



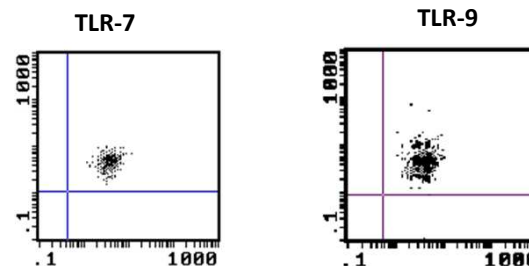
Effets de la stimulation des cellules de leucémie lymphoïde chronique via TLR-7 et TLR-9

Min Chen¹, Marcelo de Carvalho Bittencourt¹, Aurore Perrot², Pierre Feugier², Gilbert C Faure¹, Marie C Béné¹

1. Laboratoire d'Immunologie, CHU de Nancy & EA 4369, Nancy Université , France
2. Service d'Hématologie, CHU de Nancy & EA 4369 , Nancy Université , France

Contexte et objet

- Les lymphocytes B de leucémie lymphoïde chronique (LLC) expriment des Toll-like receptors (TLR)
 - Expression de TLR-7
 - Surexpression de TLR-9



- **Objet:**
Evaluation des effets de la stimulation des lymphocytes B de LLC via les ligands de TLR-7 et TLR-9 :
 - prolifération
 - apoptose
 - modifications immunophénotypiques
 - production de cytokines

Matériel et Méthodes

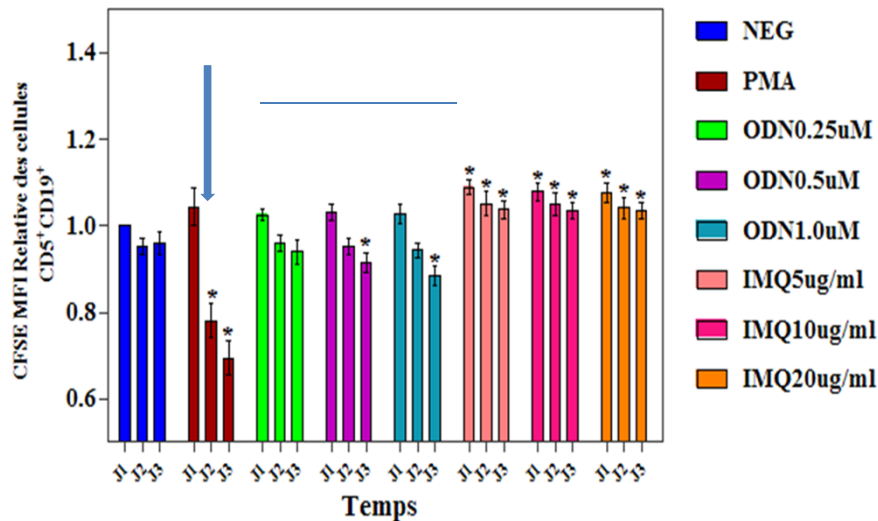
- Prélèvements de sang périphérique de 41 patients atteints de LLC
 - 22 patients stables, 19 patients avec une forme agressive
 - 19 femmes et 22 hommes, moyenne d'âge 68 ans (47-88)
- Stimulation des cellules B tumorales pendant 3 jours via
 - un ligand de TLR-9: ODN M362(CpG-C), dose croissante (0.25, 0.5 et 1uM)
 - un ligand de TLR-7: Imiquimod R837, dose croissante (5, 10 et 20ug/ml)
 - phorbol myristate acetate (PMA) comme contrôle positif
 - milieu seul comme contrôle négatif
- Evaluation de la prolifération par CFSE
- Evaluation de l'apoptose par TUNEL
- Evaluation de l'expression de CD20 et CD52, à l'aide d'un quadruple marquage CD5/CD19/CD20/CD52
- Dosage des cytokines en cytométrie de flux (ELISA sur billes)

Mesure de la prolifération

La PMA
et l'ODN (stimulation de TLR9)
induisent une prolifération (diminution de la fluorescence CFSE)
Elle est plus marquée pour l'ODN dans les formes agressives

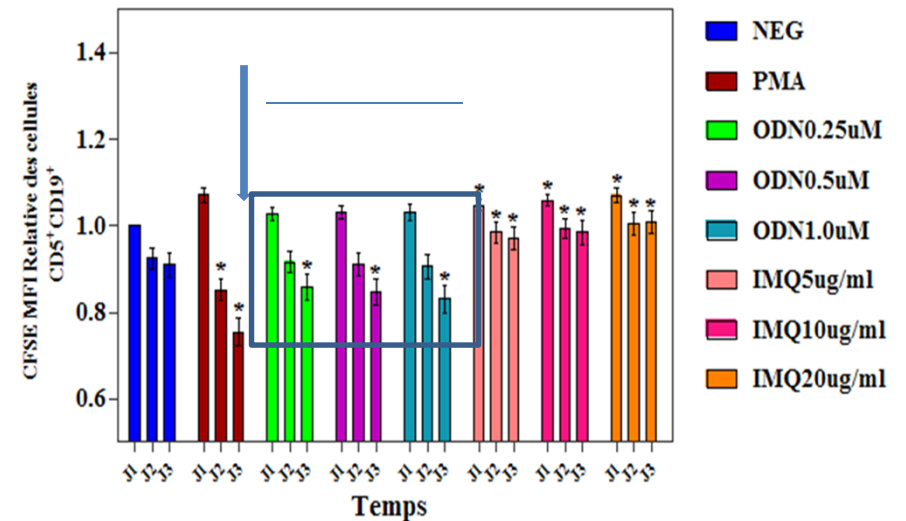
Patients stables

CFSE



Patients présentant une forme agressive

CFSE

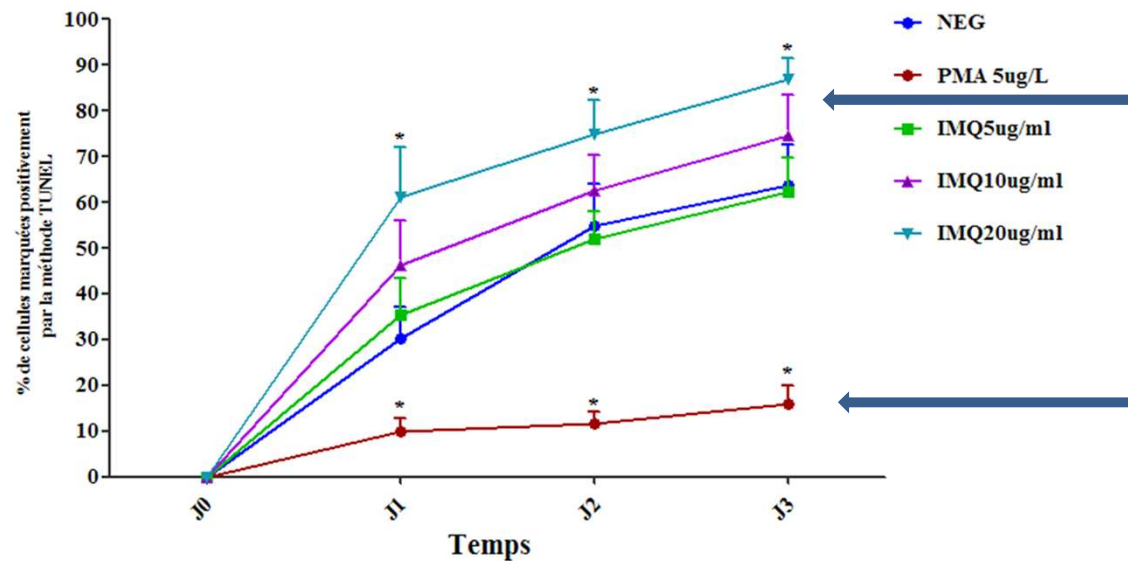


*p <0.05, par rapport au contrôle négatif du même jour (T test apparié)

Mesure de l'apoptose (méthode TUNEL)

- La PMA protège les cellules de l'apoptose
- L'Imiquimod R837 induit une apoptose rapide et importante des cellules de LLC, de façon dose et temps dépendante.

Apoptose des cellules de B-CLL stimulées via TLR-7



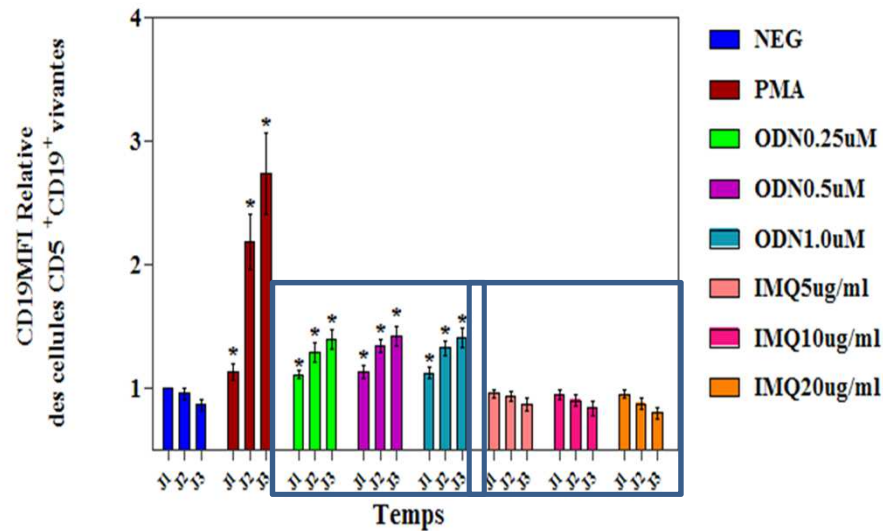
*p < 0.05, par rapport au contrôle négatif du même jour (T test apparié)

Modulation de l'expression de CD19

L'ODN induit une agmentation significative de l'expression de CD19
 L'imiquimod induit plutôt une diminution chez les patients stables

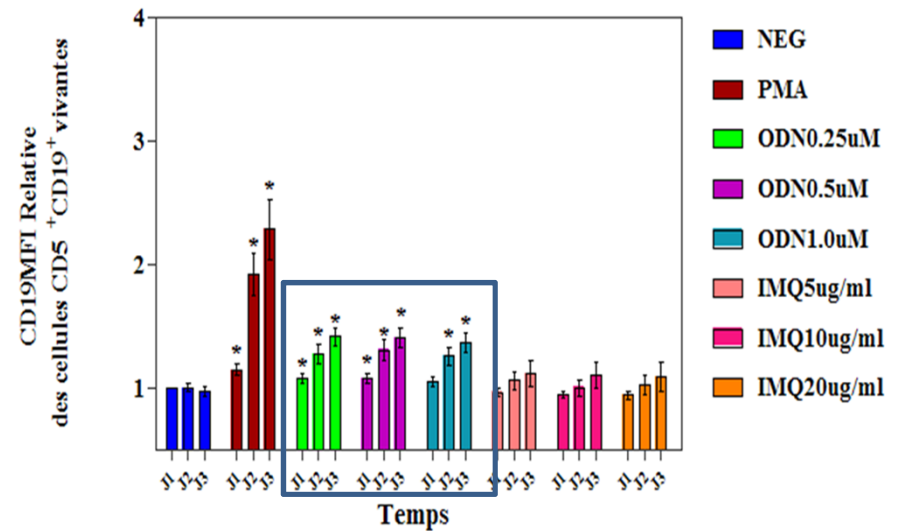
Patients stables

CD19



Patients présentant une forme agressive

CD19

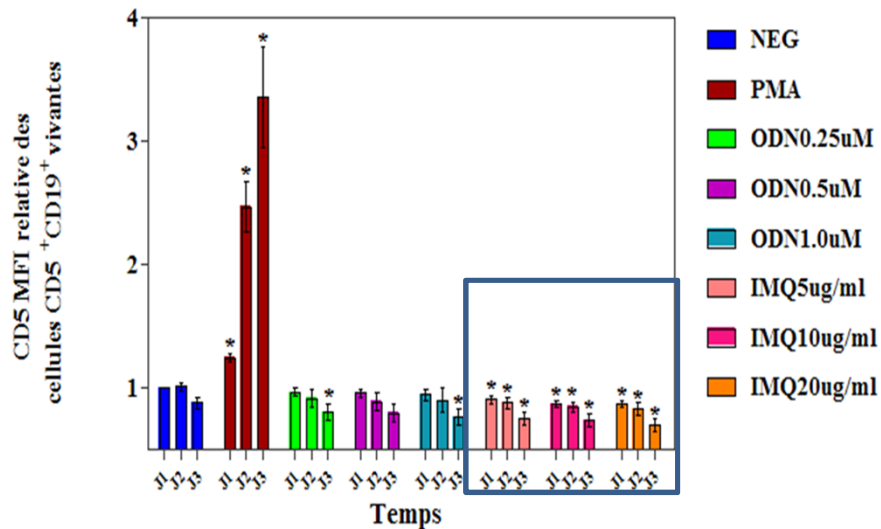


*p < 0.05, par rapport au contrôle négatif du même jour (T test apparié)

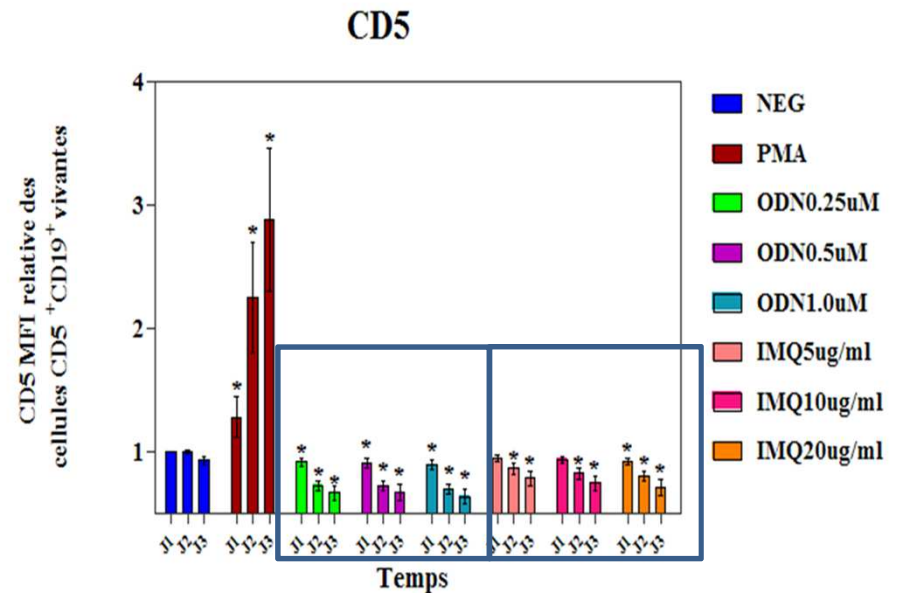
Modulation de l'expression de CD5

L'ODN diminue l'expression de CD5 surtout pour les patients avec une forme agressive
L'IMQ diminue l'expression de CD5

Patients stables CD5



Patients présentant une forme agressive CD5

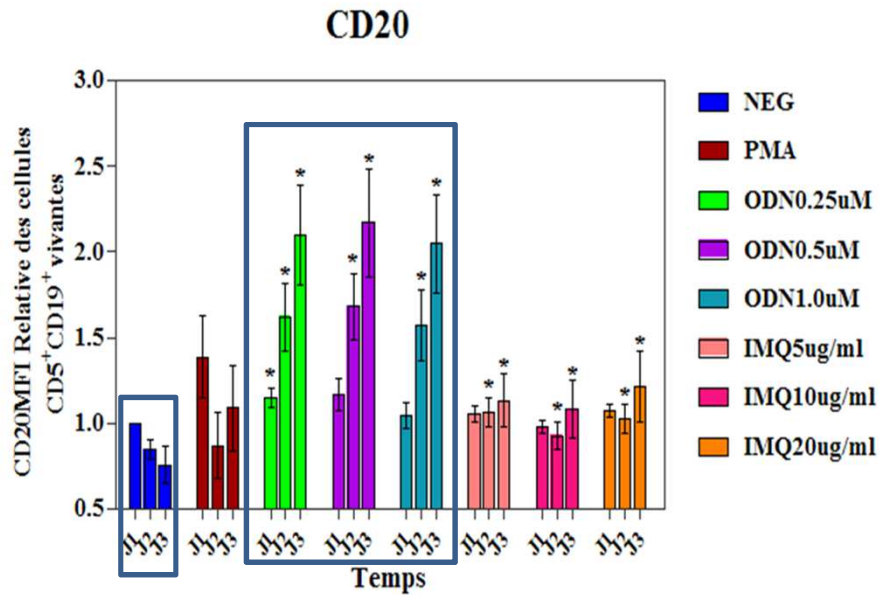


*p < 0.05, par rapport au contrôle négatif du même jour (T test apparié)

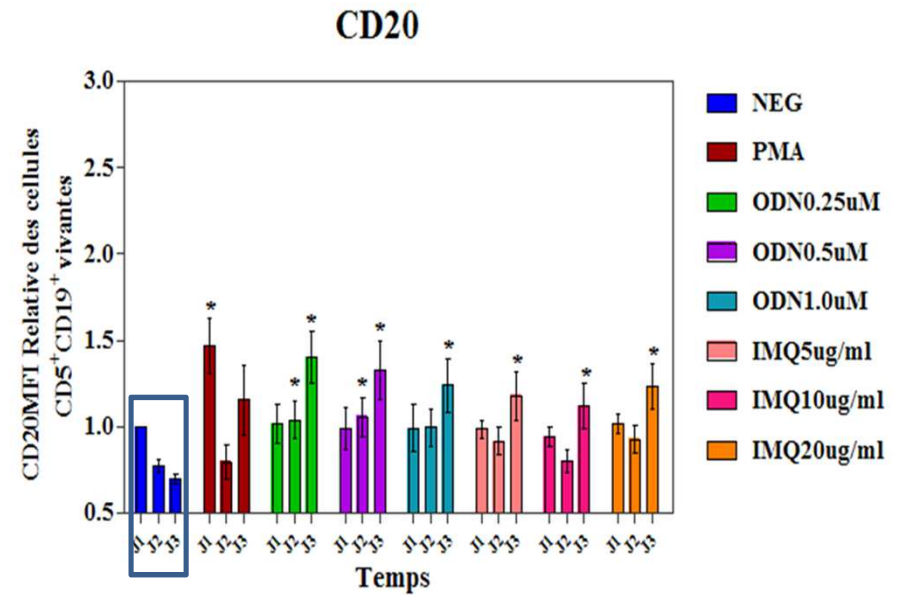
Modulation de l'expression de CD20

Imiquimod et ODN évitent la down-modulation de CD20
 L'ODN induit une augmentation importante de l'expression de CD20 pour les patients stables

Patients stables



Patients présentant une forme agressive



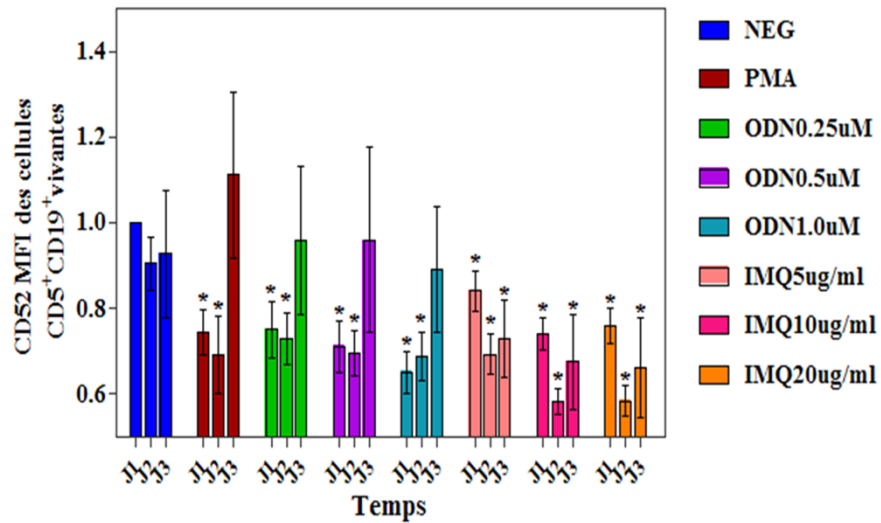
*p < 0.05, ar rapport au contrôle négatif du même jour (T test apparié)

Modulation de l'expression de CD52

ODN et Imiquimod induisent une diminution importante de l'expression de CD52
Surtout chez les patients à forme agressive

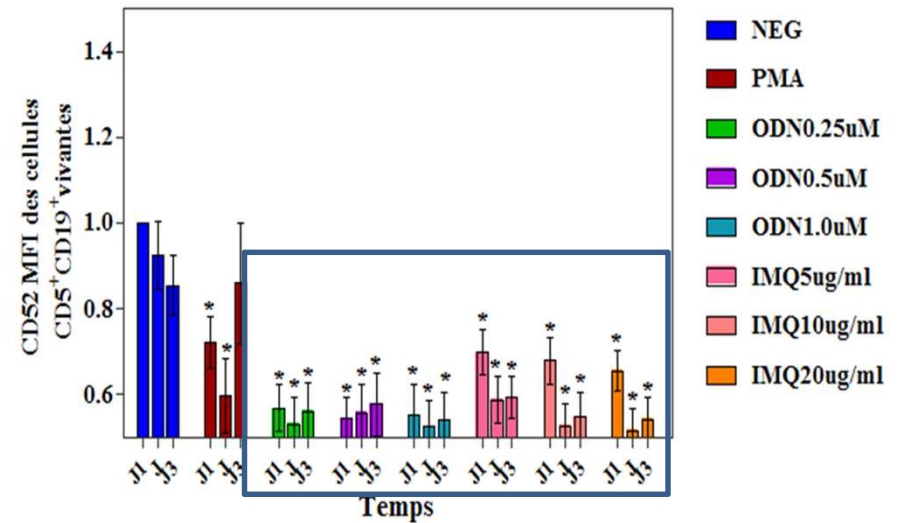
Patients stables

CD52



Patients présentant une forme agressive

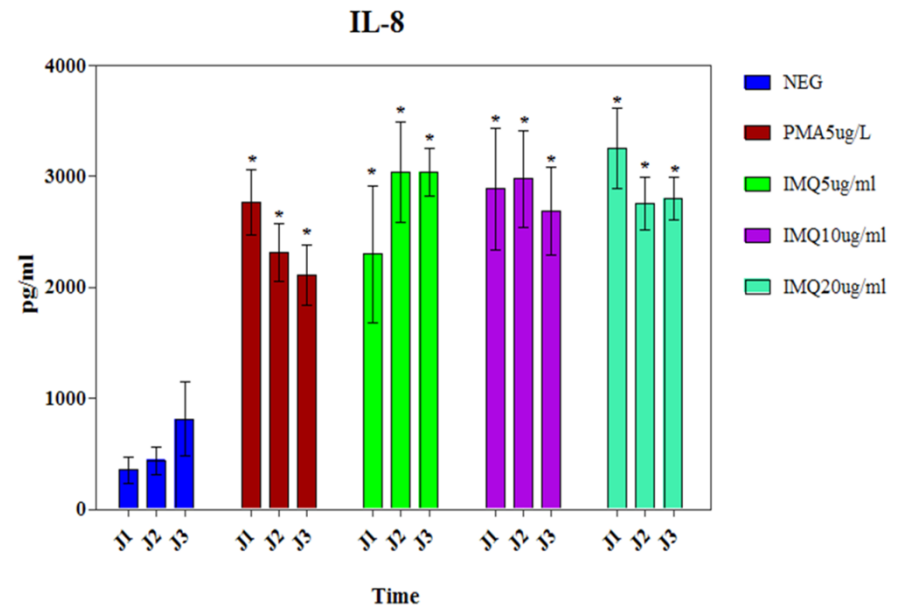
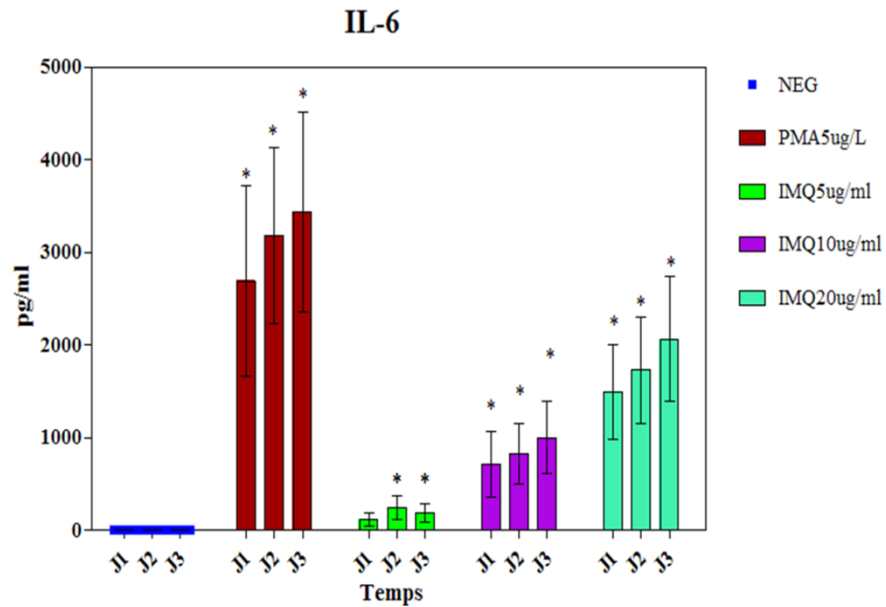
CD52



*p < 0.05, par rapport au contrôle négatif du même jour (T test apparié)

Mesure de la production de cytokines

Evaluée sur une série de patients stables stimulés par Imiquimod R837
Production importante de cytokines proinflammatoires, IL6 et IL8



*p < 0.05, par rapport au contrôle négatif du même jour (T test apparié)

Conclusions

- Ces résultats montrent que les TLR sont actifs et répondent à leurs ligands sur les cellules de LLC
- L'ODN peut induire la prolifération des cellules tumorales, surtout pour les patients avec une forme agressive
- L'ODN induit une augmentation de l'expression de CD19 et de CD20, de façon temps dépendante
- L'Imiquimod induit une apoptose des cellules tumorales , une augmentation de l'expression de CD20 et, chez les patients stables, la production des cytokines IL-6 et IL-8
- L'ODN et Imiquimod induisent une diminution de l'expression de CD52
- **Ceci suggère que l'Imiquimod et l'ODN pourraient entrer dans une stratégie d'immunothérapie adjuvante pour les patients atteints de LLC.**

MERCI DE VOTRE ATTENTION