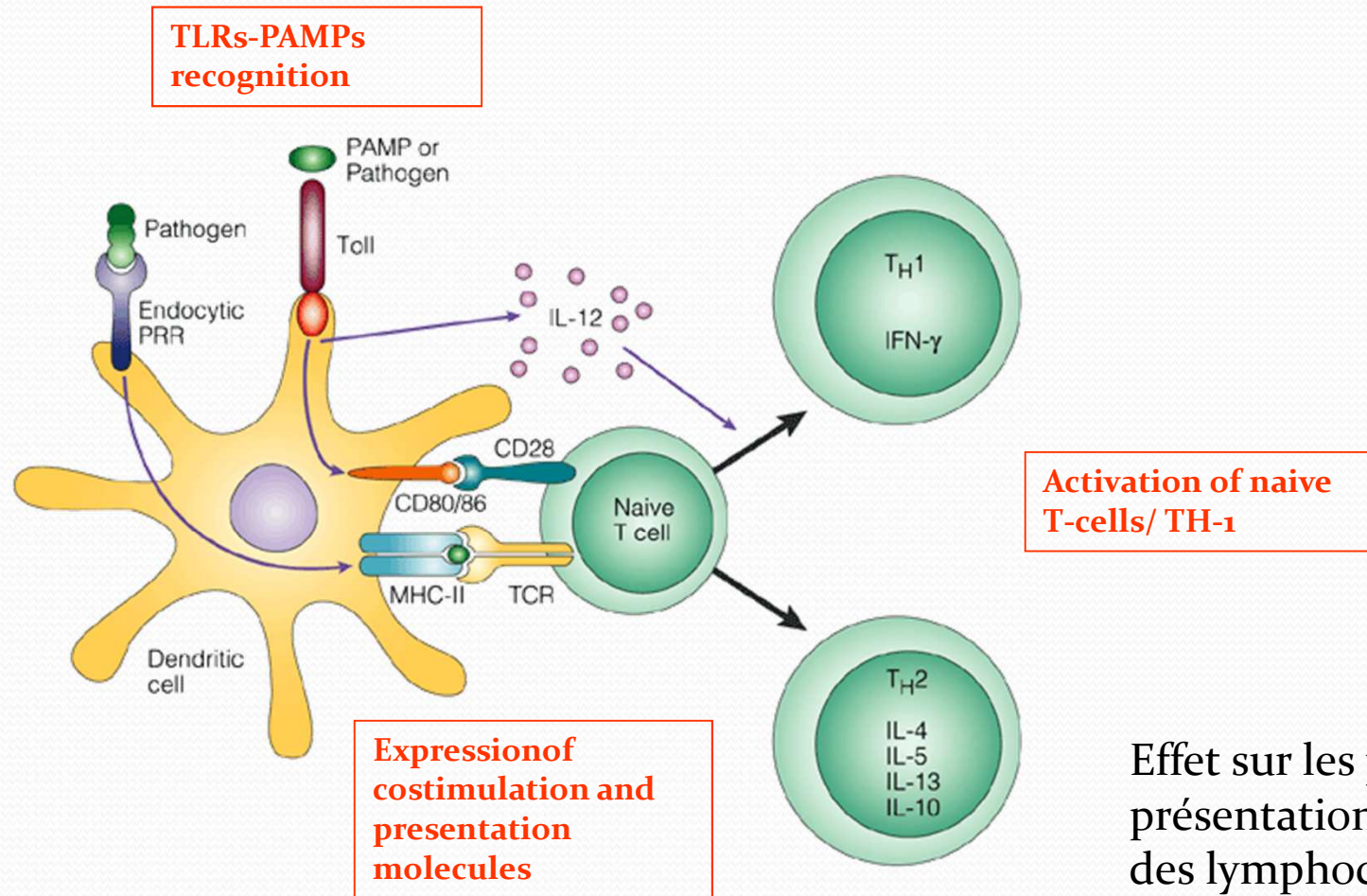


TLR et cellules de LLC

- 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

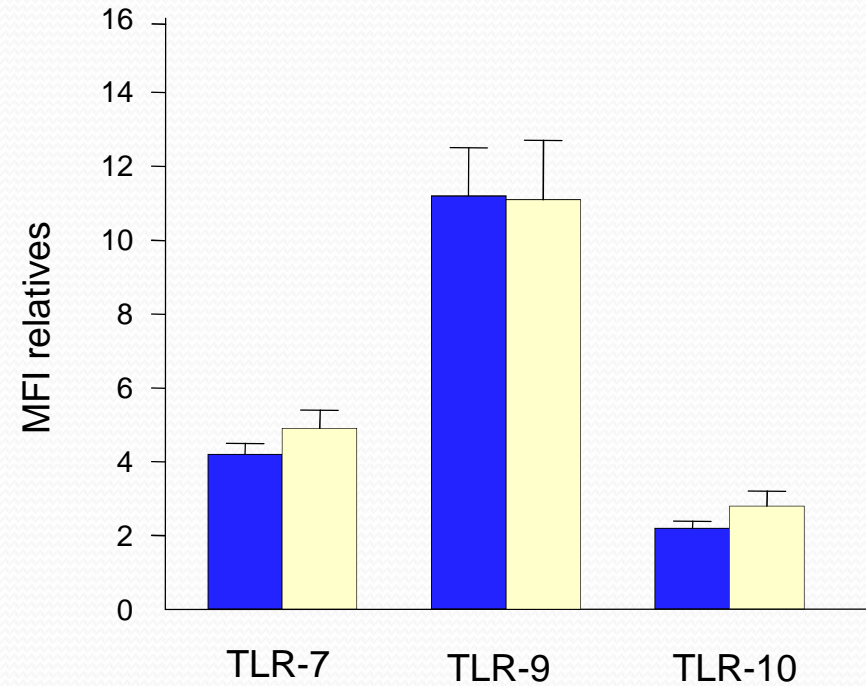
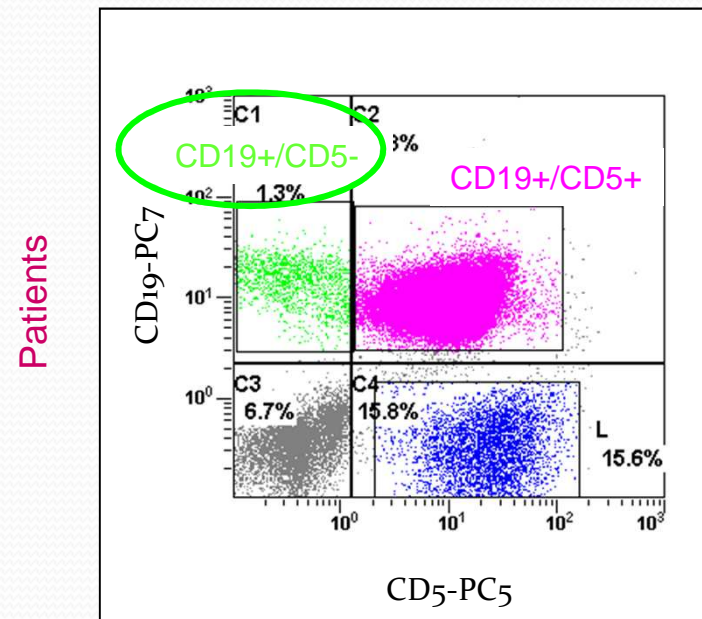
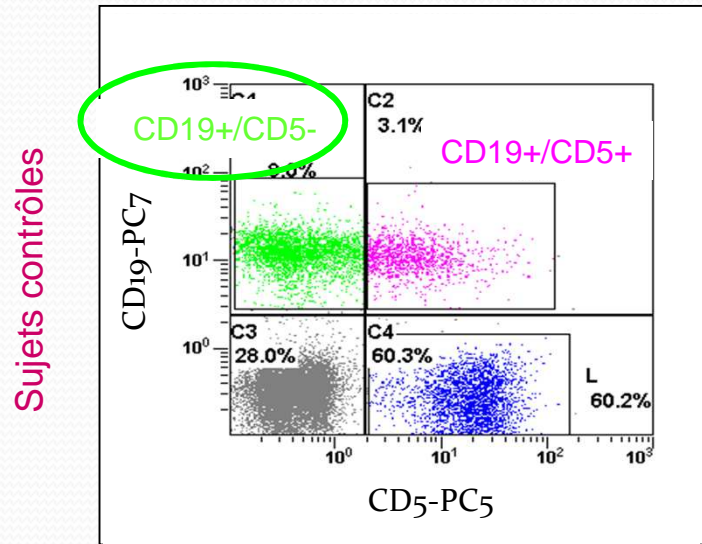


Effet sur les propriétés de présentation des antigènes des lymphocytes B?

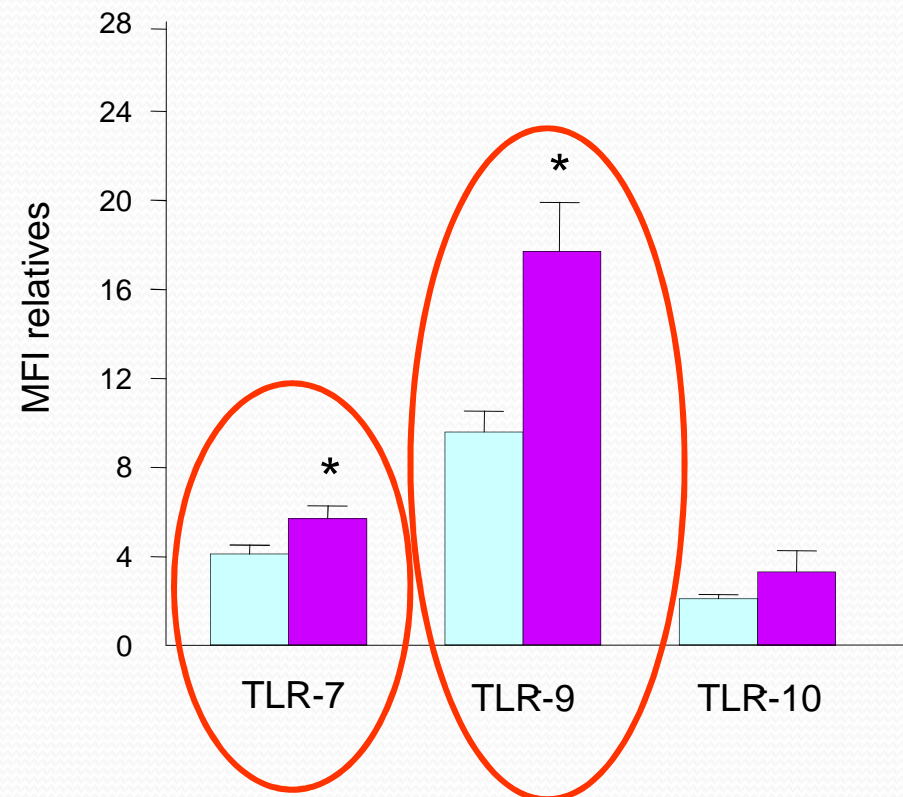
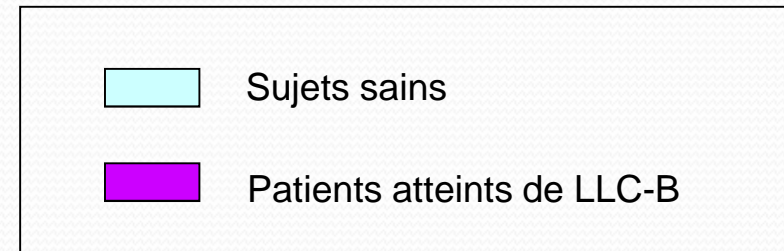
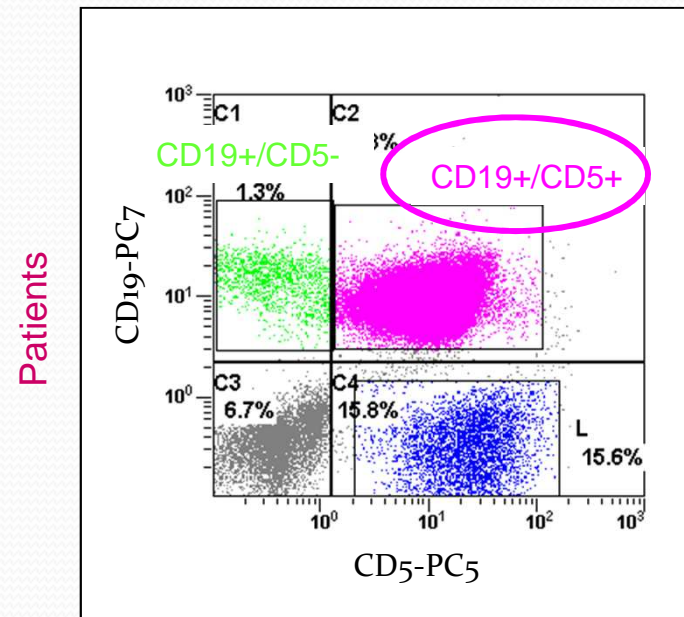
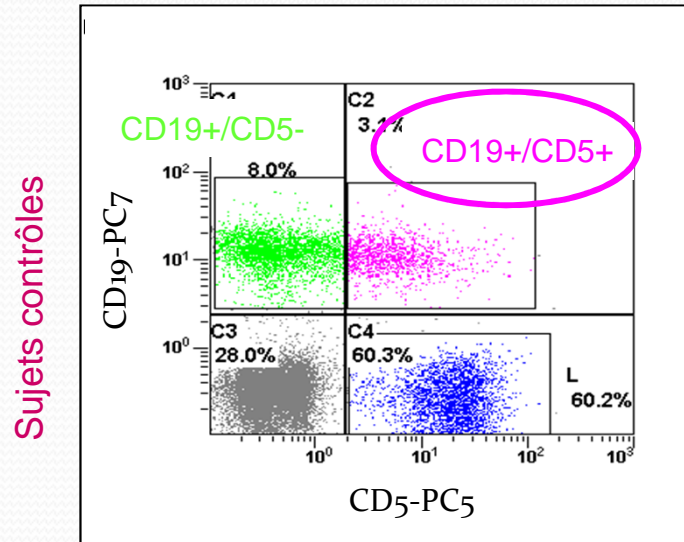
Expression de TLR-7 et TLR-9

- 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?

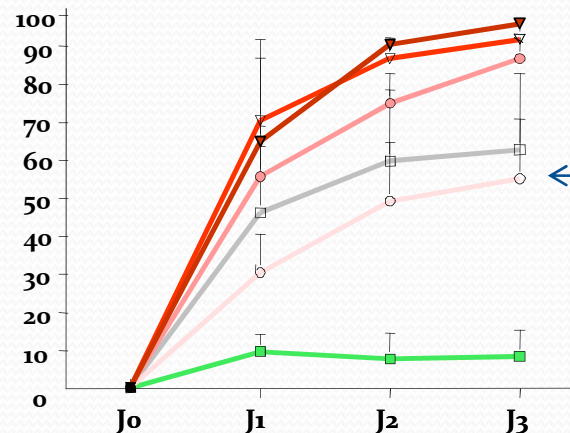
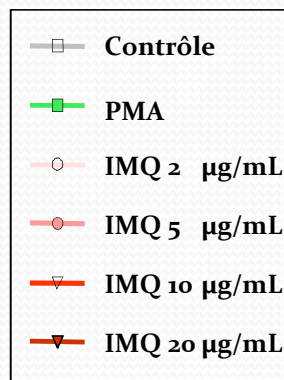
Caractéristiques fonctionnelles?

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

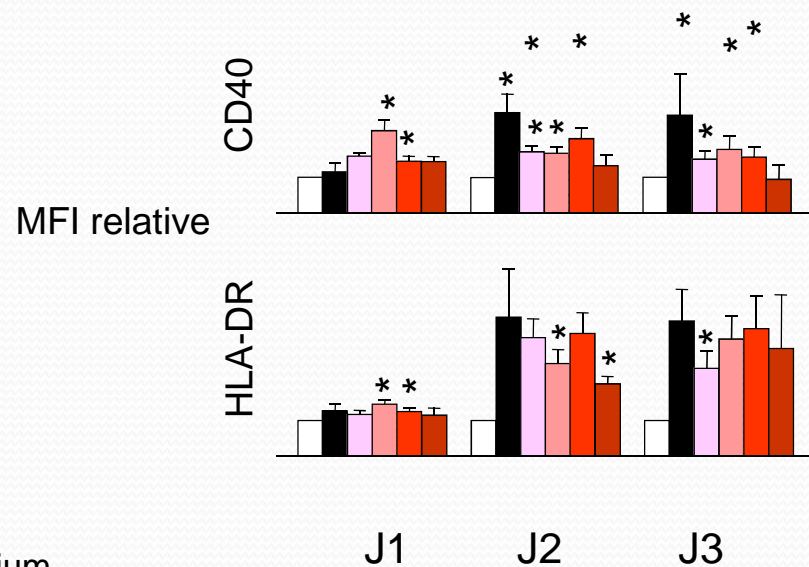
- Mesure de l'apoptose par méthode TUNEL
- Accélération de l'apoptose spontanée à partir de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$



Spaner et al.
imidazoquinoline, S28690
+ PMA

LLC, TLR-7 et Imiquimod

- Activation cellulaire modérée
- Surtout HLA-DR et CD40

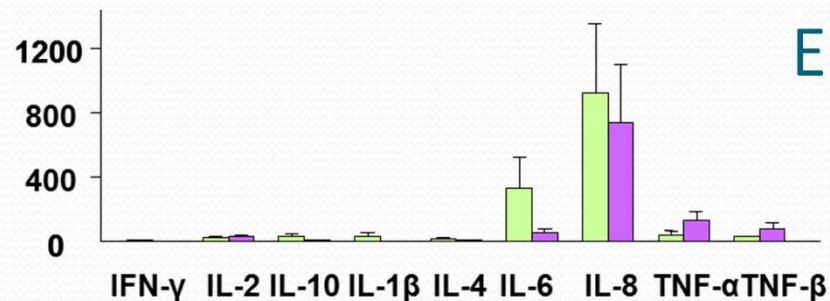


* P<0.05 versus Medium

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

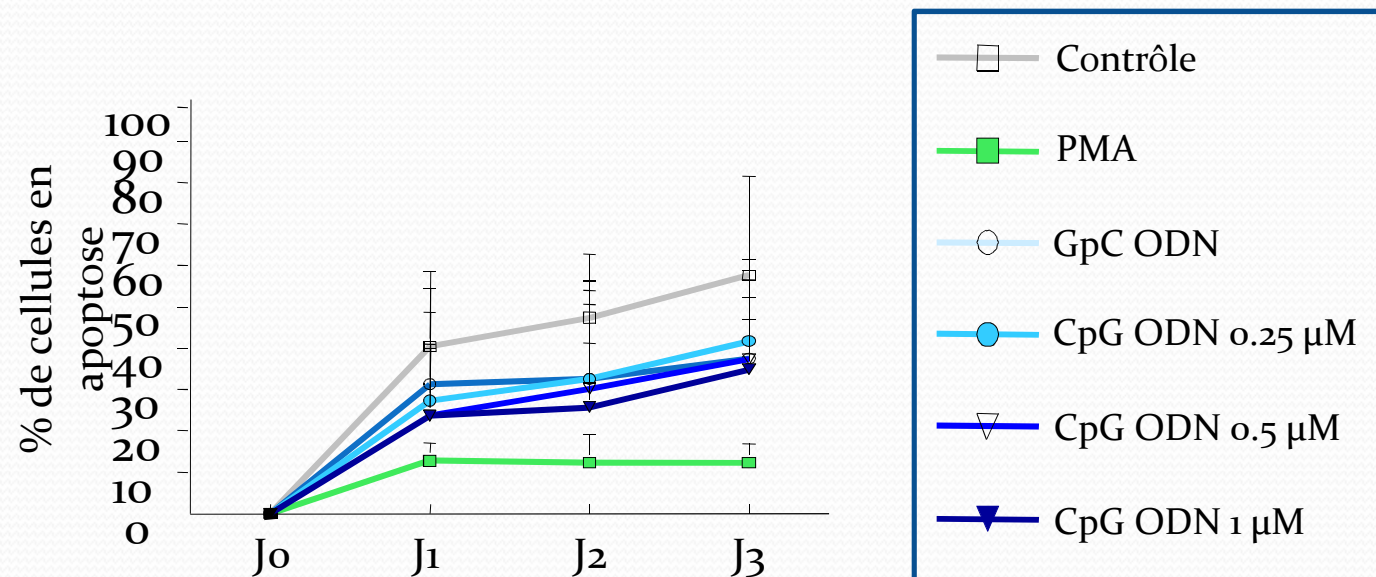
Apoptose rapide

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

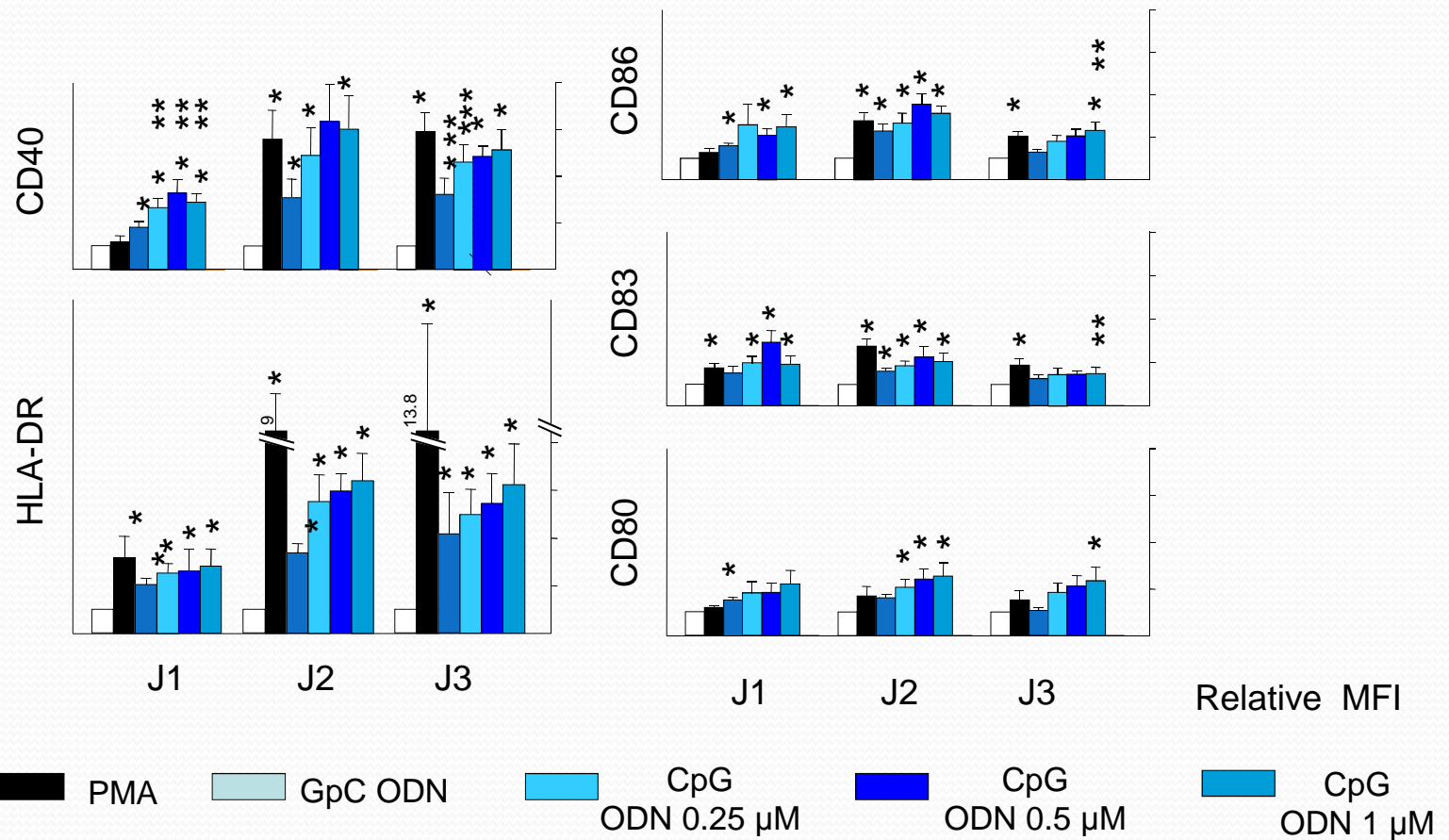
LLC, TLR-9 et CpG ODN

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



LLC, TLR-9 et CpG ODN

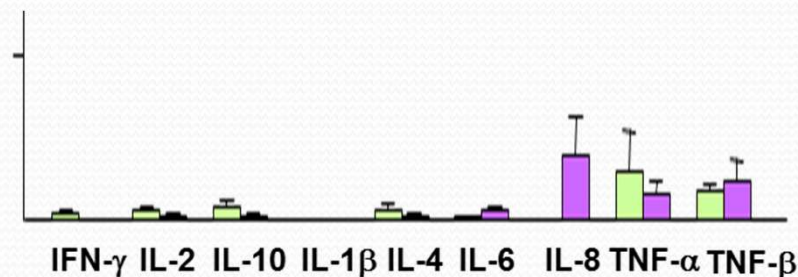
- Activation cellulaire importante



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

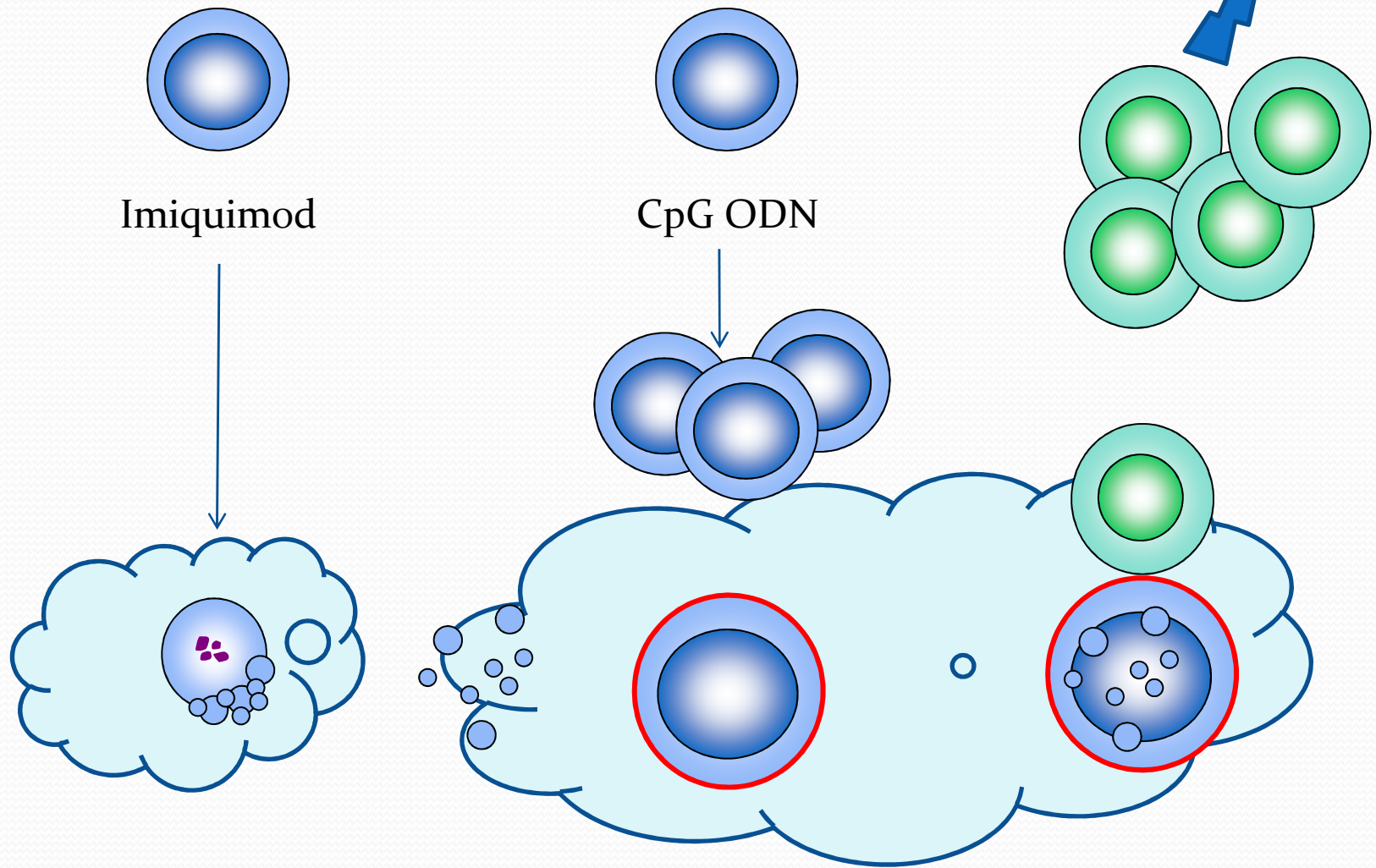
LLC, TLR-9 et CpG ODN

- 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