

Echanges cliniciens biologistes autour des mutations de TP53 dans la Leucémie Lymphoïde Chronique

**Laboratoire d'hématologie
Hôpital Avicenne**

30 avril 2024

Pr Fanny BARAN-MARSZAK
Dr Grégory Lazarian



Enquêtes cliniciens-biologistes

21 biologistes ont participé à l'enquête

Correspond environ à 1 biologiste par centre

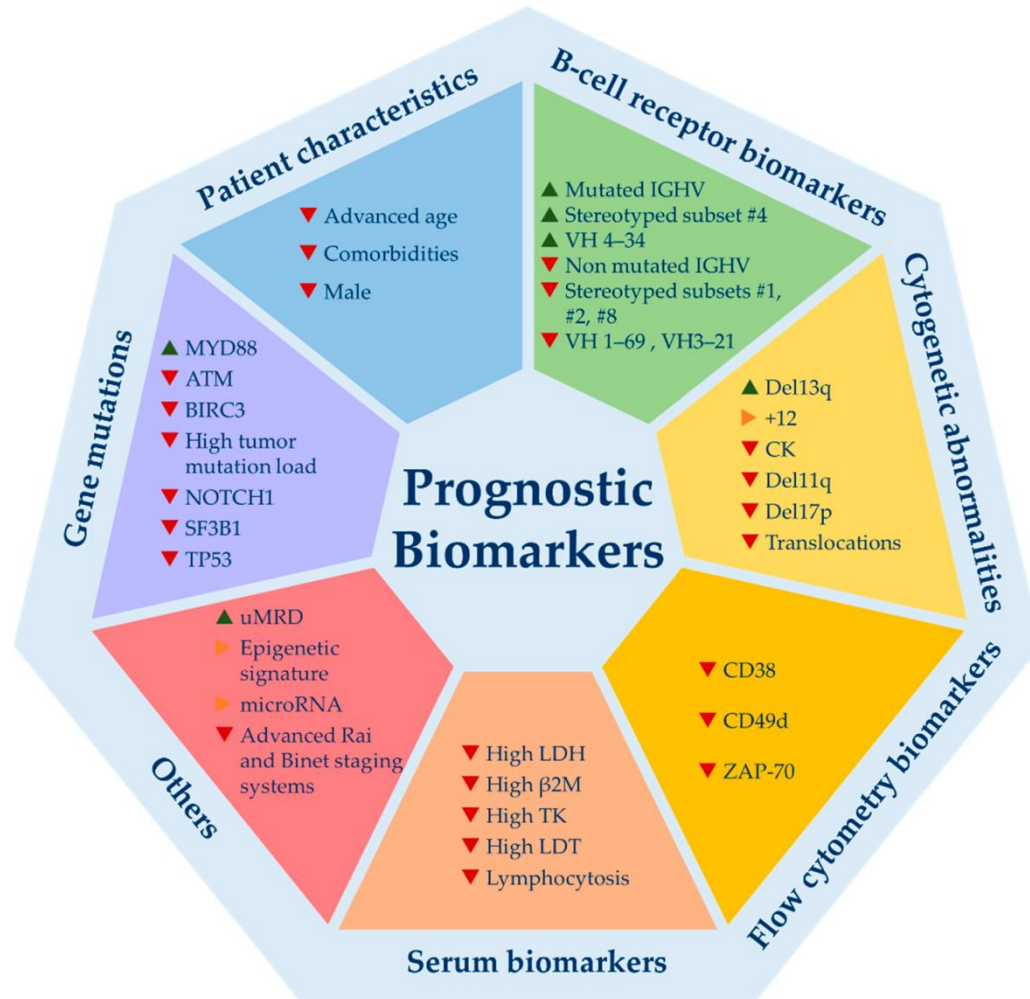
Prélèvements et patients analysés :

- 20078 prélèvements analysés [10-3607] sur 20 centres
- 4387 prélèvements analysés en 2022 [50-700] sur 20 centres
- 4035 patients analysés par an [50-645]

20 cliniciens ont participé à l'enquête

- Correspond à 2905 patients suivi dans 20 centres
- Le nombre de nouveaux cas diagnostiqué par an est de 490 dans ces 20 centres (nombre de nvx diagnostic estimé en France à 4700)
- Au total, 784 patients sont traités dans ces 20 centres

Quel bilan biologique chez un patient LLC ?

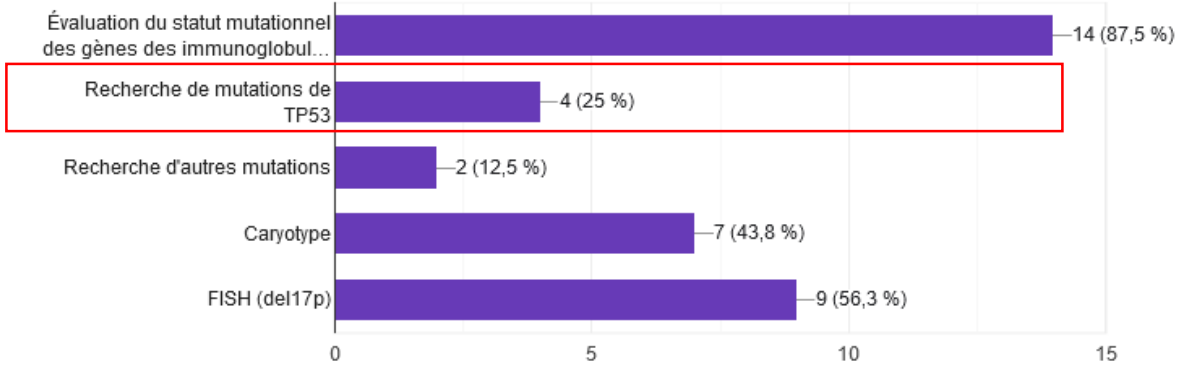


- Quels examens réaliser ?
- À quel moment ?
- Importance de la technique ?

A quel moment réaliser la recherche des anomalies de TP53 ?

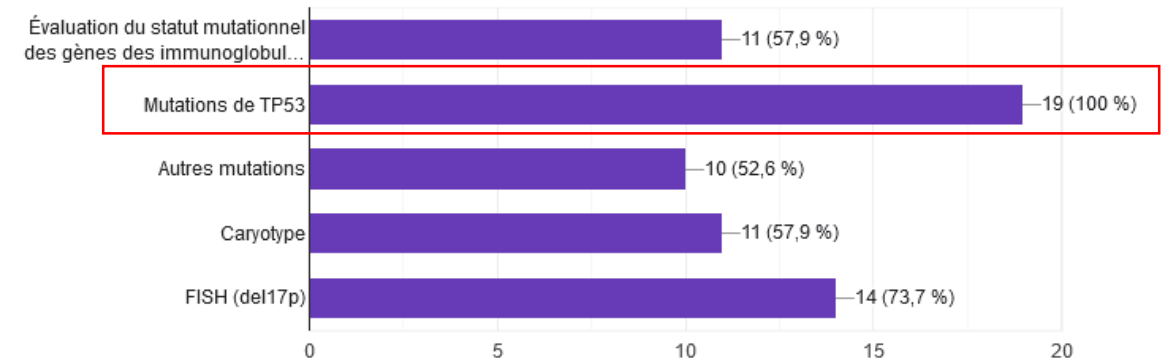
Au diagnostic

16 réponses

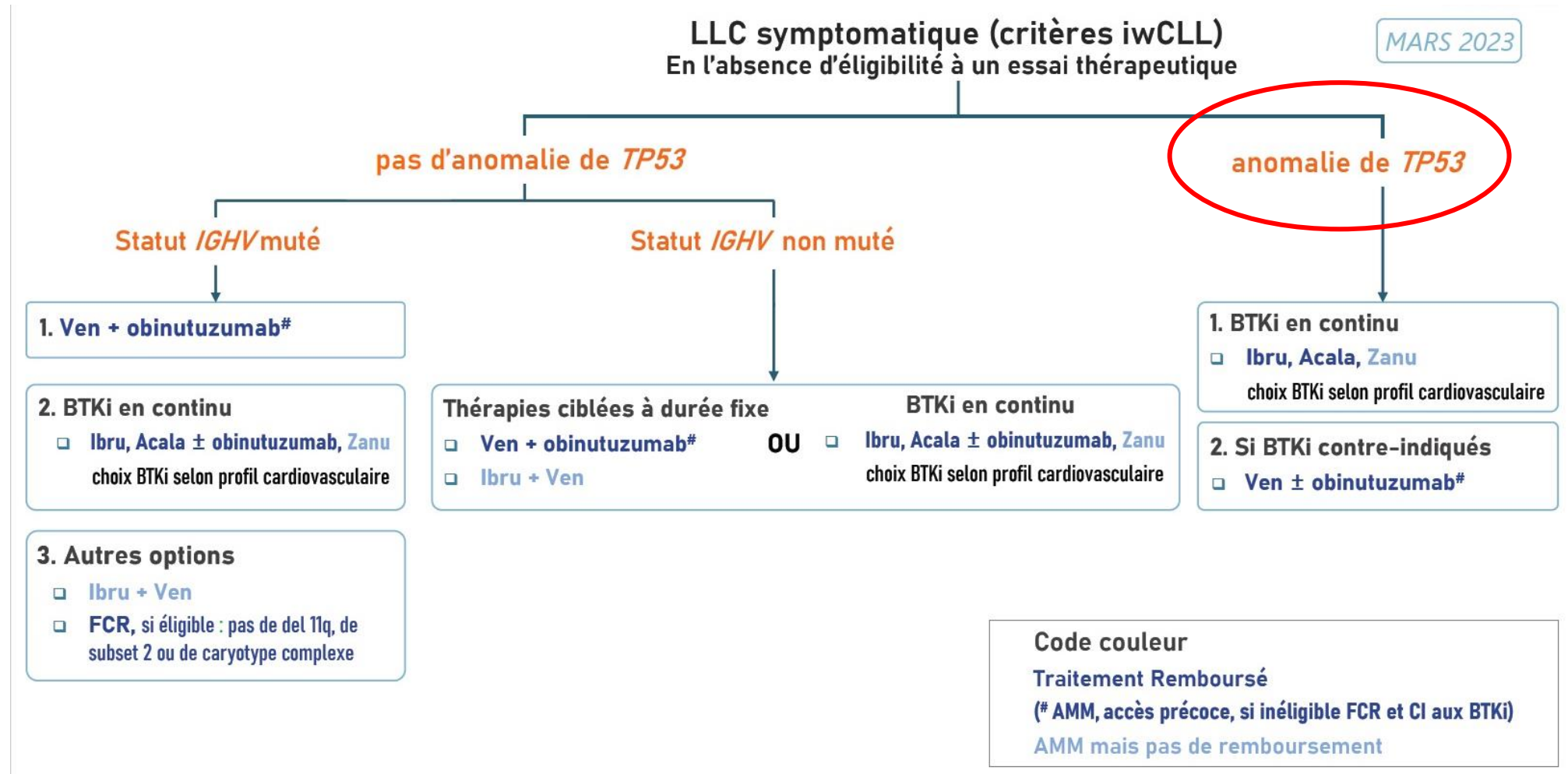


Avant traitement

19 réponses



Recommandations FILO | Algorithme de traitement de 1^{ère} ligne

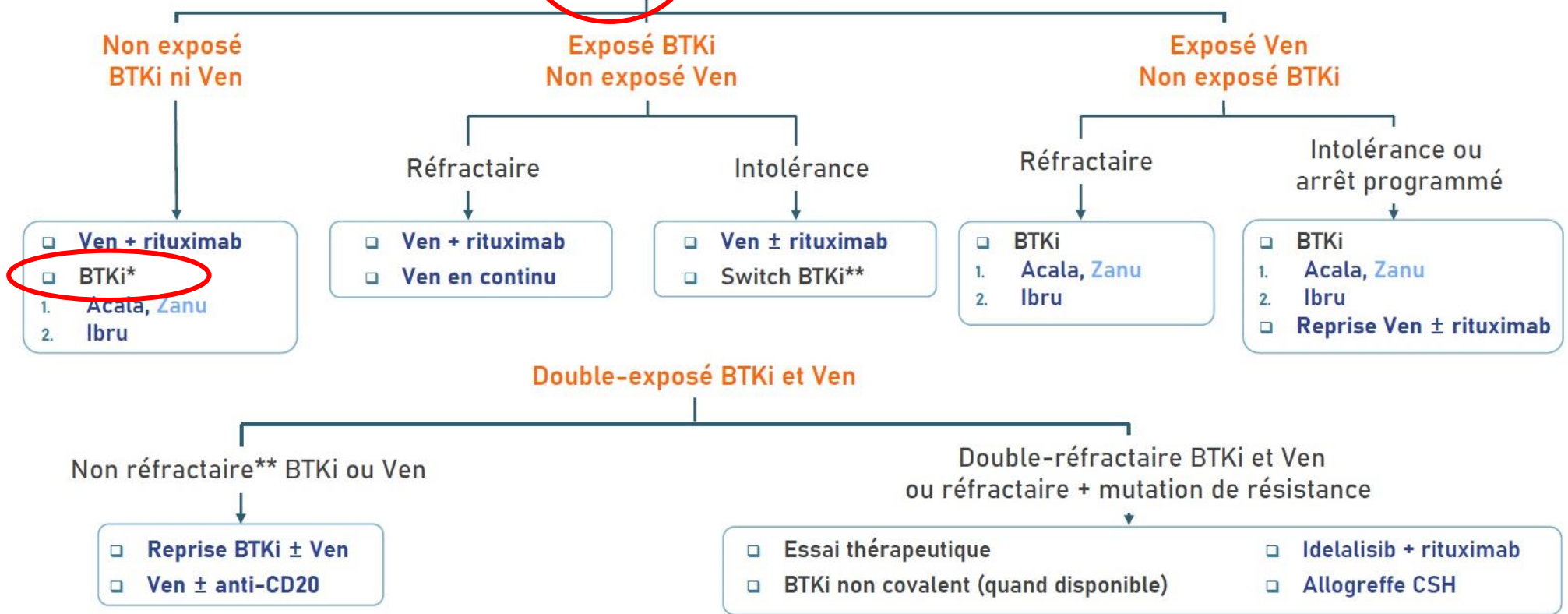


Recommandations FILO | Algorithme de traitement des rechutes

MARS 2023

rechute symptomatique (en l'absence d'éligibilité à un essai clinique)

Évaluation biologique (*TP53* ± recherche mutations de résistance)
+ si suspicion Richter : TEP + biopsie



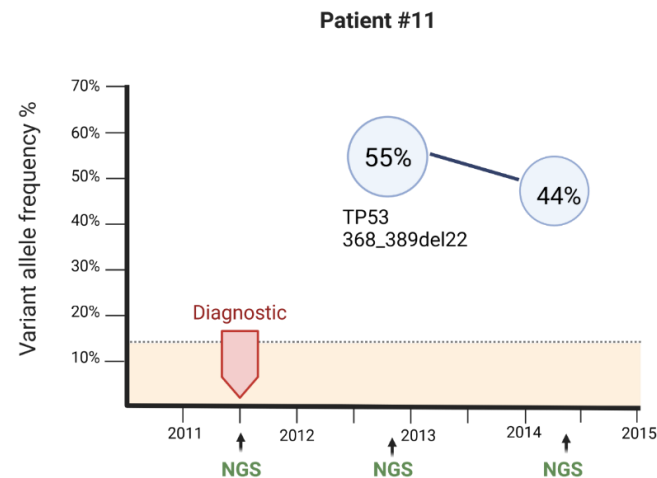
* Préférentiellement si anomalie de *TP53*

** Faire une recherche de mutation de résistance

A quelle fréquence rechercher les anomalies de TP53 ?

- Avant chaque ligne de traitement (TP53 + del17p)
- Même si présence d'anomalies avant la première ligne de traitement (évolution clonale possible)

Acquisition au cours de l'évolution en l'absence de traitement

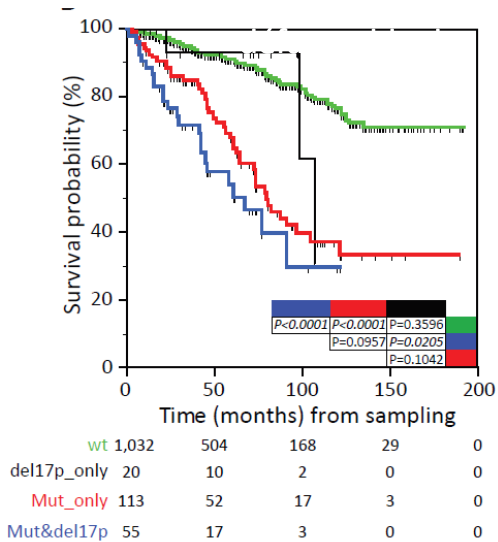


Evolution clonale : Acquisition d'une mutation de TP53 au cours de l'évolution de la maladie
Acquisition d'une anomalie additionnelle

Anomalies de TP53

Les anomalies de TP53 : marqueur pronostique et prédictif

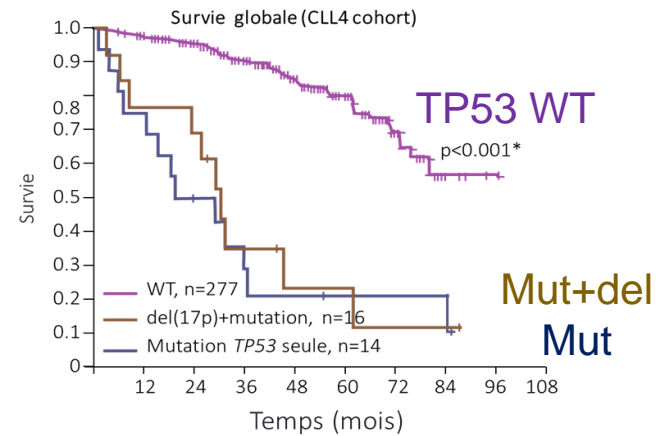
Marqueur pronostique



TP53 WT

Mut+del

Mut

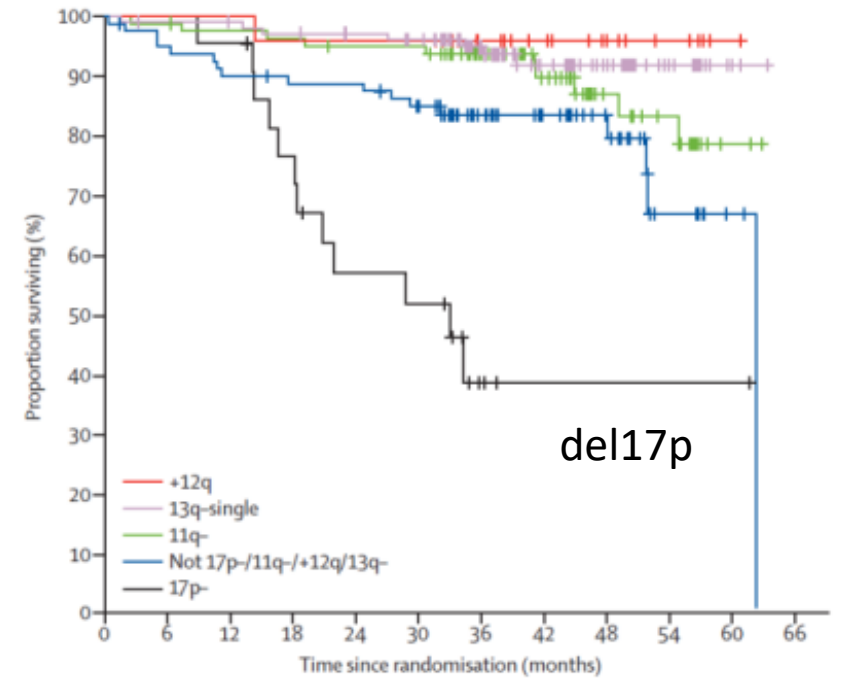


Zenz T, et al. J Clin Oncol 2010

Bomben et al, CCR 2021

Même impact pronostique des del17p et mutations TP53

Marqueur prédictif



Résistance FC et FCR

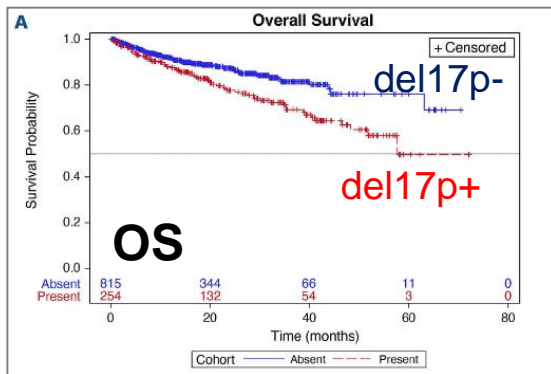
TP53 et thérapies ciblées

Ibrutinib en 1^{re} ligne

Données de registre 2011 à 2019

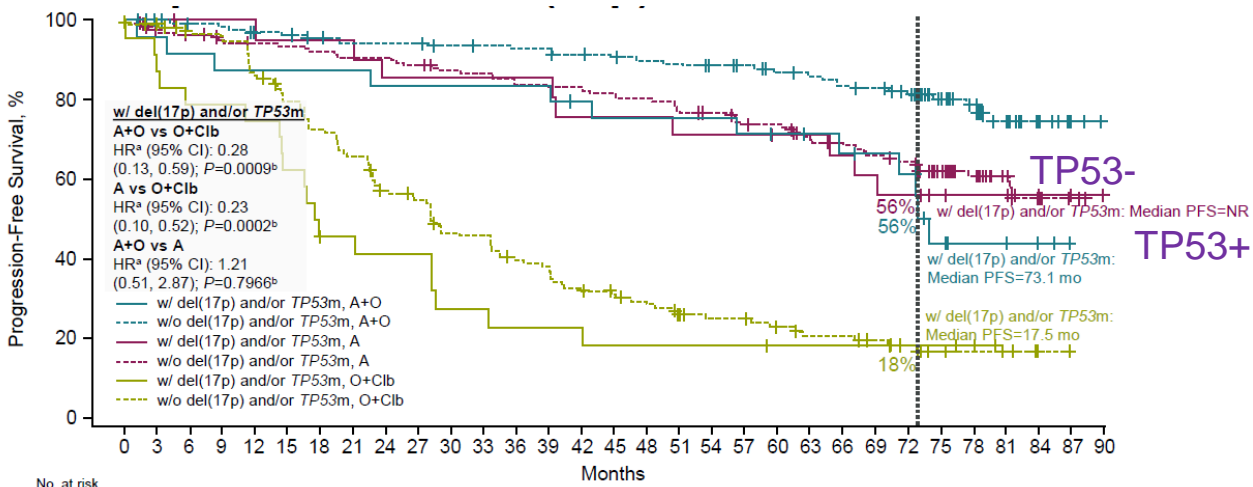
1 069 patients avec ibrutinib en L1

Patients avec del17p (24 %)



Toujours un facteur prédictif

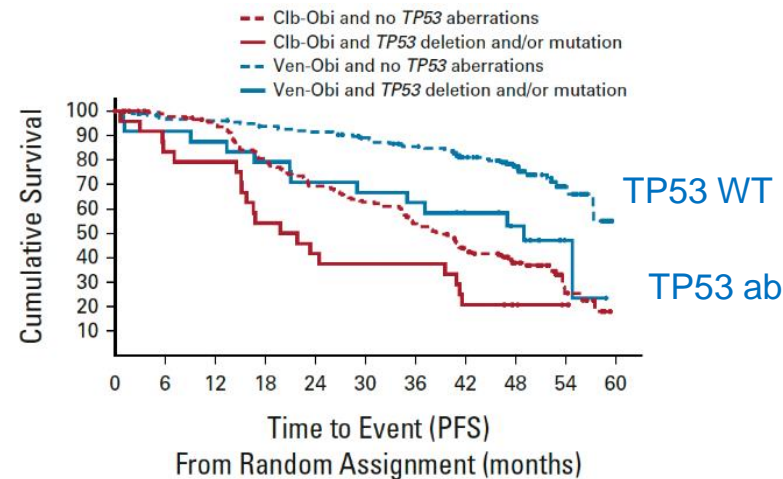
Acalabrutinib en 1^{re} ligne



Vénétoclax en 1^{re} ligne

Essai CLL14

432 patients non éligibles FCR
Actualisation avec 4 ans de recul



En analyse multivariée, del17p seul facteur significatif de la SSP

ELEVATE TN
Acala +/- O vs CLB
Actualisation à 4 ans

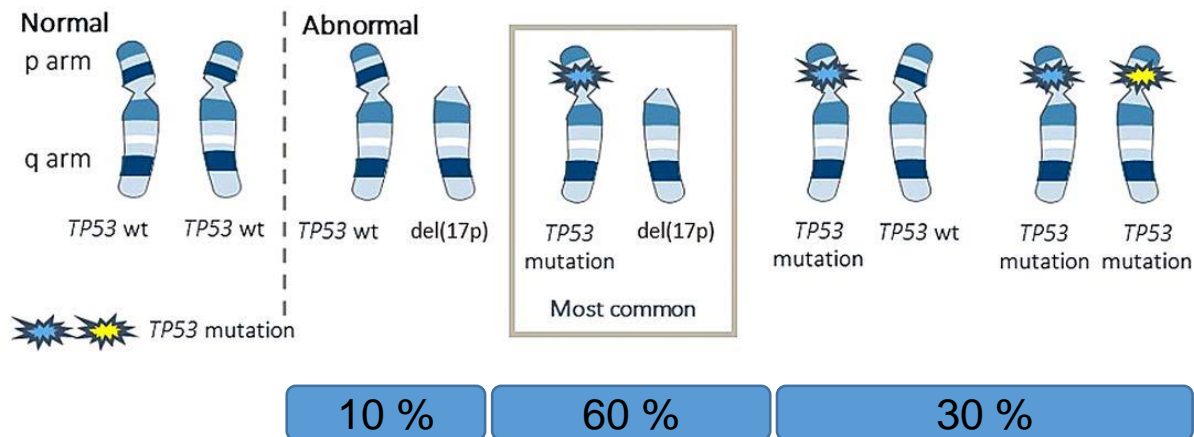
Pas de différence à ce stade

Mato et al, Haematologica 2022
Sharman et al, ASH 2023
Al Sawaf et al j Clin Oncol 2021

Perte de la fonction p53 dans la LLC

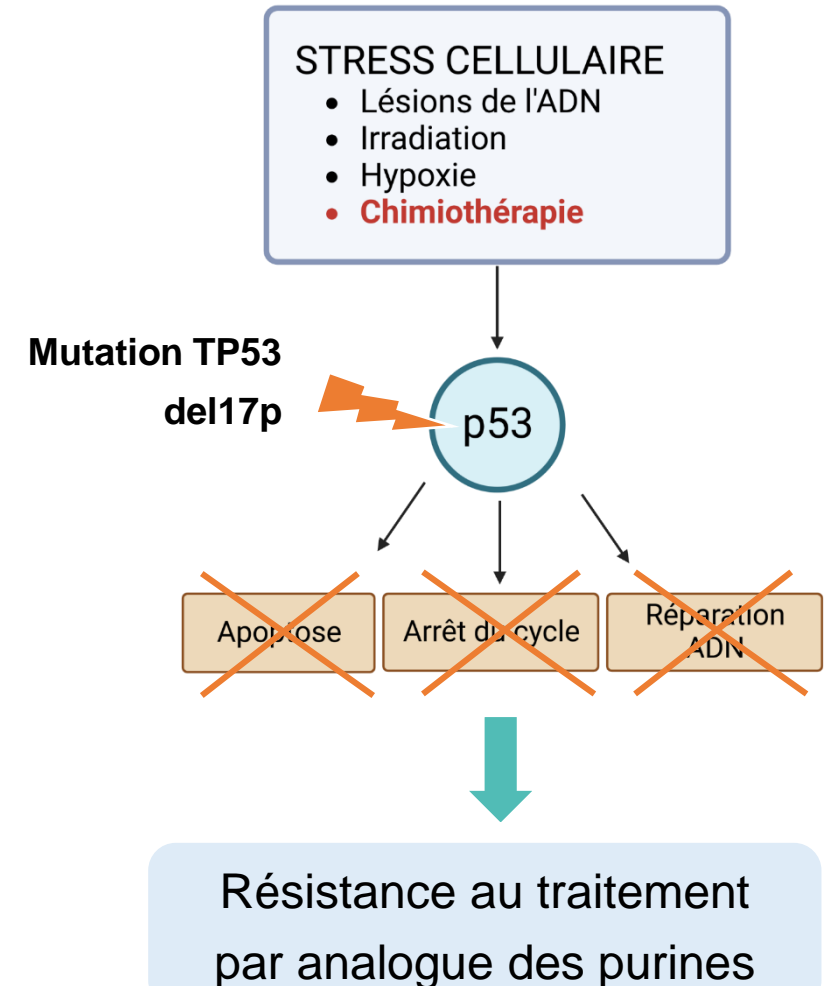
Les différentes anomalies de p53

- La délétion 17p = perte de l'allèle TP53 : **del17p**
- Des **mutations** peuvent également affecter le gène TP53



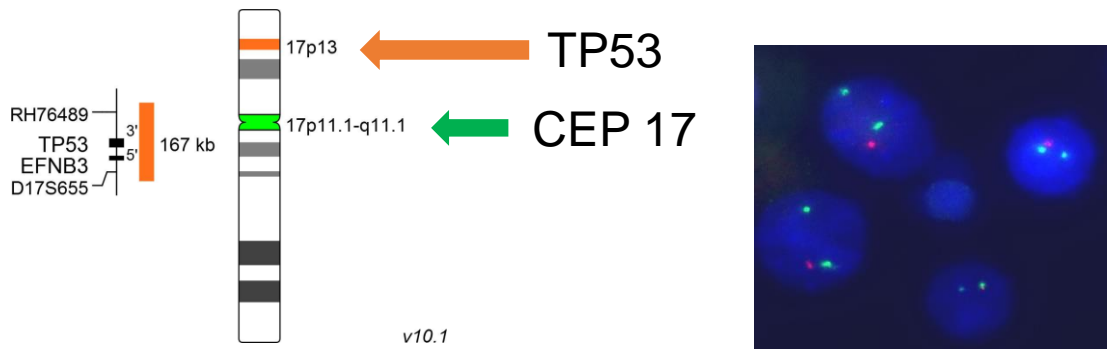
Ces anomalies de p53 sont retrouvées chez 5 à 10 % des patients au diagnostic

Conséquence de la perte de fonction de TP53



Comment rechercher les anomalies de TP53 ?

Détection de la délétion TP53 en FISH

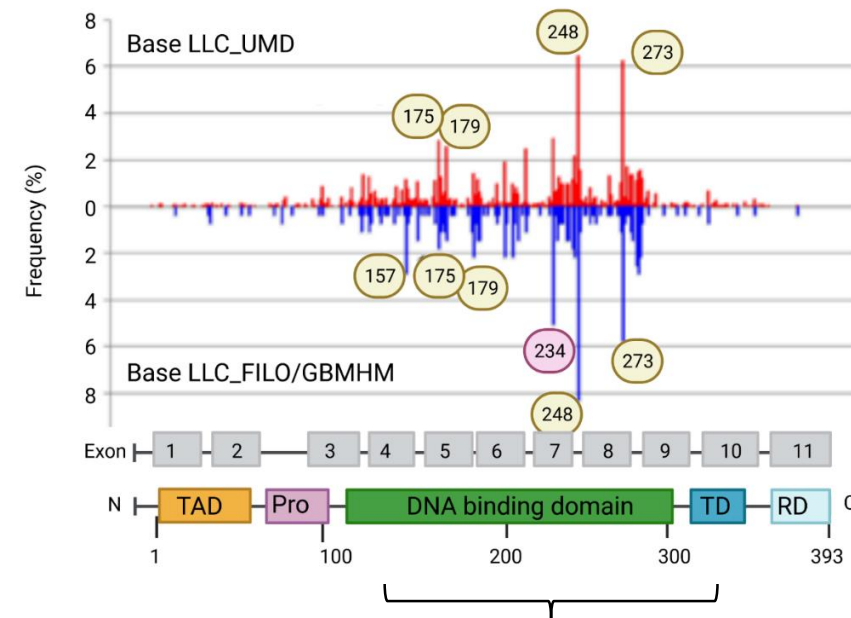


Sensibilité d'environ 10 %

Généralement, la FISH est réalisée avec le caryotype
Recherche de del11q peut être faite en parallèle

Détection des mutations par séquençage

Séquençage



Mutations au niveau du domaine de liaison à l'ADN

- La recherche par FISH, sans séquençage associé, passe à côté d'environ 40 % des anomalies de TP53
- Réaliser les deux techniques en parallèle

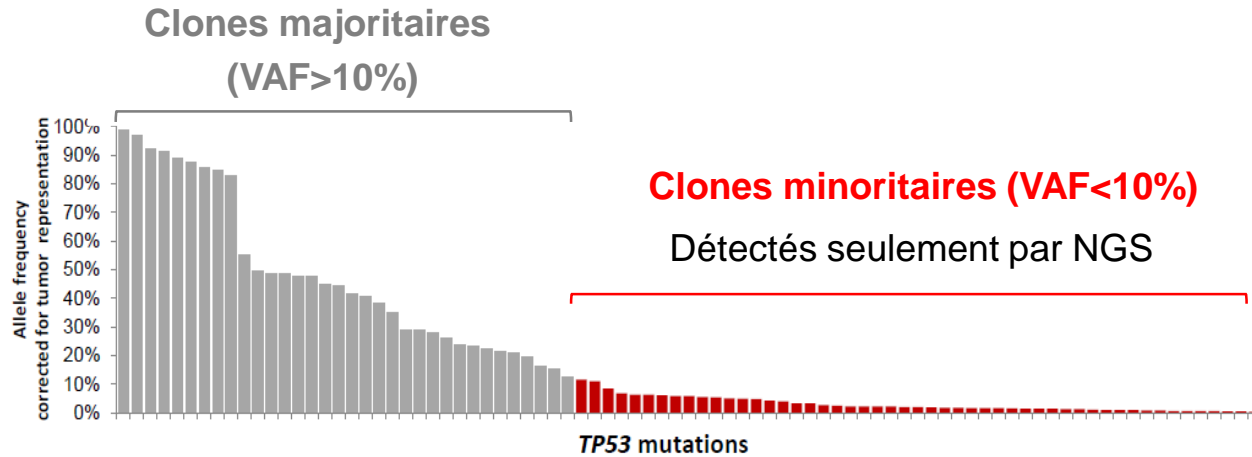
À partir de quel seuil de fréquence allélique (VAF) considérer les mutations de TP53 ?

VAF > 1 % ?

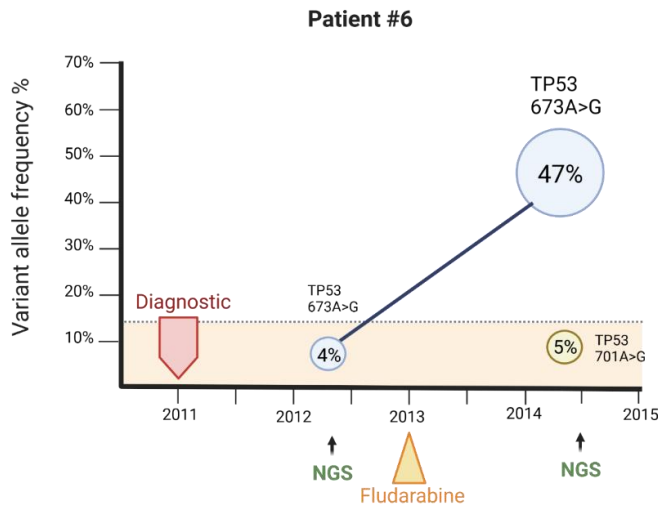
VAF > 5 % ?

VAF > 10 % ?

Impact de la fréquence allélique

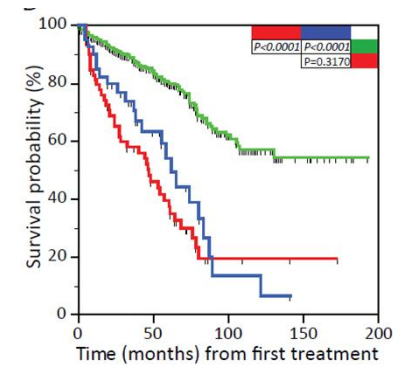


Lazarian et al, Int J Cancer, 2016
 Rossi et al, Blood 2014
 Bomben et al, CCR 2021



Clone minoritaire résistant à la fludarabine

Chimiothérapie



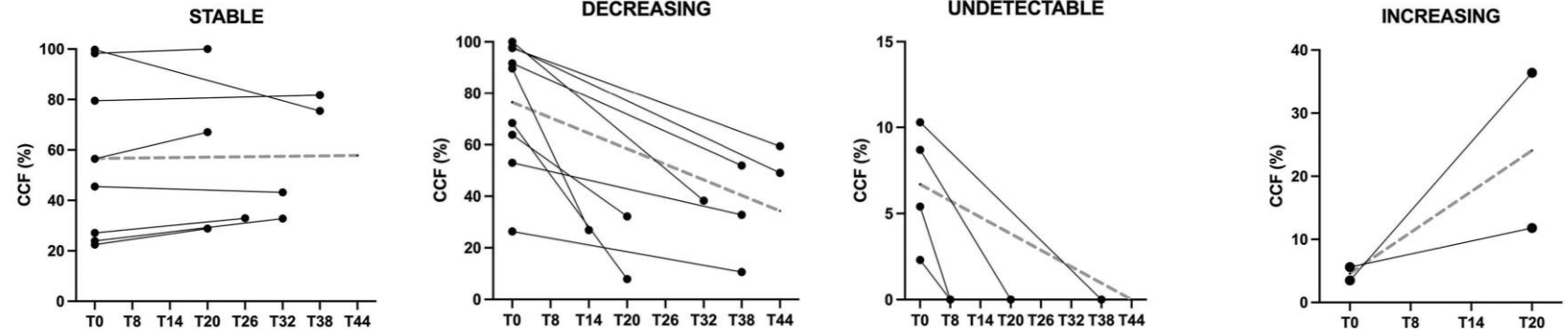
TP53 WT
 Mut < 10 %
 Mut > 10%

**Valeur pronostique défavorable
 quelques soit la taille du clone**

Technique NGS avec un seuil de 1% +++

Pas d'évolution clonale sous ibrutinib

Etude longitudinale
44 TN
14 R/R
Suivi médian 3 ans



Cafforio, Hematologica 2022

- Pas de changement de la proportion du clone avant et après ibrutinib (chez les TN et les R/R)
- Même évolution des clones « majeurs » et « mineurs »

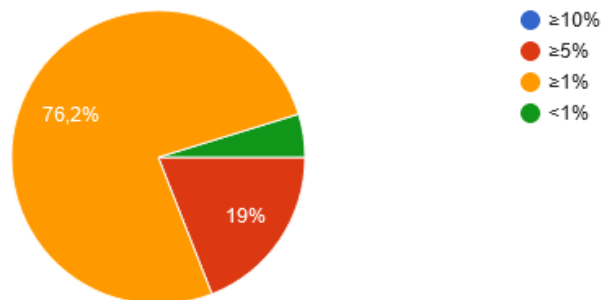
Quel impact des différentes anomalies de TP53 avec les thérapie ciblées? Taille des clones, clones multiples, délétion VS mutation ...

Rendu des résultats | Seuil de VAF

Limite de détection des laboratoires

5% des laboratoires ont un seuil à 0,5%
67% ont un seuil à 1%
28% ont un seuil à 2%

Seuil de VAF rendu au clinicien



Point de vue clinicien

60% des cliniciens ne tiennent pas compte de la VAF rendue pour le choix thérapeutique

20 % des cliniciens considèrent que le variant contre indique la chimio si la VAF est >5%

La présence d'une mutation de TP53 influence le choix entre un BTKi et un BCL2i pour 80% des cliniciens

Ce qui est fait dans nos laboratoires

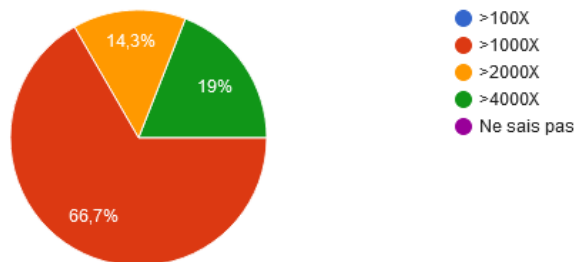
Enquête AstraZeneca

- Séquençage NGS sur plateforme Illumina ou Ion torrent
- Soit dans un panel dédié (TP53 seul), soit panel multigènes incluant TP53 (commerciaux ou maison)
- Séquençage des exons 4 à 10 à minima
- Comprenant les sites de splicing

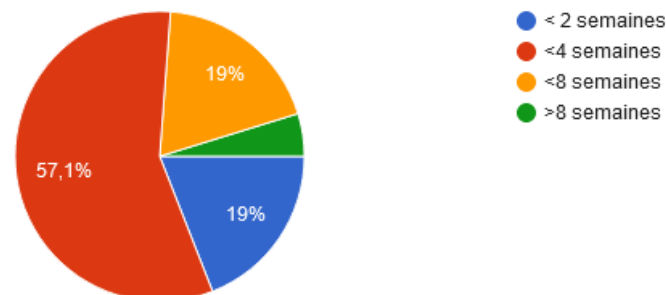
Point de vue clinicien

- 20% des cliniciens ne savent pas quelle technique de séquençage est utilisée
- Pour 30% des cliniciens, la technique de séquençage n'est pas importante

Profondeur moyenne en X



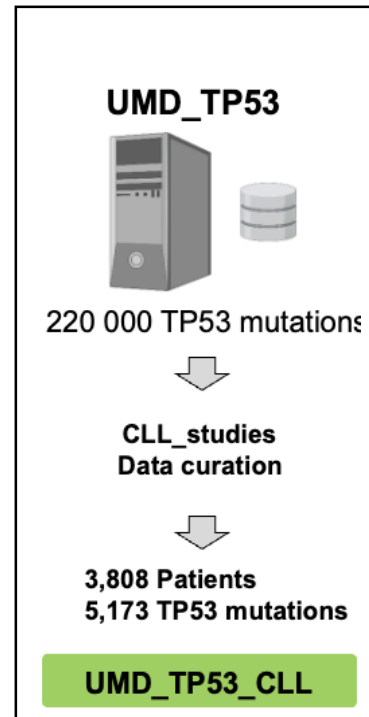
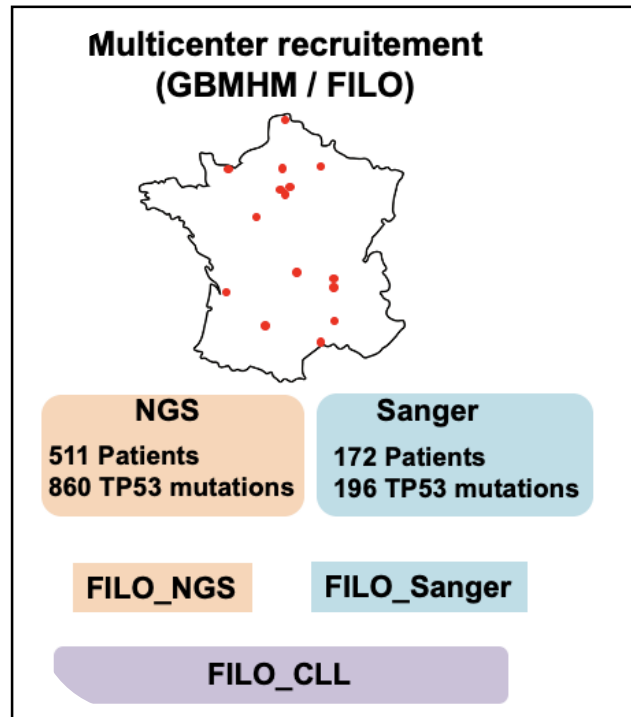
Délais de rendu



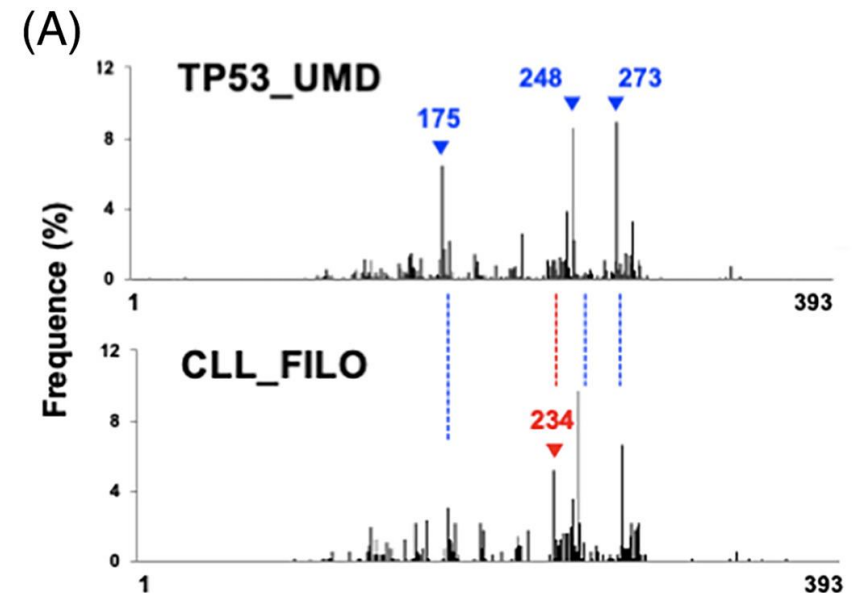
Quel retentissement des anomalies de TP53?

- Mutations uniques vs multiples
- Profil des mutations
- Le type de mutation
 - Mutation faux sens
 - Non sens
 - Épissage
 - Indel avec décalage de lecture

Profil mutationnel de la LLC



Distribution des mutations
Comparaison avec les autres cancers
Types de mutations
Hotspot
Profil des VAF

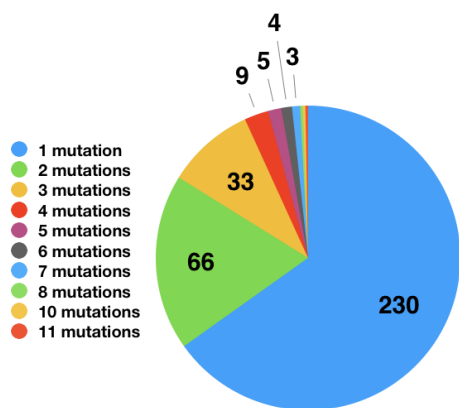


Etude rétrospective GBHM/FILO
1056 variants (chez 683 patients)

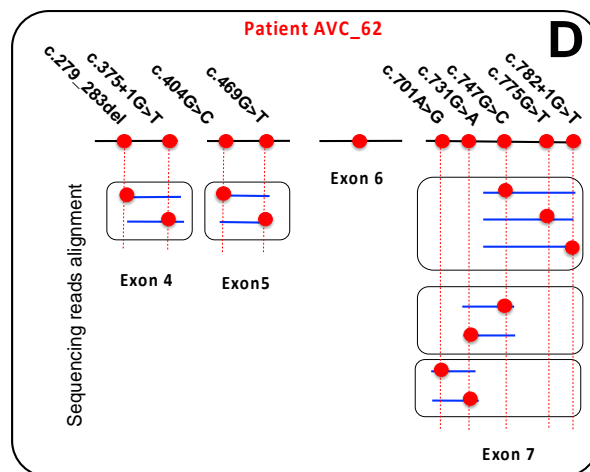
Fréquence élevée de mutations multiples de TP53

Hétérogénéité clonale

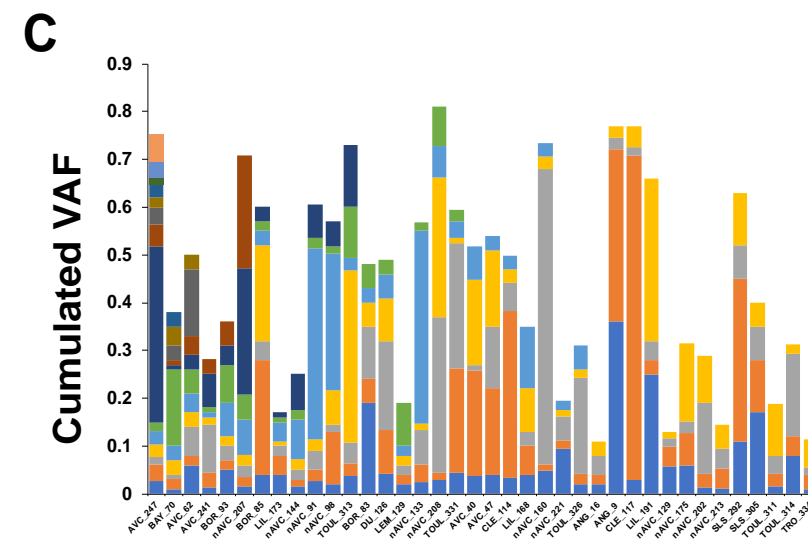
30 % des patients avec plus de 2 mutations de TP53



Les variants multiples sont sur des allèles différents (clones différents)



Répartition des VAF



38 patients ont plus de 4 variants

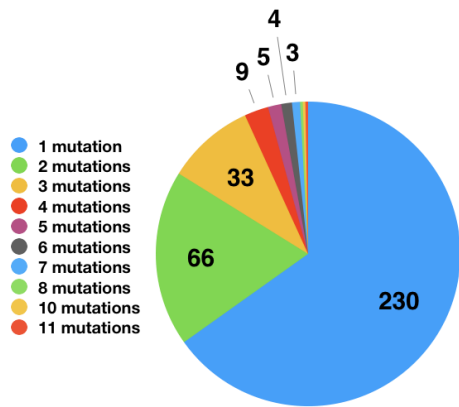
Addiction aux mutations de *TP53*

50% des patients sans délétion 17p

Les mutations de TP53 sont pourvoyeuses d'évolution clonale

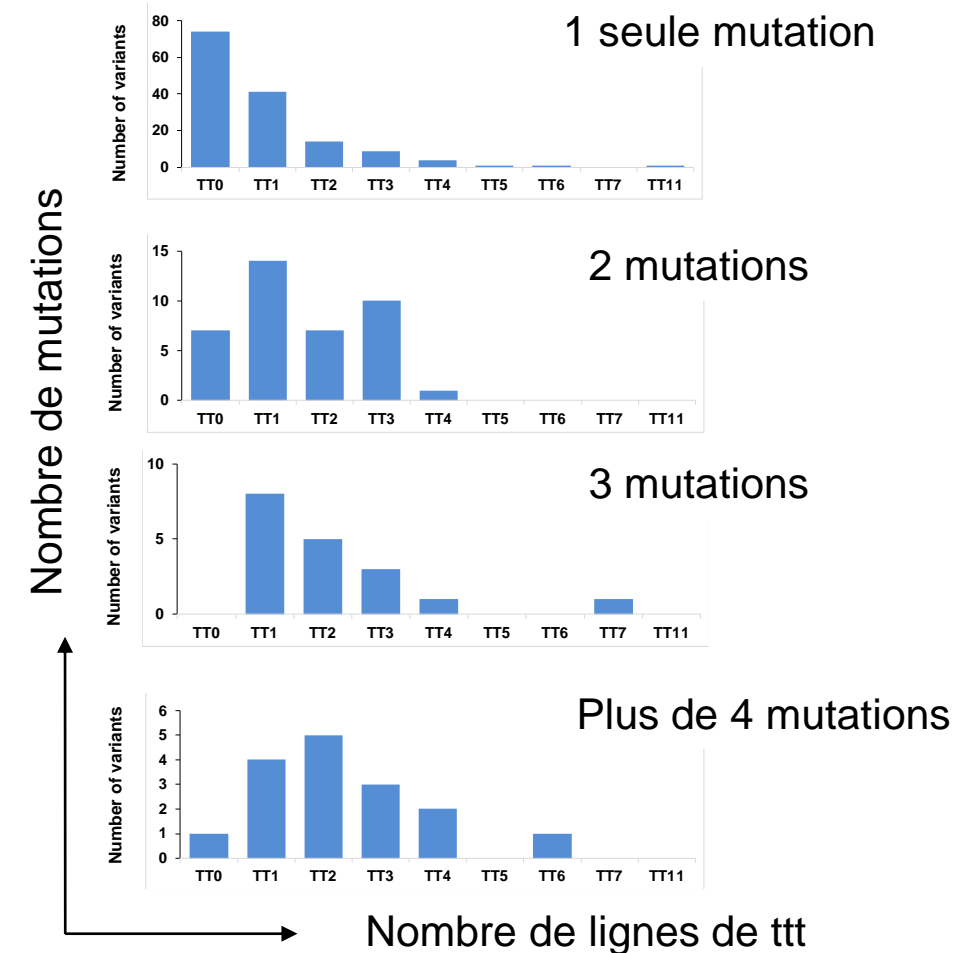
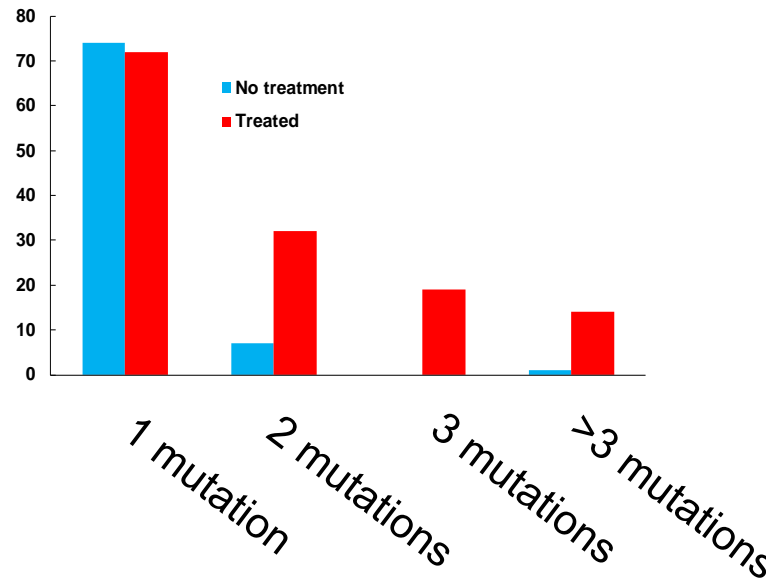
Hétérogénéité clonale

30 % des patients avec plus de 2 mutations de TP53



Effet du traitement sur le nombre de mutation

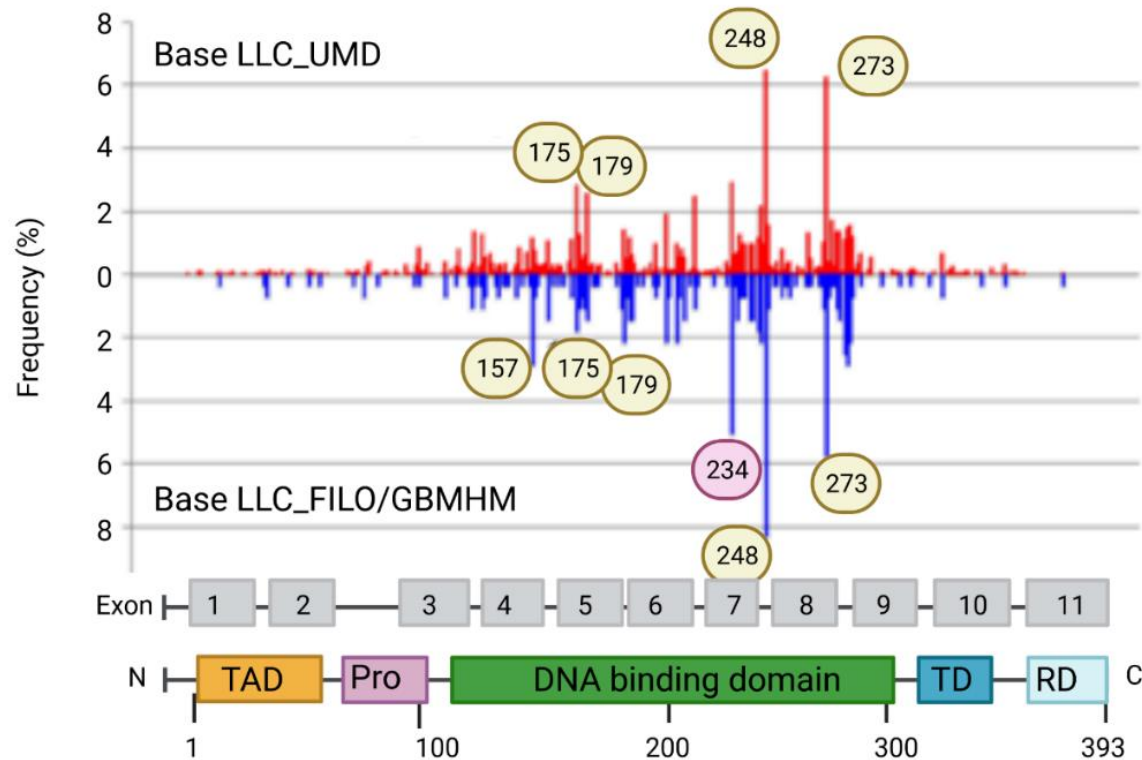
Traité vs non traité



Augmentation du nombre de mutations avec les lignes de traitement

Les différentes mutations de TP53

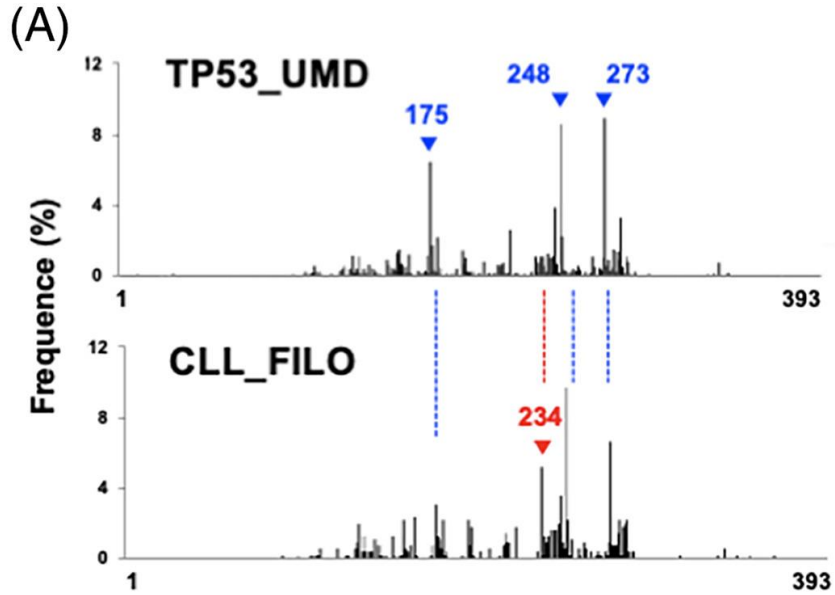
Distribution des mutations



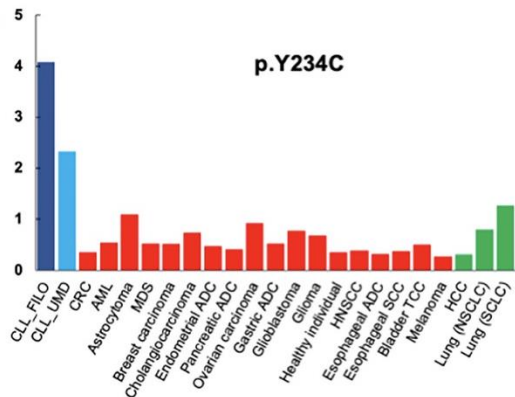
- Étude rétrospective GBHM/FILO
- 1 056 variants (chez 683 patients)
- Mutations dans le domaine de liaison à l'ADN
- Faux-sens essentiellement

Certaines mutations spécifiques dans la LLC

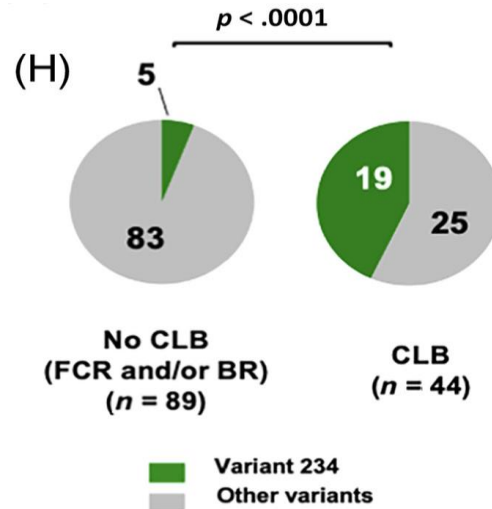
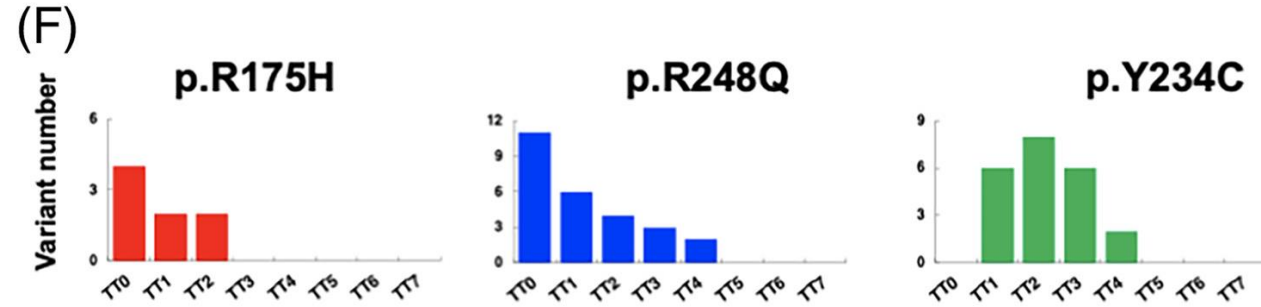
Hotspot Y234C chez les patients traités par chloraminophene



6% des patients avec mutation Y234



Fréquence élevée dans la LLC

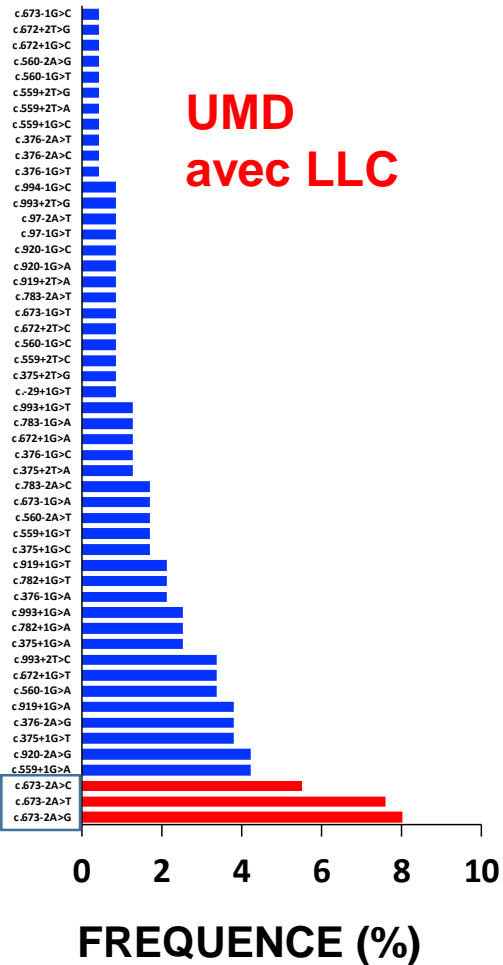


43% des patients traités par CLB ont une mutation Y234

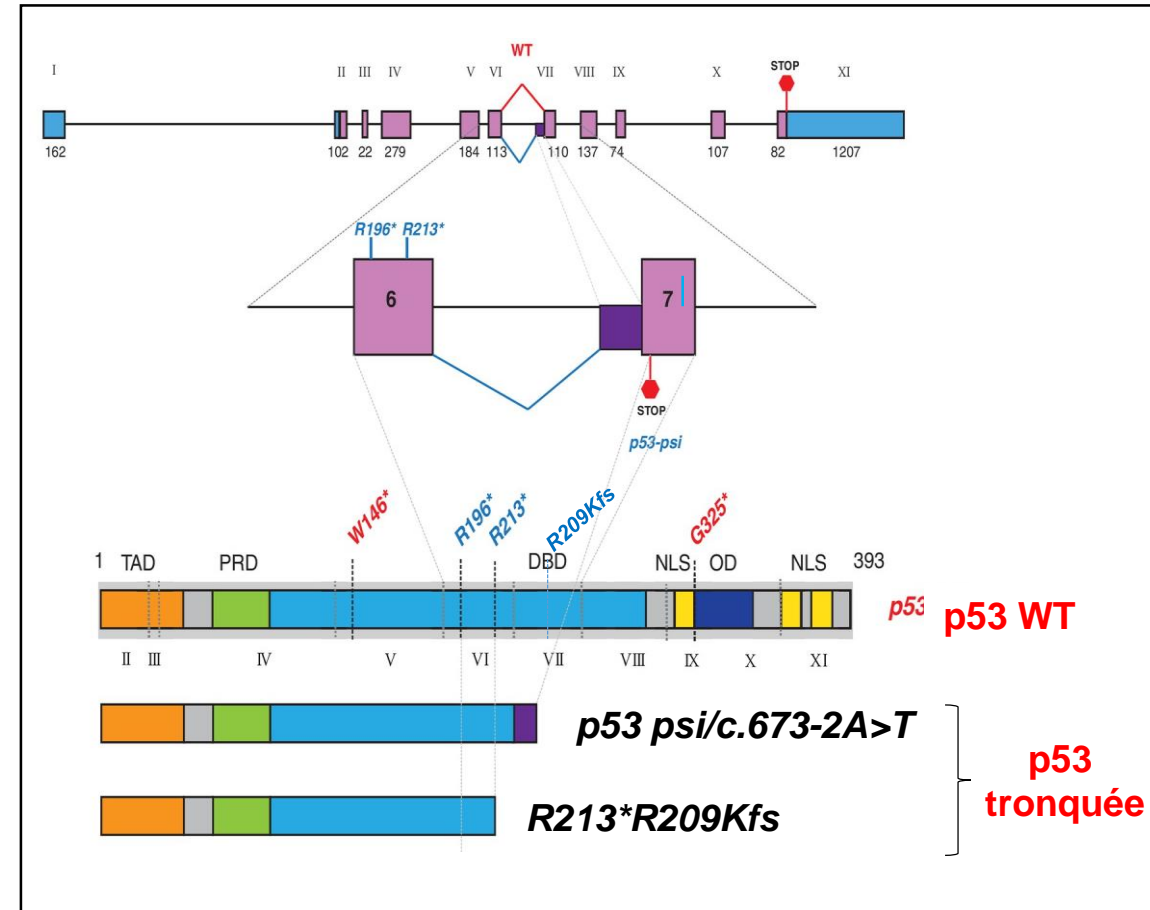
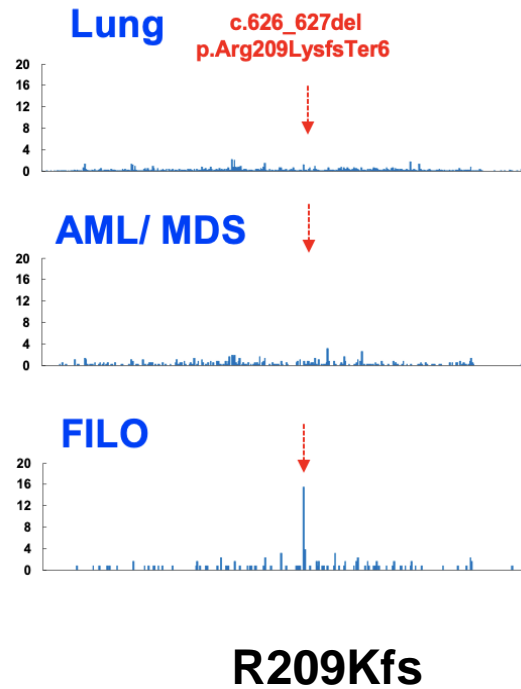
Identification de variants tronquant p53 spécifiques de la LLC

Hotspot variant d'un site de splicing

UMD avec LLC



Hotspot indel

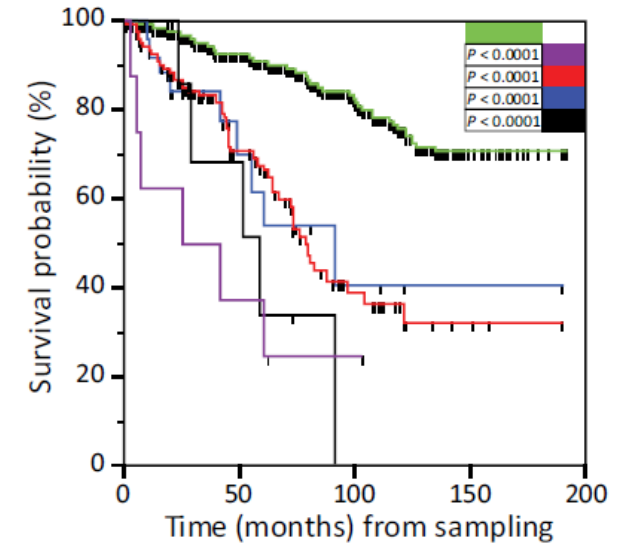
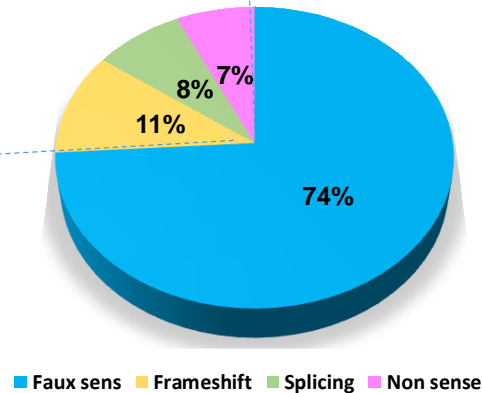


Propriétés oncogéniques des variants tronqués ?

Pas de différence pronostique en fonction du type de mutation

Mutations dites « null »
Perte d'expression

- Mutation non sens (Stop)
- Mutation avec décalage du cadre de lecture
- Mutation de splicing
- Del(17p)



WT	1,052	514	170	29	0
Frameshift	26	9	3	1	0
Missense	125	53	16	2	0
Nonsense	9	4	0	0	0
Splicing	8	3	1	0	0

Expression d'une protéine mutée

- Mutation faux sens (missense)

Rendu des résultats | Interprétation des variants

Information sur le compte rendu

Préciser le type de variant :

- L'exon, le changement de nucléotide (c.), le changement d'acide aminé (p.)
- La VAF (%)
- Le type de mutation : Faux sens, Non sens, Indel, site d'épissage

Interprétation/Commentaire sur la pathogénicité du variant :

- Pathogène vs variant de signification indéterminée

Rapporter les clones multiples avec VAF correspondante pour chaque clone

Questions des cliniciens :

Harmonisation du compte rendu

Interprétation de la pathogénicité des variants

Base de données pour l'interprétation

TP53 Database (NCI)
Base UMD (>90 000 variants)

The *TP53* Database

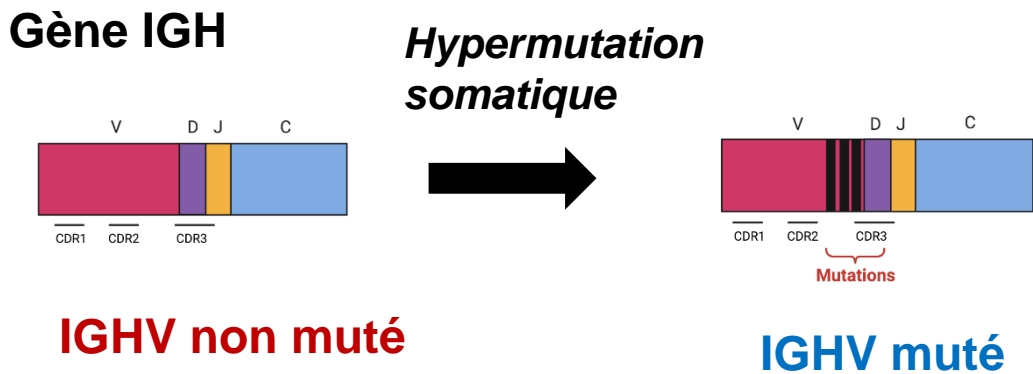
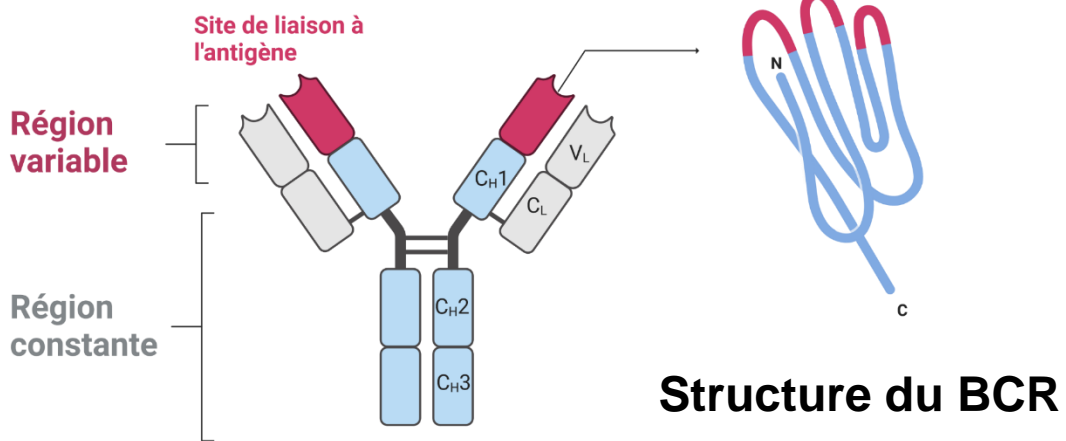
<https://tp53.isb-cgc.org/>



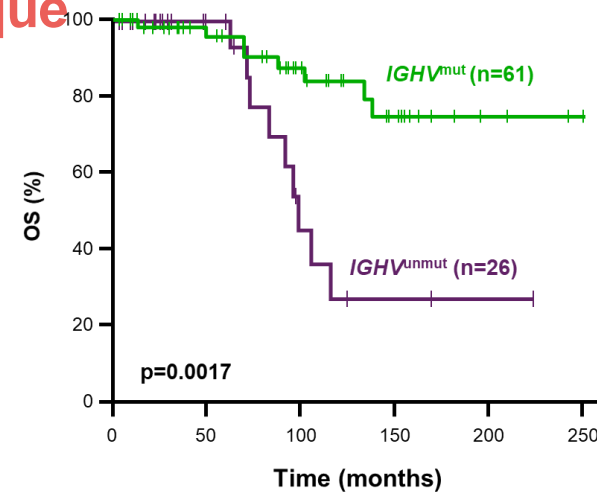
<https://p53.fr/tp53-database>

Statut mutationnelIGHV

Statut mutationnel IGHV : marqueur pronostique et théranostique

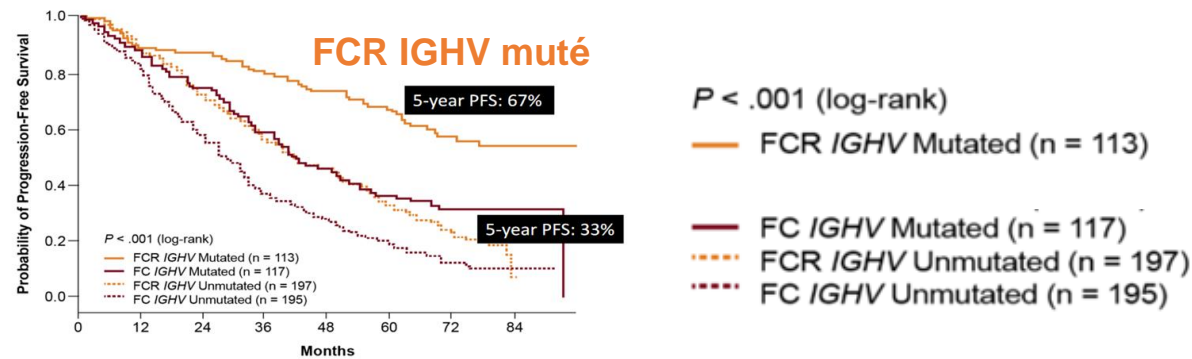


Marqueur pronostique



Vasconcelos Y, et al., J Clin Oncol 2003

Marqueur prédictif



Fischer et al. Blood 2016;127:208-15.

À quel moment réaliser le statut mutationnel IGHV ?

Au diagnostic ?

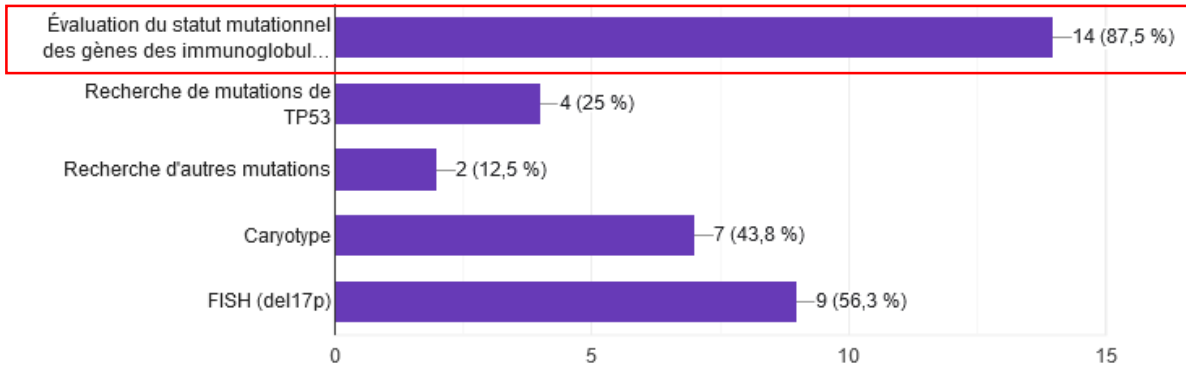
Avant la première ligne de traitement ?

Avant chaque ligne de traitement ?

A quel moment réaliser le statut mutationnel des IGHV ?

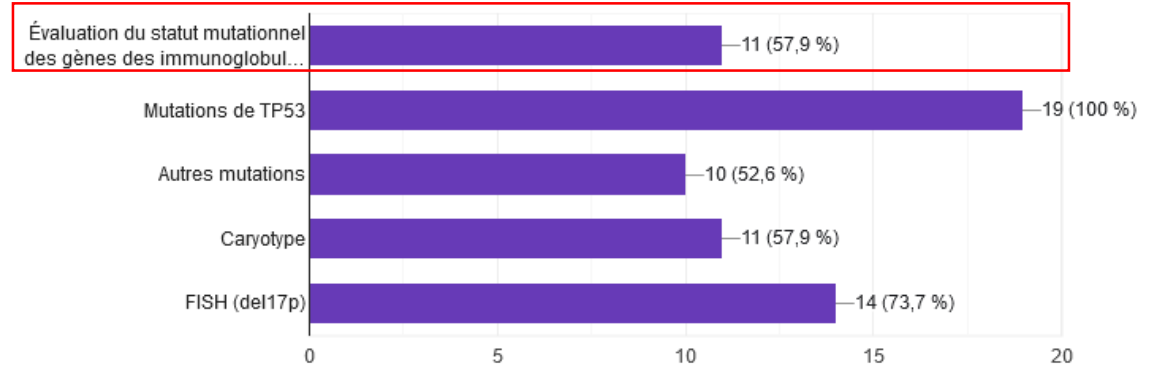
Au diagnostic

16 réponses



Avant traitement

19 réponses

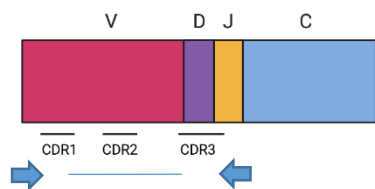


Statut mutationnel IGHV en pratique

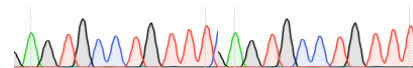
Extraction d'ADN tumoral à partir du sang



PCR FR1-JH



Séquençage



```
gagggtcagttggaggagctcggggaggcctgggcaagcctggggggctccctgagac
tctcctgtgcagcctctggattcaacctcagtagctatagcatgaactgggtcccgaggct
ccagggaagggcggagtggtctcctcattactatagtaggttacctatactacg
cagactcagtgaggggccgattctccctccagagacaacccaagaactcactglat
ctgcaaatgacagcctgcgagccgaagacagcggctgtgattactgtgcgagagatg
ccaacggtatggacgtctcggggcaaggg
```



Comparaison avec les séquences germinales des bases de données



IMGT



ARRest

Result summary:	Productive IGH rearranged sequence: (no stop codon and in-frame junction)		
V-GENE and allele	Homsap IGHV3-21*01 F	score = 1354	identity = 96.88% (279/288 nt)
J-GENE and allele	Homsap IGHJ6*01 F	score = 119	identity = 87.10% (27/31 nt)
D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis	Homsap IGHD2-2*01 E	D-REGION is in reading frame 2	
FR-IMGT lengths, CDR-IMGT lengths and AA JUNCTION	[25.17.38.4]	[8.8.9]	CARDANGMDVW

% identité

1. Alignment for V-GENE and allele identification

Closest V-REGIONS (evaluated from the V-REGION first nucleotide to the 2nd-CYS codon)

Accession	Gene	Score	Identity
AB019439	Homsap IGHV3-21*01 F	1354	96.88% (279/288 nt)
M99658	Homsap IGHV3-21*02 F	1345	96.53% (278/288 nt)
HM855323	Homsap IGHV3-21*03 F	1345	96.53% (278/288 nt)
HM855688	Homsap IGHV3-21*04 F	1345	96.53% (278/288 nt)
HM855336	Homsap IGHV3-48*04 F	1282	94.10% (271/288 nt)

Séquence VH

Position	CDR3-IMGT length	Molecular mass	pI	Physicochemical Descriptor (by BRFAA)
104-118	9	1,237.38	4.44	CARDANGMDVW

Séquence CDR3

Le statut mutationnel IGHV

% d'identité < 98 % : IGHV muté

% d'identité > 98 % : IGHV non muté

- Le réarrangement VDJ et le statut mutationnel des *IGHV* restent identiques tout au long de l'évolution de la LLC
- L'analyse peut être réalisée au diagnostic ou avant le traitement

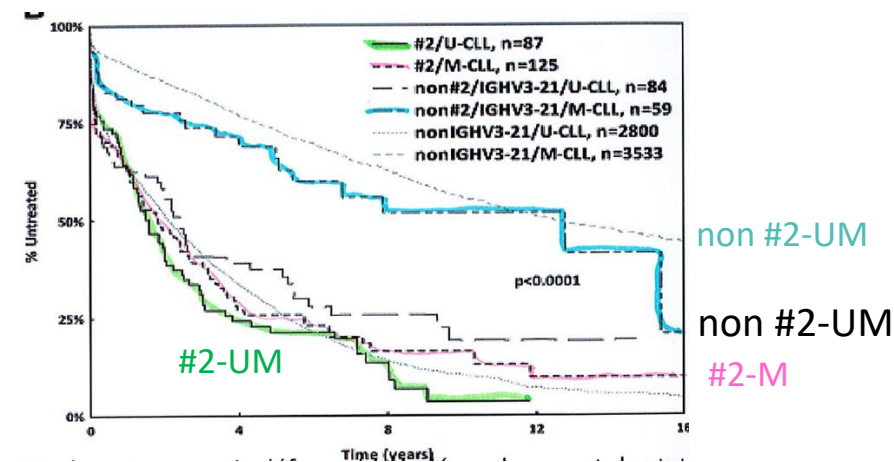
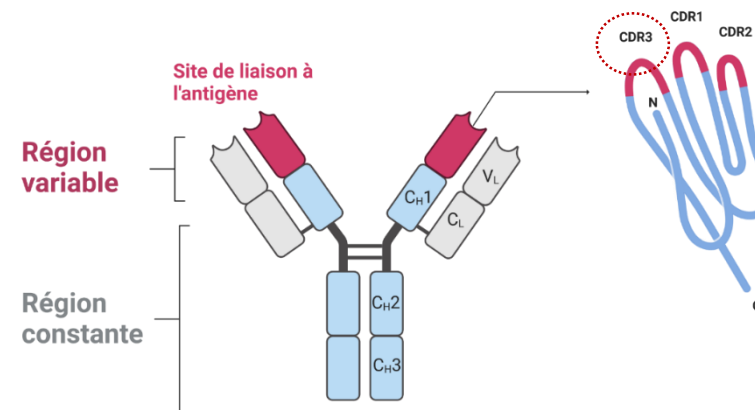
Statut mutationnel IGHV et séquences CDR3 stéréotypées

Présence de BCR quasi identiques, en particulier au niveau du CDR3 = **séquences stéréotypées**

Ces CDR3 sont regroupés en subsets en fonction de leur homologie

Subset	Prevalence (%)	IGHV usage	SHM and motif	Outcome
CLL #1	2.2	IGHV1/IGHD6-9/ IGHJ4	Low SHM QWL motif	Short time to first treatment and overall survival
CLL #2	2.5–3	IGHV3-21	High SHM	Poor
CLL #6	0.8	IGHV1-69/ IGHD3-16/IGHJ3	High	Clinically aggressive
CLL #8	0.5	IGHV4-39/ IGHD6-13/IGHJ5	Moderate to high	Highest risk of Richter transformation

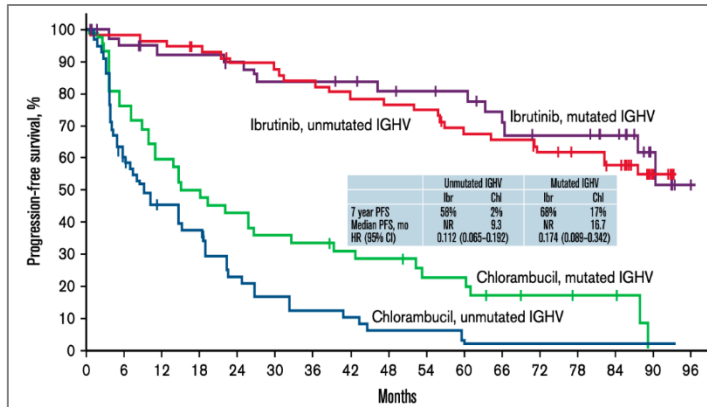
- Présence d'une séquence CDR3 stéréotypée **subset #2** associée à un mauvais pronostic indépendamment du statut mutationnel IGHV
- À rechercher systématiquement avec le statut mutationnel



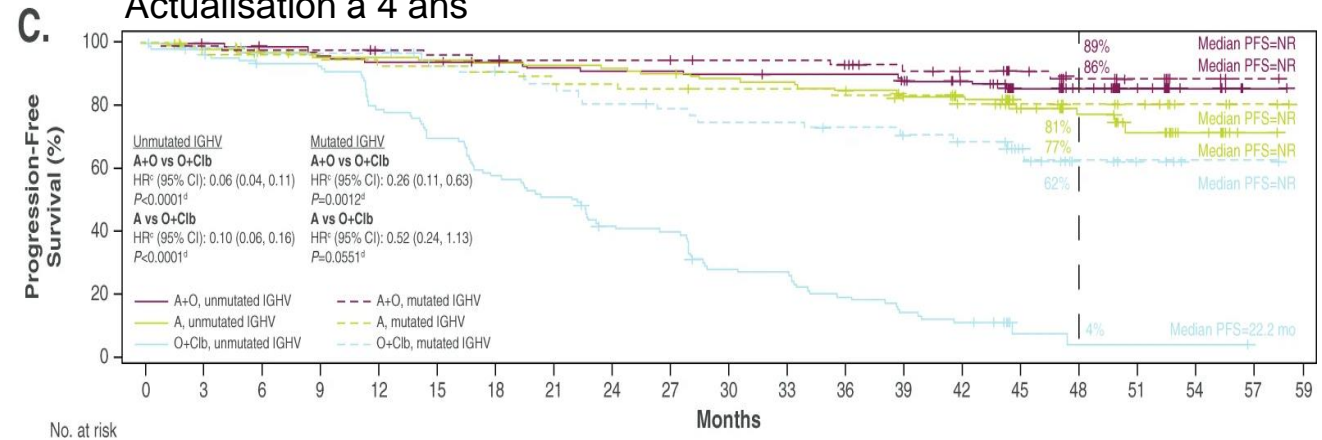
subset 2 IGHV muté défavorable
subset 2 IGHV non muté défavorable

Statut mutationnel IGHV et thérapies ciblées

RESONATE 2 Ibrutinib vs CLB Actualisation à 8 ans

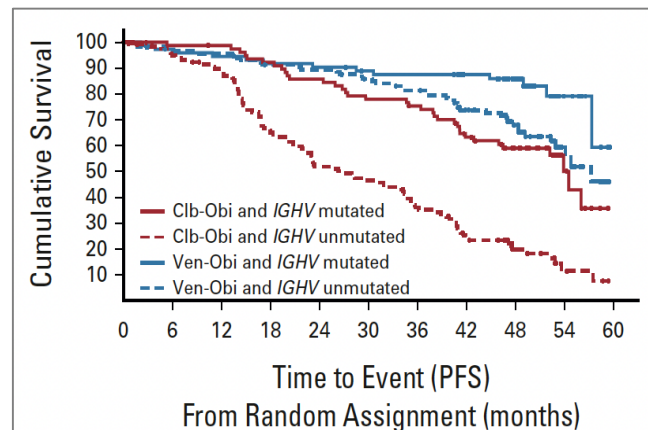
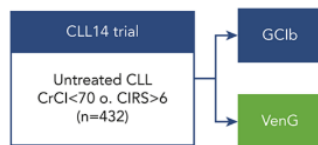


ELEVATE TN4 Acala +/- O vs CLB Actualisation à 4 ans



Pas de différence en fonction du statut avec BTKi

CLL14 G-Venetoclax vs G-CLB Recul de 4 ans



Les IGHV mutés répondent mieux au vénétoclax

Barr et al., Blood Advance 2022
 Sharman, Leukemia 2022
 Al Sawaf et al., J Clin Oncol 2021

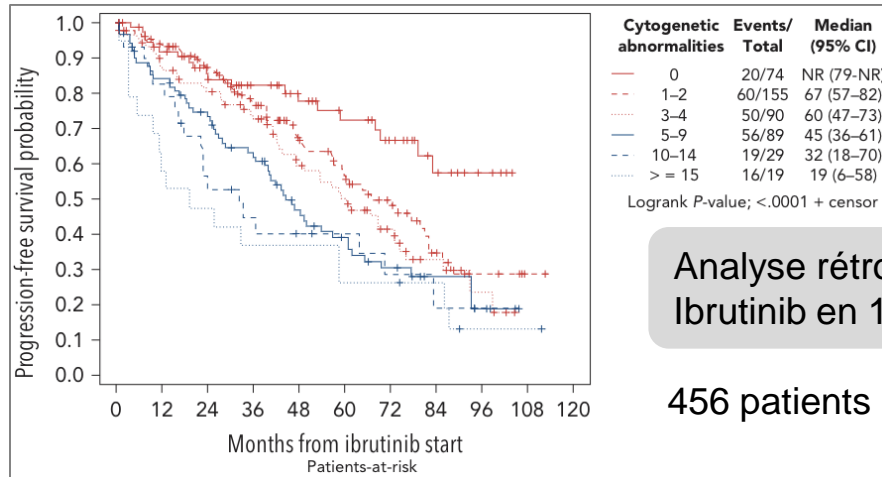
Caryotype complexe

Caryotype complexe

Définition du caryotype complexe

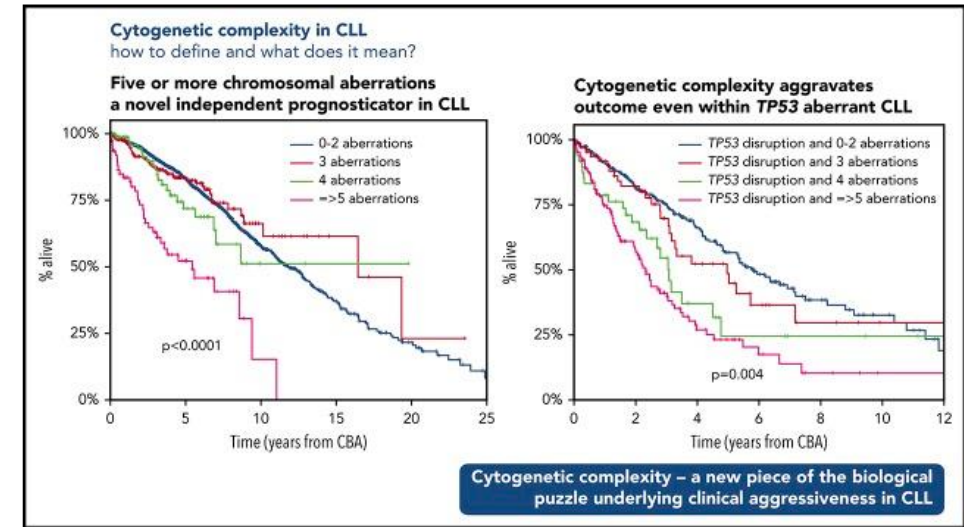
3 ou 4 anomalies : caryo complexe
 À partir de 5 anomalies (CK5) : très complexe

- Mauvais pronostic des caryotypes complexes
- Souvent associés aux anomalies de TP53
- Garde un impact pronostique avec les thérapies ciblées



Analyse rétrospective Ibrutinib en 1L ou R/R

Facteur prédictif de SSP et SG en analyse multivariée.



Baliakas Blood 2019

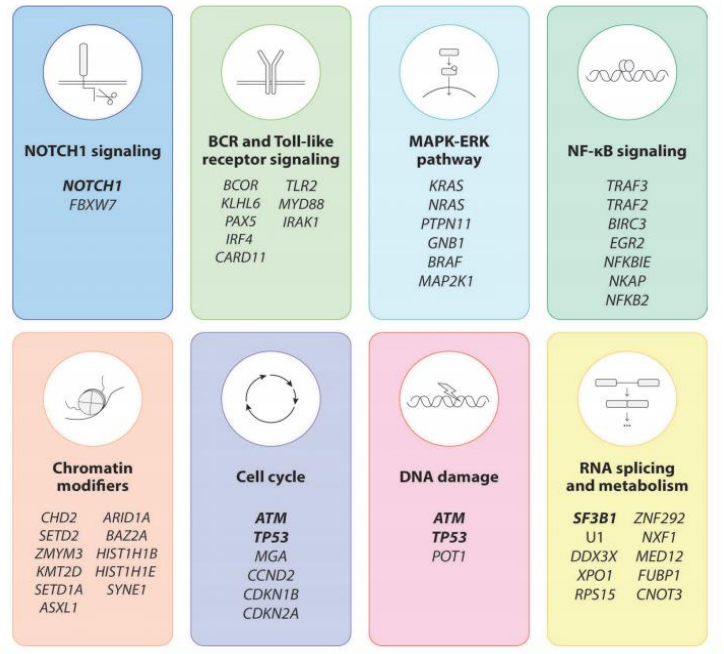
Comment et quand faire le caryotype ?

- Cytogénétique conventionnel en général (associé à une FISH del17p, +/-del11q)
- Recommandé avant traitement et avant chaque ligne (évolution cytogénétique)

Les autres mutations de la LLC

Les autres mutations de la LLC

Nombreuses mutations récurrentes



Delgado J, Hematology 2020

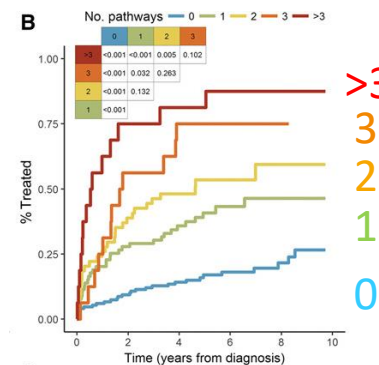
- Association de mutations complique l'interprétation de la pertinence clinique de ces mutations

Impact pronostique ?

- Etude HARMONY : Mutations associées à une diminution du TTFT (4580 patients)
 - Chez les IGHV non muté : **TP53, EGR2, BIRC3**
 - Chez les IGHV muté : **NOTCH1, NFKBIE**
 - Chez les deux : **SF3B1, XPO1**

Mansouri, Leukemia, 2023

- Analyse globale par voie biologique mutée plutôt que par mutation isolément ?



Nb de voie mutée

Facteur pronostic de la TTFT

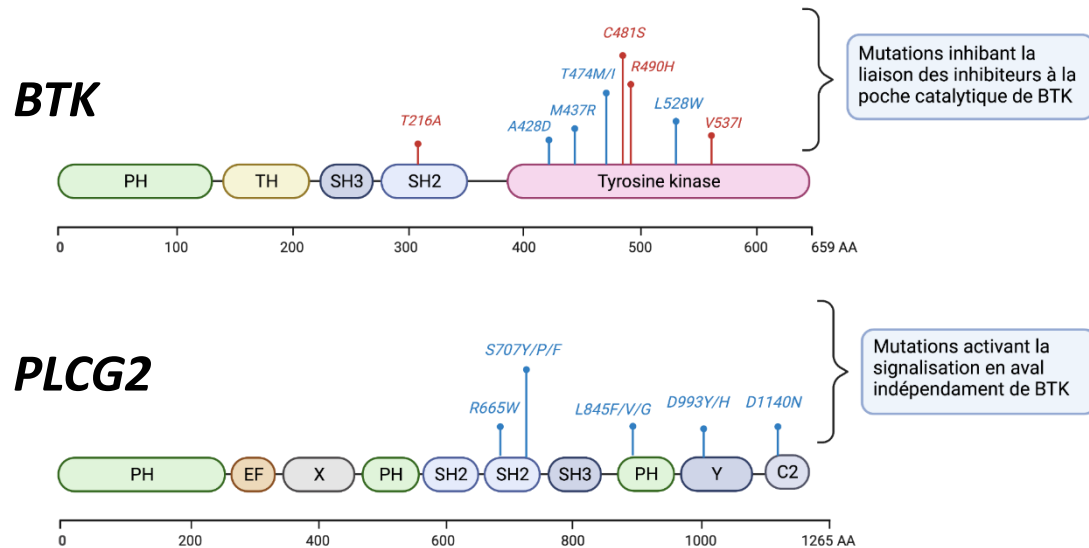
Brieghel, CCR 2020

- Mais pas de données réellement robustes pour le moment
- Pas d'indication à rechercher ces anomalies en dehors d'essais

Les mutations de résistance aux thérapies ciblées

Mutations de résistances aux BTKi

Présentes chez 80 % des patients réfractaires

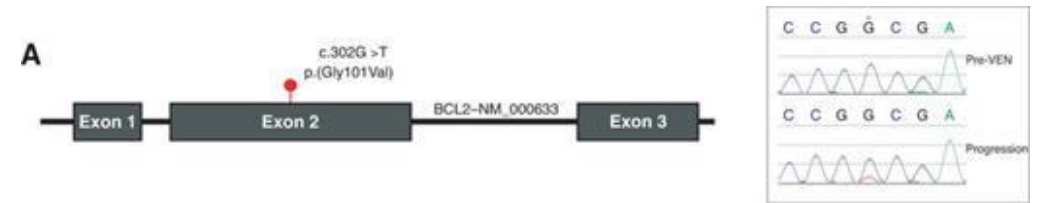


Apparition 2-3 ans après début du traitement
(médiane 34 mois)

À rechercher uniquement après traitement chez les patients progressifs sous BTKi/BCL2i

Mutations de résistances aux BCL2i

- Mutation de BCL2**



- Surexpression de MCL1 par amplification 1q**

Pour résumer

	Avant tout traitement	En rechute
Statut mutationnel IGHV	Une seule fois Rechercher les subsets 2 et 8	
Mutations du gène TP53	Obligatoire Avec une technique sensible (1 %)	À chaque ligne de traitement
FISH 17p13 et 11q22	Obligatoire	À chaque ligne de traitement
Caryotype (sang)	Recommandé	Recommandé
Mutation BTK, PLCG2	Jamais avant traitement	Si progression sous BTKi
Mutation BCL2	Jamais avant traitement	Si progression sous BCL2i

Pas de données matures pour les autres mutations