



CENTRE HOSPITALIER
UNIVERSITAIRE DE REIMS



UNIVERSITE DE REIMS
CHAMPAGNE-ARDENNE

Leucémie lymphoïde chronique : actualités physiopathologiques

Alain DELMER
Hématologie Clinique
CHU de Reims

12^{ème} Congrès Maghrébin d'Hématologie
Hammamet - 29 et 30 mai 2015



La leucémie lymphoïde chronique en 2015 (1)

- **nombreuses avancées dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de progression tumorale** : anomalies génétiques, sélection clonale, signalisation du BCR, rôle du microenvironnement, ...
- une **maladie toujours incurable** ... mais faudra-t-il toujours chercher à l'éradiquer ? *(si les nouveaux agents sont capables de la contrôler de façon durable)*
- une **maladie du sujet âgé** potentiellement fragile (comorbidités) → traitements agressifs non réalisables → stratégies moins toxiques éventuellement sans chimiothérapie (mais le « chemo-free » n'est pas obligatoirement synonyme de « toxicity-free »)
- un **standard de traitement de 1^{ère} ligne pour les sujets « fit »** (à la condition qu'il n'existe pas de caractéristiques génétiques défavorables)
- **moins de consensus pour les patients « unfit »** mais (peut-être) néanmoins un nouveau standard
- **de nouveaux agents interagissant avec la signalisation du BCR** (inhibiteurs de BTK et de PI3K) **ou inhibant BCL2 très prometteurs** et dont il va falloir définir les meilleures modalités d'utilisation (timing, associations, ...)

Hémopathies malignes □ incidence en France (année 2012)

Hémopathie maligne	Codes morphologiques CIM-O-3	Nombre de cas incidents estimés en France en 2012			Médiane d'âge au diagnostic (années)		Taux d'incidence brut en France en 2012*		Taux d'incidence standardisé en France en 2012 **		Sexe-ratio H/F
		Total	H	F	H	F	H	F	H	F	
Lymphome de Hodgkin classique											
Lymphome de Hodgkin classique	96503 à 96553, 96613 à 96673	1 880	1 033	847	42	32	3,3	2,6	3,0	2,7	1,1
Lymphomes non hodgkiniens											
Leucémie lymphoïde chronique / lymphome lymphocytaire	96703, 98233	4 464	2 696	1 768	71	74	8,7	5,4	4,4	2,2	2,0
Lymphome folliculaire	(≥96903 & ≤96983)	2 530	1 303	1 227	64	66	4,2	3,7	2,5	2,1	1,2
Lymphome diffus à grandes cellules B	96783, 96793, 96803, 96843	4 096	2 463	1 633	69	74	8,0	5,0	4,5	2,2	2,0
Lymphome du manteau	96733	659	491	168	74	74	1,6	0,5	0,8	0,2	4,0
Lymphome de la zone marginale	96893, 96993, 97643	1 772	866	906	70	74	2,8	2,8	1,5	1,2	1,3
Myélome multiple & plasmocytome	(≥97313 & ≤97343)	4 888	2 561	2 327	72	75	8,3	7,1	4,2	2,9	1,4
Lymphome lymphoplasmocytaire / macroglobulinémie de Waldenström	97613, 96713	1 247	800	447	73	74	2,6	1,4	1,3	0,6	2,2
Lymphome T/NK à cellules matures	(≥97003 & ≤97193) ou {97683, 98273, 98313, 98323, 98343, 99483}	1 419	870	549	67	66	2,8	1,7	1,7	1,0	1,7

LLC □ actualités physiopathologiques

- **Défaut d'apoptose mais aussi (et surtout) potentiel prolifératif**
- **Rôle majeur du récepteur B à l'antigène (BCR) et de sa signalisation**
- **LLC : une maladie secondaire à la stimulation antigénique**
- **Importance cruciale du microenvironnement pour promouvoir la survie de la cellule tumorale de LLC**
- **Épuisement des lymphocytes T**
- **Anomalies génétiques (à l'ère du séquençage haut débit)**
 - nouvelles mutations
 - sélection clonale

Défaut d'apoptose mais aussi potentiel prolifératif

- histologie ganglionnaire : centres de prolifération (LLC « pseudo-folliculaire »)
- études cinétiques ^(1,2)
 - détermination *in vivo* de la synthèse ADN et de la prolifération des cellules de LLC (eau deutériée) → renouvellement quotidien important ($\approx 1\%$) chez les patients évolutifs (plus important chez les patients avec IGVH non mutées)
 - évolution plus défavorable si taux de naissance cellulaire $> 0.35\%$
 - fraction CD38(+) enrichie en cellules proliférantes
 - études cinétiques utilisées récemment pour évaluer efficacité de l'ibrutinib ⁽³⁾: pas de nouveau marquage, mort cellulaire évaluée à 1.48% du clone par jour
- existence au sein du clone LLC d'une sous-population proliférative surexprimant des gènes pro-survie et anti-apoptotiques ⁽⁴⁾

(1) Messmer et al., 2005

(2) Damle et al., 2006

(3) Burger et al, ASH 2014

(4) Callissano et al. 2011

Ibrutinib □ LLC □ augmentation de la lymphocytose

- **Kinetics of CLL cells in tissues and blood during therapy with the BTK inhibitor ibrutinib**

Wodarz D et al., Blood 2014, 123: 4132-5

Étude dynamique □ $1.7\% \pm 1.1\%$ des lymphocytes sanguins et $2.7\% \pm 0.99\%$ des lymphocytes tissulaires meurent chaque jour □ Fraction de lymphocytes tissulaires redistribués vers le sang estimée à $23.3\% \pm 17\%$ de la masse tumorale tissulaire totale durant le traitement □ Réduction du volume tumoral plus liée à la mort des cellules tumorales qu'à leur redistribution vers le sang.

- **Ibrutinib-induced lymphocytosis in patients with chronic lymphocytic leukemia : correlative analyses from a phase II study**

Herman SE et al., Leukemia 2014, 28: 2188-96

Augmentation moyenne de 66% du taux de lymphocytes □ Survenue rapide (pic dans les 24 heures suivant la première dose dans 40% des cas □ Expression accrue de CD38 et de Ki67 au niveau des lymphocytes circulants dès J2 (efflux à partir du compartiment tissulaire)

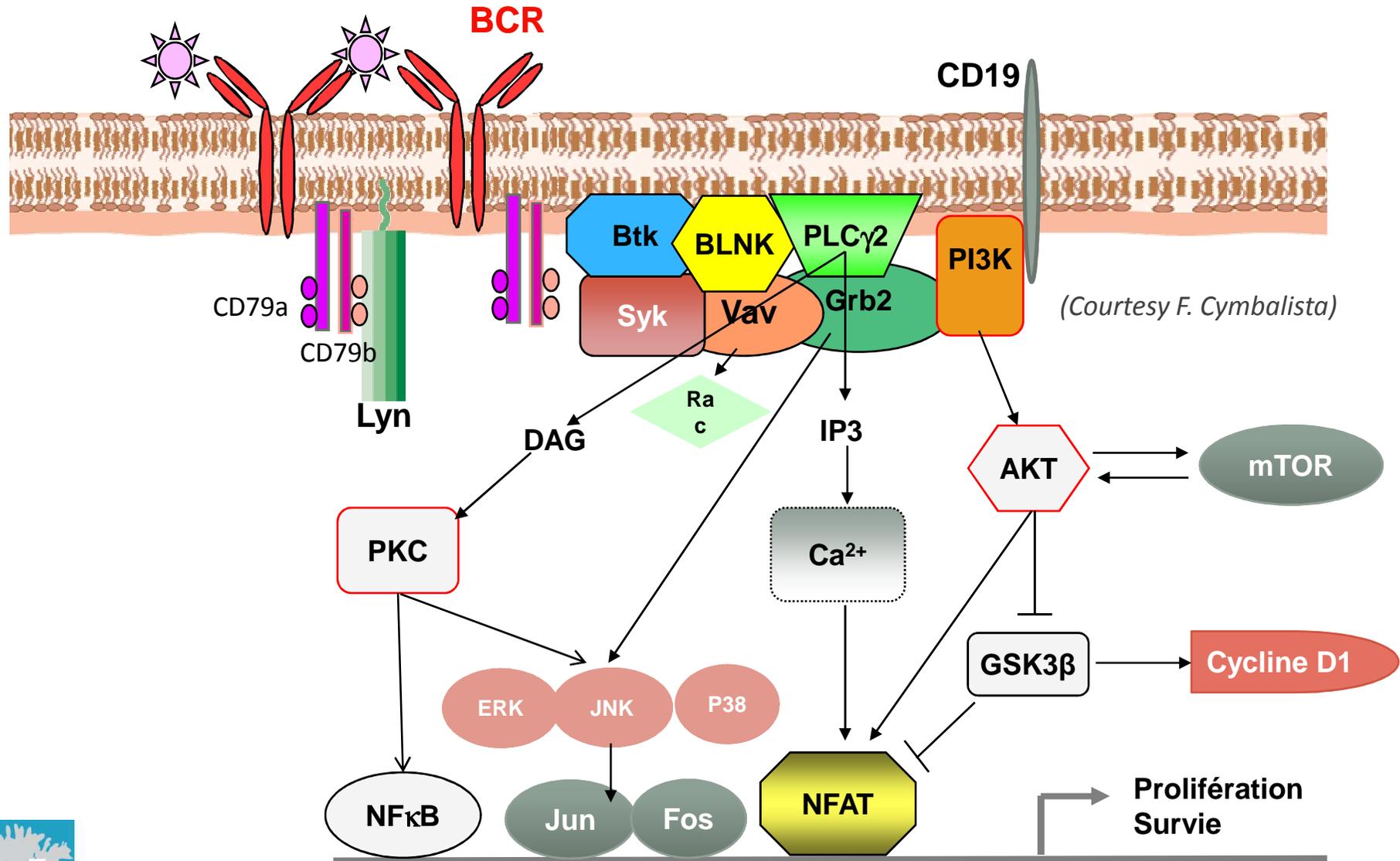
Rôle majeur du BCR (B-cell receptor) dans la LLC

- BCR : rôle majeur pour le développement, la survie, la prolifération, la différenciation fonctionnelle et la migration des lymphocytes B normaux
- Evolution plus défavorable (survie globale) des patients avec IGVH non mutée (> 98% d'homologie avec séquence germinale) que ceux avec IGVH mutée
- Les patients « répondeurs » *in vitro* au BCR (anti- μ) ont une maladie évolutive avec survie plus courte (PFS et OS)
- BCR « actif » principalement observé dans les formes avec IGVH non mutées
- Activation du BCR → cascade de signalisation responsable de la survie cellulaire, de la prolifération et de la migration des lymphocytes B de LLC (fait intervenir un certain nombre de kinases = cibles des « inhibiteurs du BCR »)
- Ganglion (et non sang) = site primaire de l'activation du BCR *in vivo*.

LLC : une maladie secondaire à la stimulation antigénique

- BCR non mutés polyréactifs à un grand nombre d'antigènes de nature diverse: autoantigènes, structures microbiennes, molécules relarguées par les cellules en apoptose voire un épitope du CDR3 du même BCR → autostimulation à l'échelon de la même cellule (réalité encore débattue)
- Répertoire biaisé : utilisation restreinte de quelques dizaines de VH
- CDR3 (complementary determining region) stéréotypé (partie hypervariable très similaire) dans 20 à 30% des cas de LLC avec des « subsets » stéréotypés fréquemment retrouvés → sélection par des antigènes communs ?
- Réactivité des immunoglobulines isolées de cellules de LLC avec des antigènes bactériens (gram + et gram-)
- Spécificités antigéniques correspondant pour la plupart à des autoantigènes comme MYHIIA (myosin heavy chain IIA) pour le subset 6 ou MARK3 (MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3) pour le subset 2
Exposition *in vitro* du BCR à l'épitope reconnu responsable de la prolifération cellulaire → preuve expérimentale de l'existence d'un antigène identique pour un subset donné ⁽¹⁾

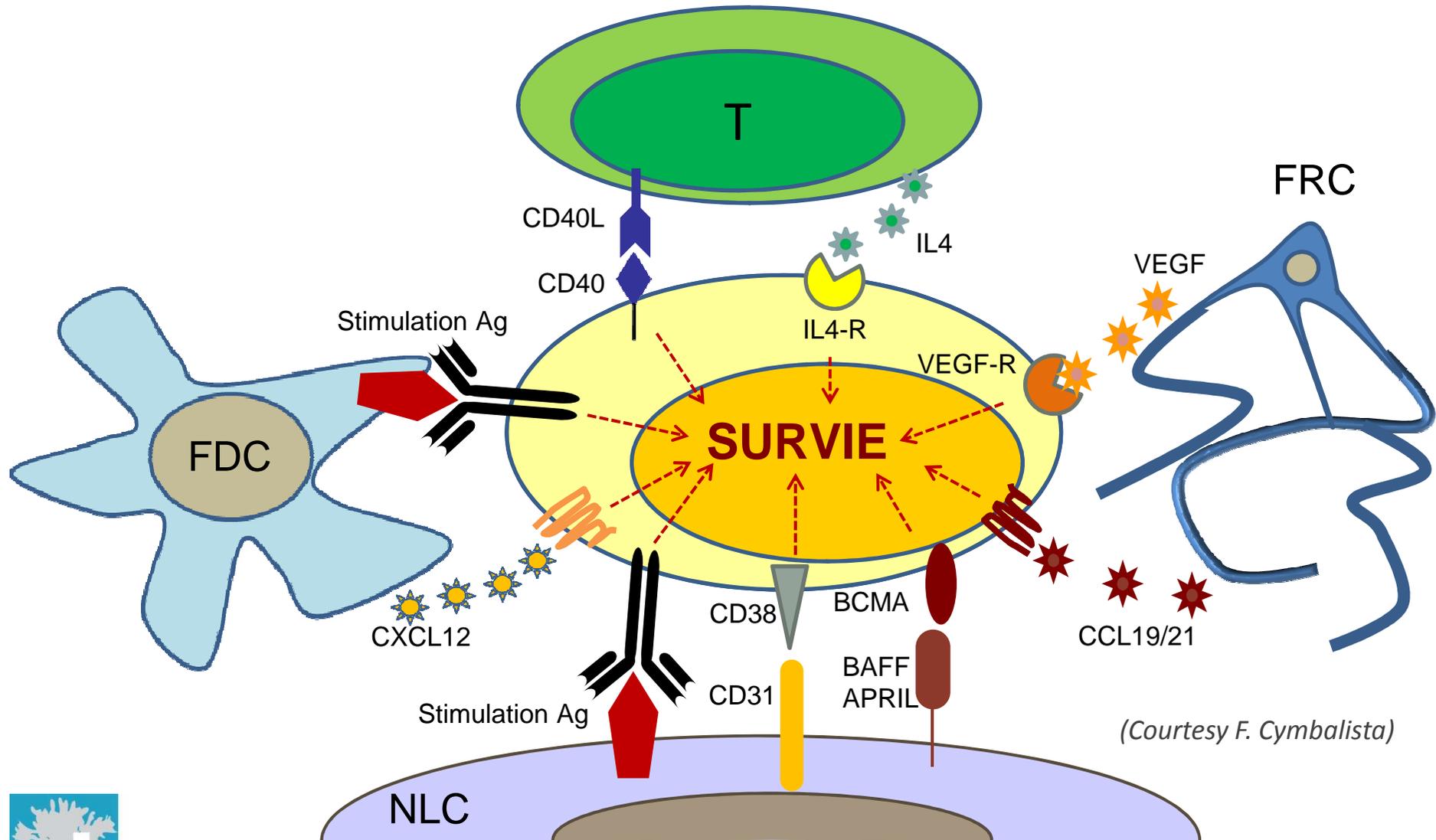
Signalisation normale du BCR



Importance cruciale du microenvironnement

- microenvironnement ganglionnaire ++ (plus que médullaire car atteinte constante de la moelle osseuse dans la LLC)
- ganglion = site préférentiel de prolifération :
 - études cinétiques
 - comparaison du profil d'expression génique des cellules ganglionnaires et de la moelle osseuse (gènes d'activation/prolifération dans le ganglion)
 - patient progressif = patient avec adénopathies
- cellules stromales (mésenchymateuses), nurse-like cells (dérivées des monocytes), cellules folliculaires dendritiques (ganglion) et lymphocytes T

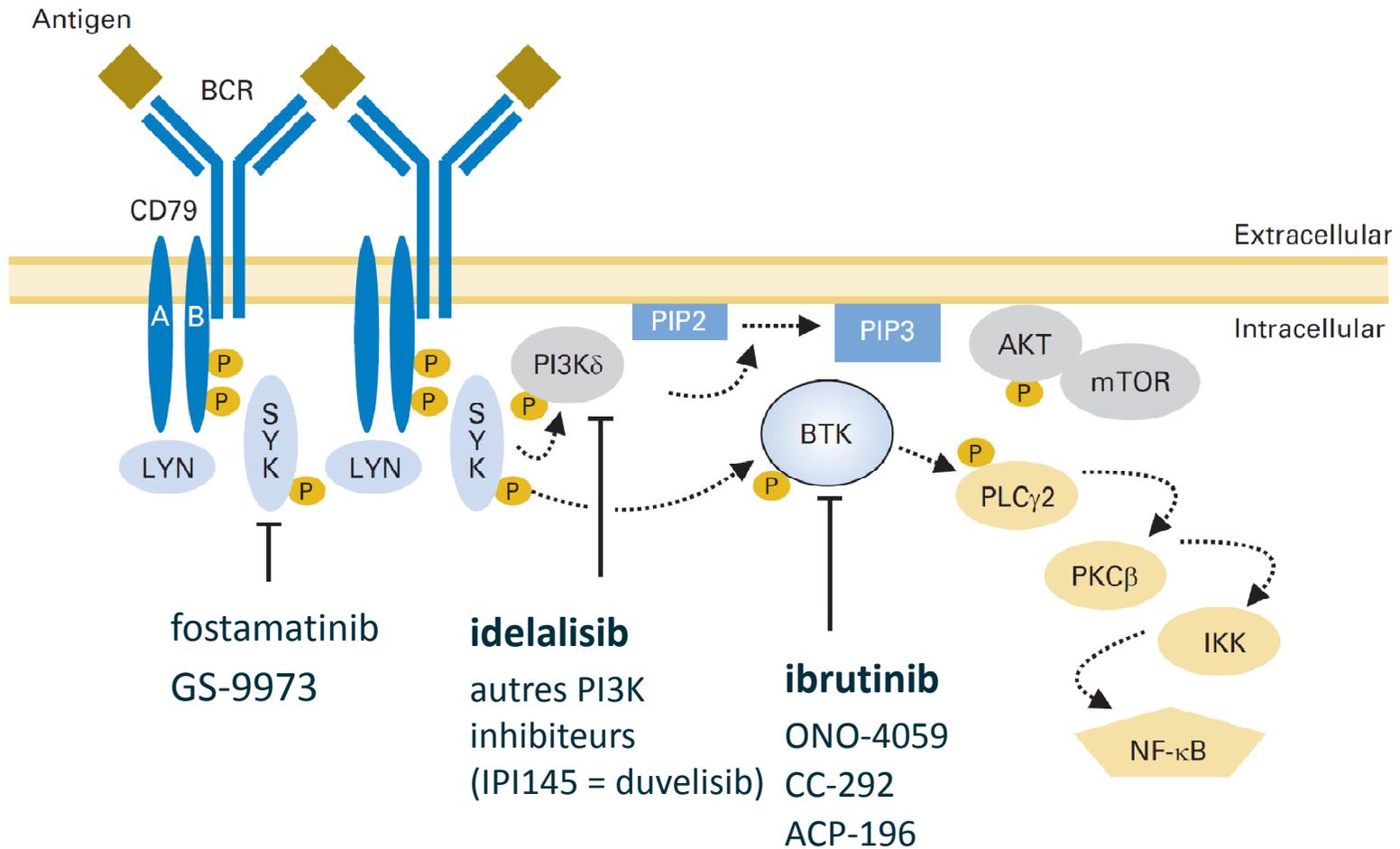
Microenvironnement ganglionnaire □ survie des cellules de LLC



Microenvironnement ganglionnaire □ molécules impliquées

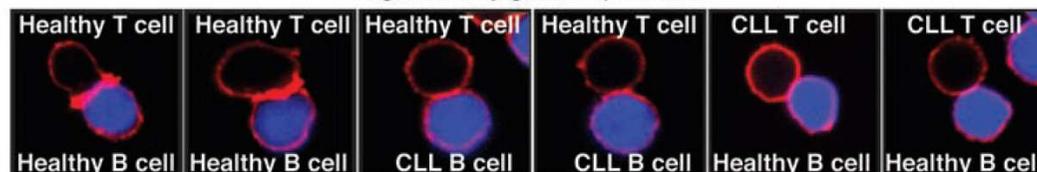
	<i>nom/expression</i>	<i>ligand(s)</i>	<i>rôle</i>
sélectines	CD62L (seule sélectine exprimée par lymphocytes)	glycanes S (veinules endothéliales) récepteur mannose (cellules endothéliales)	entrée et sortie du ganglion (traversée de l'endothélium)
intégrines (glycoprotéines transmembranaires)	VLA4, LFA1 (exprimées par le lymphocyte B)	cellule endothéliale cellules stromales lymphocytes T	entrée du lympho B synapse immunologique interaction matrice
chimiokines et récepteurs	récepteurs CXCR, CCR sur lymphocytes B et T CXCR4 ← CXCR5 ← CCR7 ←	chimiokines CXCL, CCL sécrétées par cellules stromales → CXCL12 → CXCL13 → CCL19/21	entrée du lympho B migration lympho B et T dans zones respectives
cytokines pro-survie (lympho B)	BCMA TACI membrane et sécrétés par lympho B CD40 lymphocytes B	BAFF APRIL membrane sécrétés par c stromales CD40L lymphocytes T	Pro survie (T indépendant) Pro survie (T dépendant)

Signalisation du BCR et inhibiteurs de kinases



Anomalies des lymphocytes T dans la LLC

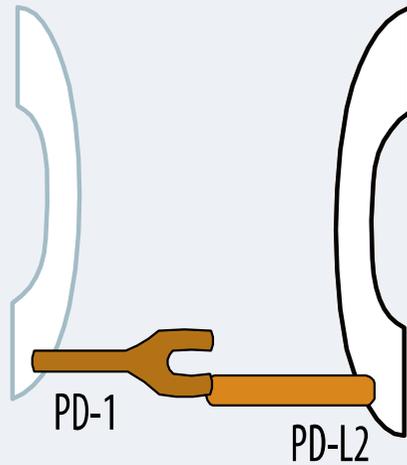
- Nombre augmenté des lymphocytes CD4 dans les ganglions de LLC
- Mais ... CD4 fonctionnellement déficients :
 - faible expression de CD40L (cellules de LLC = mauvaises APC)
 - formation de la synapse immunologique altérée
 - expression anormale de gènes de différenciation et de formation du cytosquelette
 - diminution de l'activation T et augmentation des lymphocytes T reg
- Cellules tumorales de LLC capables d'induire les mêmes anomalies sur des lymphocytes T normaux
- Sécrétion de cytokines immuno-modulatrices comme IL-6, IL-10 ou TGF- β par les cellules de LLC



Ramsay A, JCI 2008

Riches J, Sem Cancer Biol 2010

PD-L1 et dysfonction immunitaire dans la LLC



les tumorales

morale
tion »)

Eμ-TCL1
(2)

(1) Brusa et al, Haematologica 2013

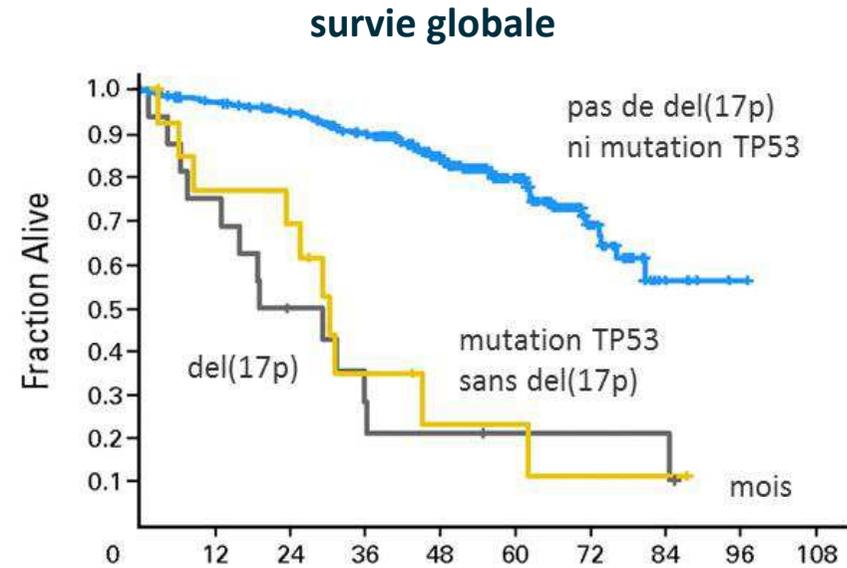
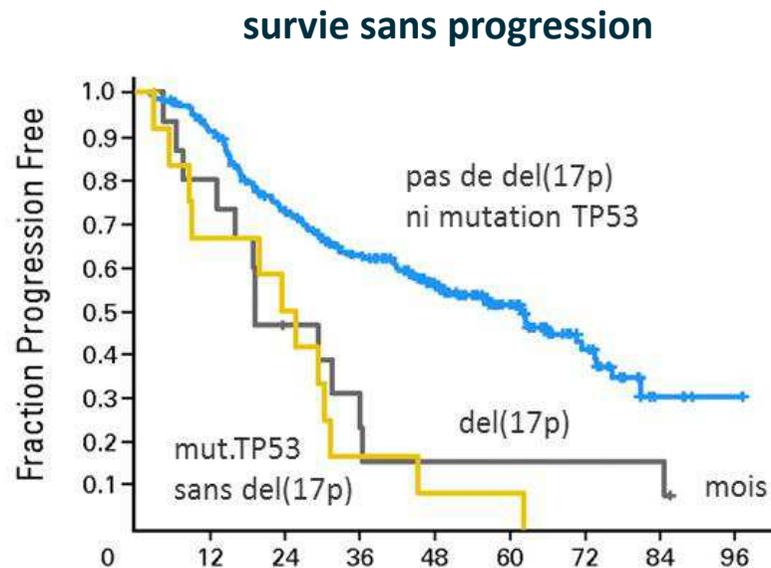
(2) MacClanahan et al, Blood online 2015

Anomalies génétiques : de la FISH au séquençage haut débit

- Classification hiérarchique avec FISH 4 sondes (13q, 11q, 17p, 12) voire 6 sondes (6q et 14q) (*Dohner et al., NEJM 2000*)
- Signification péjorative des délétions ATM (11q) et TP53 (17p)
 - délétion 11q : intervalle libre avant 1^{er} traitement court, maladie souvent « tumorale », PFS et OS plus courtes
 - délétion 17p : résistance à l'immunochimiothérapie (FCR), survie courte, indication théorique à l'allogreffe si patients éligibles
- Voie p53 : importance des délétions 17p (souvent associées à une mutation sur l'allèle non délété) mais aussi des mutations TP53 (séquençage) de même signification péjorative
- Séquençage exome entier (WES) et diffusion séquençage haut débit (NGS) : découverte d'autres anomalies récurrentes dont SF3B1, NOTCH1 et BIRC3 de signification pronostique péjorative
- Évolution clonale: acquisition de nouvelles mutations ou expansion de petits clones avec mutations supplémentaires

Mutations de TP53 □ fréquence et survie (st. B/C, 1^{ère} ligne, CLL4)

- mutations retrouvées dans 8.5% des cas (28/328)
 - sans délétion 17p dans 4.5% des cas (14/291)
 - avec délétion 17p dans 4% des cas
- cas avec délétion 17p : mutation sur l'autre allèle du gène TP53 (14/16 soit 87%)
- aucune réponse complète si mutation de TP53
- pronostic péjoratif et identique si mutation isolée ou associée à del(17p)



cohorte CLL4 du GCLLSG : F vs FC

Zenz et al., JCO 2010

Fréquence des principales mutations selon le stade

	Au diagnostic	Progression avant 1 ^{er} trait ^t	Rechute ou réfractaires	Richter
Del(13q)/+12	fréquence similaire tout du long de l'évolution			
TP53 mut/del	≈ 5-10%	≈ 15%	≈ 45%	≈ 60%
ATM mut/del	≈ 10-20%	≈ 20-35%	≈ 25-30%	↓ (≈ 10%)
NOTCH1	≈ 5-10%	≈ 13-20%	≈ 13-20%	≈ 30-40%
SF3B1	≈ 5-10%	≈ 15%	≈ 20%	↓ (≈ 6%)
BIRC3	≈ 5%	NA	≈ 25%	↓ (≈ 0%)

des mutations de NOTCH1, SF3B1 et BIRC3 peuvent apparaitre au cours de l'évolution (sélection clonale)

Adapté de Rossi et al., *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012

Foa et al., *Haematologica* 2013

Mutations TP53, ATM, NOTCH1, SF3B1 et BIRC3 (1)

TP53/ATM

- loci : 17p (TP53) et 11q22.3 (ATM)
- mécanisme : inactivation délétion et mutations (effet dominant négatif)
- voie impliquée :
 - dommages de l'ADN
 - stabilité du génome

NOTCH1

- récepteur transmembranaire /partie intracellulaire (= facteur de transcription) clivée par gamma-secrétases et rapidement dégradée
- mécanisme : \searrow dégradation Notch1
- voie impliquée : NFkB \pm MYC et TP53

SF3B1

- Splicing Factor 3b, subunit 1
- locus : 2q33.1
- mécanisme : modification de la fonction
- voie impliquée : splicing des pré-ARNm
- dans la LLC : altération de la réponse TP53/ATM en réponse aux dommages de l'ADN

BIRC3

- Baculoviral IAP repeat containing 3 genes (BIRC3, c-IAP2, locus 11q22.2)
- Locus: 11q22.2 (centromérique de 6 Mb de ATM)
- mécanisme: inactivation par délétion ou mutation
- voie impliquée: NFkB (\nearrow)

Mutations TP53, ATM, NOTCH1, SF3B1 et BIRC3 (2)

TP53/ATM

- association avec caryotypes complexes
- double anomalie TP53 et ATM rare : 1% des LLC mais 11% des LLC avec 17p(-)
- conséquences cliniques:
 - ↘ PFS et survie (ATM, TP53)
 - chimiorésistance (TP53)
 - petits sous-clones aussi péjoratifs

NOTCH1

- association avec trisomie 12, plus fréquente chez pts avec IGVH non mutée
- conséquences cliniques :
 - ↘ survie
 - pas de bénéfice du rituximab (en association avec FC, étude CLL8)
 - risque accru de Richter

SF3B1

- association avec délétion 11q22-23 et mutation de ATM
- conséquences cliniques :
 - ↘ intervalle libre sans traitement
 - ↘ survie
 - résistance à la fludarabine ?

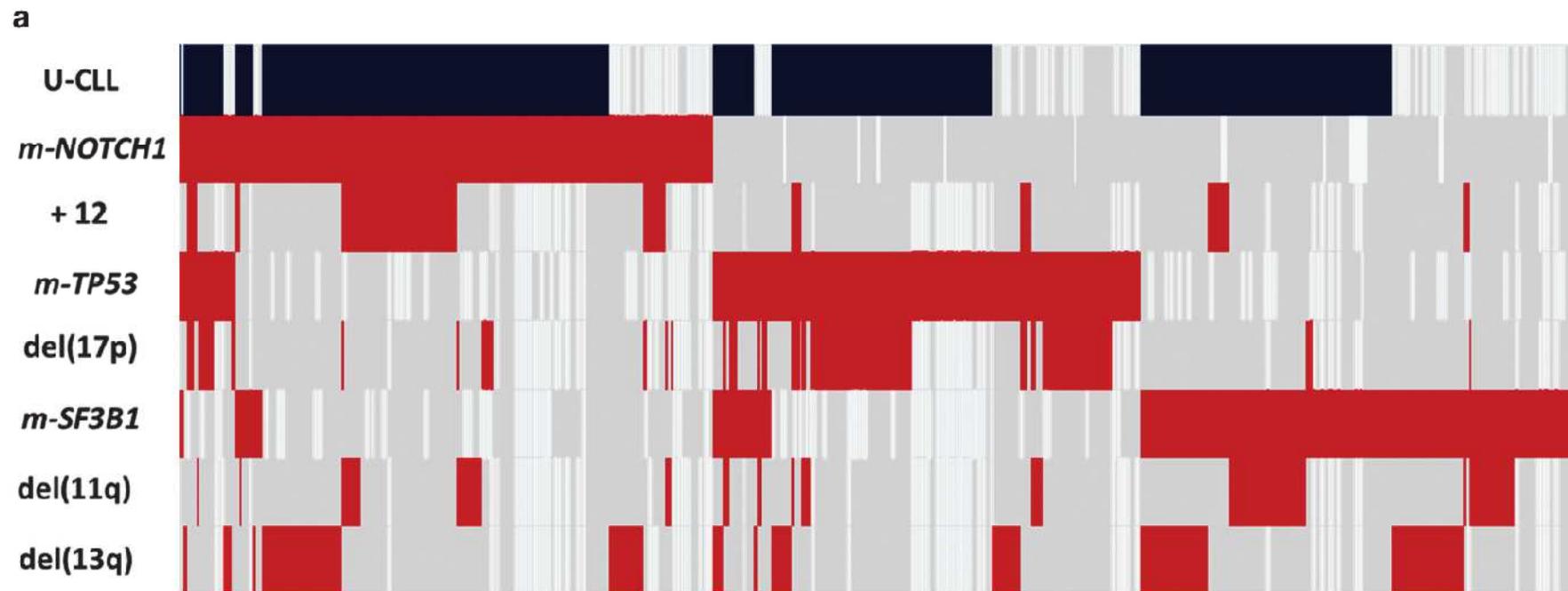
BIRC3

- association avec délétion ATM (proche voisinage)
- conséquences cliniques :
 - ↘ survie
 - résistance chimiothérapie (de façon similaire à une anomalie de TP53)

Principales mutations et anomalies génétiques (FISH)

Association des anomalies entre elles

Série de l'ERIC (European Research Initiative in CLL)



LLC □ facteurs pronostiques

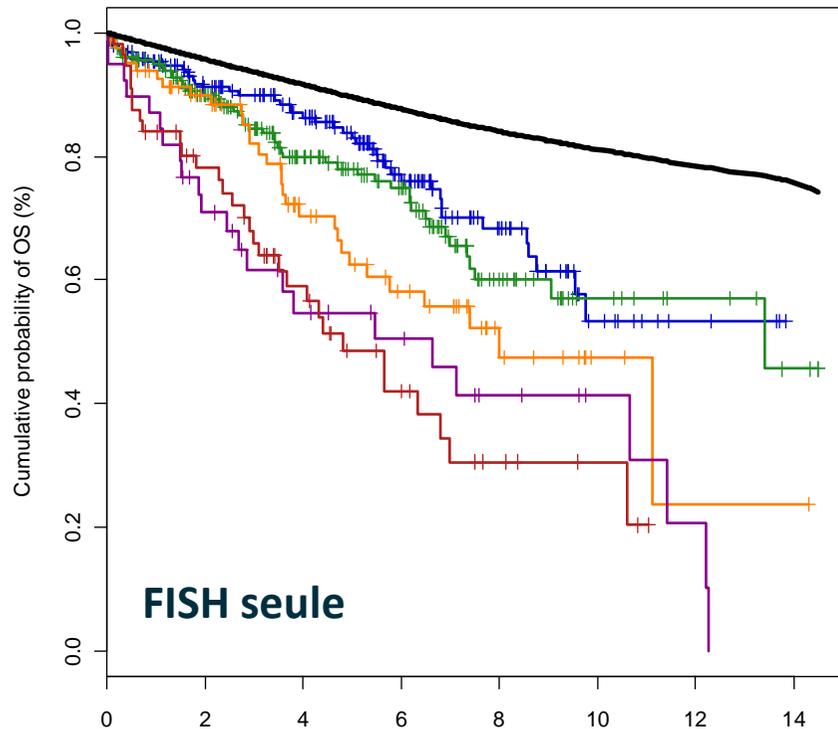
	intervalle libre sans Tx	taux de réponse*	survie sans progression	survie globale
CD38	✓		✓	✓
TK > 10	✓			✓
B2 microglob.	✓		✓	✓
IgVH non muté	✓		✓	✓
del(11q)	✓		✓	✓
del(17p)/TP53 mut	✓	✓✓	✓✓	✓✓
Notch1 mut	✓		✓	✓
SF3B1 mut	✓		✓	✓
BIRC3 mut	✓	✓	✓✓	✓✓
MRD non détectable			✓	✓

* après traitement de première ligne type FCR

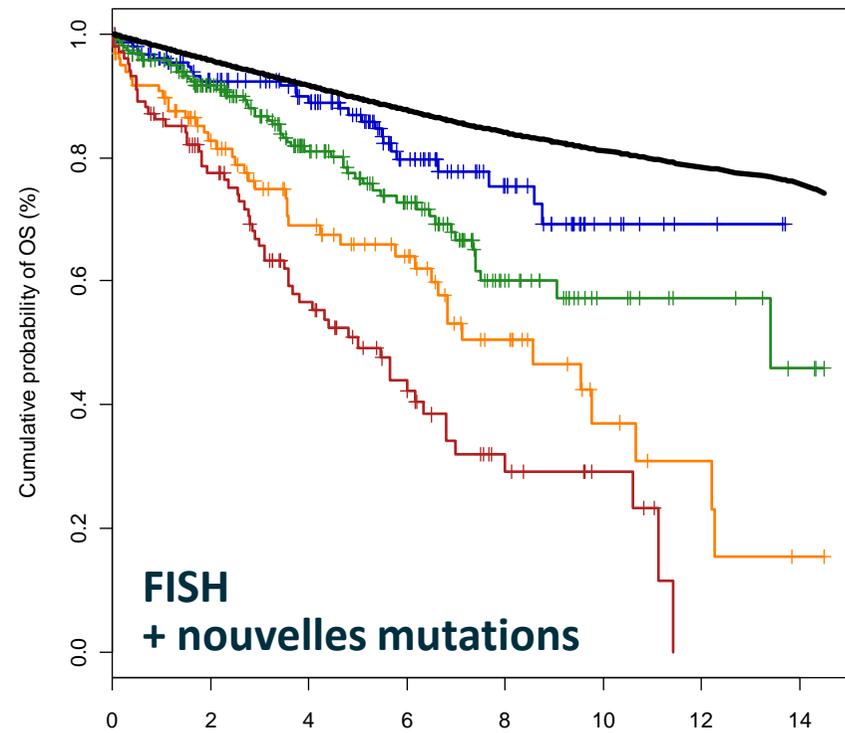
Nouveaux sous-groupes pronostiques □ survie globale

données cytogénétiques et nouvelles mutations → 4 groupes pronostiques

- Matched general population
- del13q14
- Normal
- +12
- del11q22-q23
- del17p13



- Matched general population
- del13q14
- Normal/+12
- NOTCH1 M/SF3B1 M/del11q22-q23
- TP53 DIS/BIRC3 DIS



Nouveaux sous-groupes pronostiques □ survie globale

données cytogénétiques et nouvelles mutations → 4 groupes pronostiques
(n = 583)



cytogénétique seule

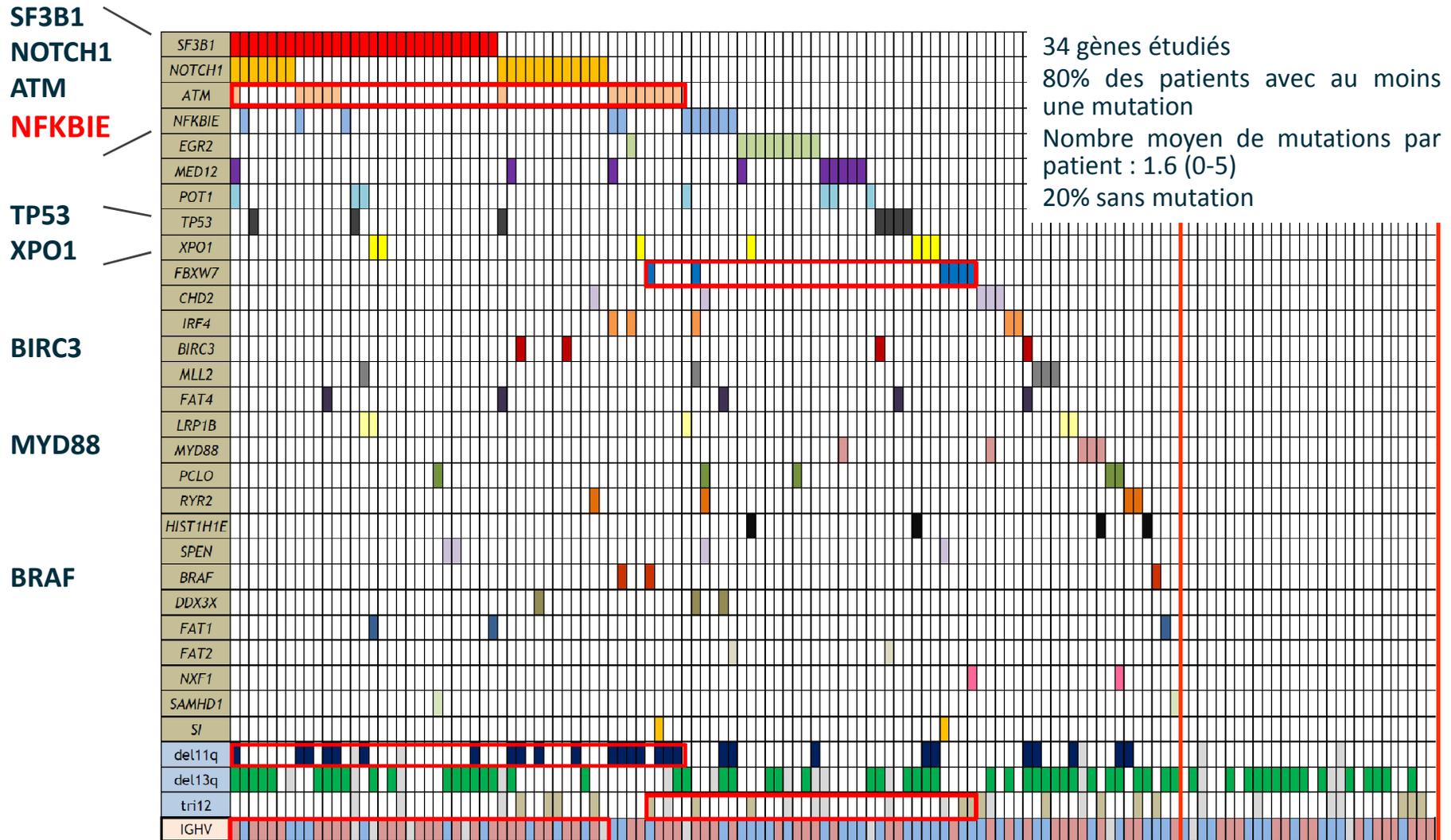
anomalie	% pts	survie 5 ans	survie 10 ans
del(13q)	33.2%	83.9%	53.3%
N ^{al}	36.4%	78.0%	57.1%
+12	14/1%	62.5%	47.5%
del(11q)	6.7%	54.7%	41.3%
del(17p)	9.6%	48.5%	30.6%

cytogénétique + mutations

groupes	% pts	survie 5 ans	survie 10 ans
del(13q)	26.6%	86.9%	69.3%
N ^{al} /+12	39.1%	77.6%	57.3%
Notch1/SF3B1 del(11q)	17%	65.9%	37.1%
TP53/BIRC3	17.3%	50.9%	29.1%



Mutations (NGS) □ patients B/C 1^{ère} ligne (cohorte CLL 2007 FMP)



N = 130 pts

pas de patients avec del(17p) par FISH (critère de non inclusion)

Roos Weil et al., SFH 2015

Mécanismes de résistance à l'ibrutinib

- 6 patients progressifs sous ibrutinib après PR ou CR \geq 12 mois \rightarrow WES (whole exome sequencing) \rightarrow **mutation acquise C481S (cystéine \rightarrow sérine)** dans 5/6 cas (site de fixation de l'ibrutinib sur btk) et **mutations activatrices de PLC γ 2** (substrat de btk) dans 2 cas

Table 1. Characteristics of Six Patients with Resistance to Ibrutinib.

Patient No.	Age yr	Prior Therapies no.	Baseline Cytogenetic Features*	Study Treatment and Daily Dose†	Duration of Ibrutinib Treatment days	Best Response	Time to First Response days	Identified Mutations of Interest‡
1	59	5	del(17p13.1), trisomy 12	Ibrutinib, 560 mg	621	Partial	70	C481S mutation in BTK
2	59	3	del(11q22.3)	Bendamustine–rituximab for 6 cycles; ibrutinib, 420 mg	388	Complete	70	C481S mutation in BTK
3	51	2	complex karyotype	Ofatumumab for 24 wk; ibrutinib, 420 mg	674	Complete	85	C481S mutation in BTK
4	69	9	del(17p13.1), complex karyotype	Ibrutinib, 840 mg	868	Partial	133	C481S mutation in BTK
5	61	4	del(17p13.1), complex karyotype	Ofatumumab for 24 wk; ibrutinib, 420 mg	505	Partial	85	L845F, R665W, and S707Y mutations in PLC γ 2 and C481S mutation in BTK
6	75	2	del(17p13.1), complex karyotype	Ibrutinib, 420 mg	673	Partial	159	R665W mutation in PLC γ 2

Woyach et al., NEJM 2014, 370: 2286-94