

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2014

2014 / TOU3 / 2020

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

obtenu après soutenance

du Mémoire du DIPLOME d'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

par

Yannick BONNEFOY

Né le 27 février 1986 à Toulouse

Détection et impact des mutations de STAT3 dans les syndromes
lymphoprolifératifs T et NK

Le 30 Avril 2014

Directeur de thèse : Professeur DELABESSE Eric

JURY

Président :	Professeur SIE Pierre
1er assesseur :	Docteur YSEBAERT Loïc
2ème assesseur :	Docteur DE MAS Véronique
3ème assesseur :	Docteur TREINER Emmanuel

Remerciements :

Mon président de thèse,

Monsieur le Professeur Pierre SIE

Vous me faites l'honneur de présider ce Jury. Je vous remercie pour votre enseignement et votre participation à ma formation professionnelle depuis le début de mes études à la faculté pharmaceutique de Toulouse. Merci de m'avoir accueilli pendant de nombreux stages au sein de votre service.

Mon directeur de thèse,

Monsieur le Professeur Eric DELABESSE

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de m'encadrer pour ce travail de thèse. Merci pour votre disponibilité et votre patience tout au long de ce travail. Vous avez su vous montrer constamment présent pour répondre à mes nombreuses questions.

L'ensemble des membres de mon jury,

Madame le Docteur Véronique DE MAS

Pour votre implication quotidienne dans la formation des internes du laboratoire d'hématologie biologique. Merci pour tout ce que vous m'avez appris pendant ces années d'internat.

Monsieur le Docteur Loïc YSEBAERT

Je vous remercie vivement d'avoir accepté de siéger dans ce jury de thèse.

Monsieur le Docteur Emmanuel TREINER

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie **Naïs PRADE** et toute l'équipe de biologie moléculaire (Cynthia, Magalie et Virginie) d'avoir gentiment pris le temps de me montrer les différentes techniques nécessaires à la réalisation de ce travail, en excusant toujours mes nombreuses étourderies.

Je remercie les Docteurs **Jill Corre, Cécile DEMUR, Frédérique DUBOIS, Eliane DUCHAYNE, Felipe GUERRERO, Sophie VOISIN** et **François « Quicky » VERGEZ** pour leur participation immense à ma formation.

D'un point de vue personnel je tiens à remercier :

Mes parents, pour m'avoir permis d'en arriver là, grâce à votre présence et votre écoute. Je vous suis reconnaissant pour votre soutien tout au long de mon enfance et de mes études.

Mes grands-pères (Denis et Jean), pour votre gentillesse et votre affection. Votre petit fils finit enfin ses études!

Mes grands-mères (Odette et Françoise), parties trop tôt, je ne garde que de bons souvenirs des moments partagés et je suis sûr que vous auriez été fières de moi aujourd'hui.

Mes beaux-parents, pour m'avoir accepté les bras ouverts au sein de la famille. Ne vous inquiétez pas, je prendrai soin de votre fille.

Mon poucet, pour ces neuf merveilleuses années de vie commune. Tu sais toujours être présente quand j'ai besoin de toi. Merci de m'apporter ton calme et ta bonne humeur quand mon tempérament râleur prend le dessus. Maintenant que ces années d'étude touchent à leur fin, nous allons enfin pouvoir nous installer et concrétiser de nouveaux projets.

Thibaut et Cyrielle, pour votre gentillesse, je vous souhaite le meilleur pour la suite !

Les Gaziens (Zegut, Claire, Jemilf, Mimile, Pitchot, Rémi O'connell la petite S de Leucate, Marion, Sabo la Baraque, Rami, Stayfun, Polo, Ju, Job, Ophé, Marr, Benjam, Somi, Jojo, Saumon, Mini Me, Jay et Elisa), mes ami(e)s, depuis notre rencontre sur les bancs du collège et du lycée, nous n'avons cessé de nous rapprocher. J'ai vraiment de la chance d'avoir une bande d'amis comme vous, je sais que l'on pourra toujours compter les uns sur les autres. Que notre vie commune soit longue et mouvementée, ne changez pas !

Les Mouss et Moussettes (Féline, Vincent, Rafa, Panda, Cat, Claudie, Gillou, Consmouss, L'oisi, Plombier, Margue, Mamouss, Greg The Leg, Bison, Annabs, Nono, Chisson* et Magalie), vieilles gloires de la faculté pharmaceutique de Toulouse, il a suffi d'à peine quelques semaines pour que l'on devienne amis. Grâce à vous tous, j'ai passé des années inoubliables! Dispersés aux quatre coins du monde, on trouve toujours le moyen se retrouver pour une bonne soirée, pourvu que ça dure (refrain Greg) !

Les Marsouins (Djo, Driksé, Bobby, Daph, Lolo H, Marius, Marie, Javier, Youporn), petit groupuscule sans relief, vous avez toujours vécu dans l'ombre des Mouss. Malgré cela, à force d'abnégation, vous avez fini par vous faire accepter de tous. Vous avez malheureusement perdu votre meilleur élément, le petit Chisson, qui, un soir de mercato, a décidé de rejoindre le niveau des pros. Je vous aime !

Chady et Joani, mes deux geeks préférés, les soirées Catane/dégustation de rhum sont toujours un plaisir. Je vous bogue tendrement.

Fabi et Yoan, merci de m'avoir accueilli comme votre propre enfant lors de vos vacances à la réunion. Il faut que l'on essaye de se voir un peu plus souvent, que je vois pousser le petit Gabriel !

Mes Co-internes (Carole Gogo, Jb nus, Yvanov, Mr Le Ministre, Jess, Aurelie, Coco, Armando, Ludovicus reste dormir, Camilf, Marie, Marie V, Raph, Patoche, Lucie, Carole, Sarah, Raphaëlle J, Meriem, Ikram, Romain, Gilles V, Laura, toutes les petites victimes du Baby : Hugo, David, Michal, John, Brice, Benoît), le travail avec vous est toujours un plaisir, votre bonne humeur a fait défiler ces quatre années à une vitesse folle ! Merci de m'avoir supporté au quotidien, ce n'est pas toujours facile. J'ai maintenant une armada de biologistes de renom dans mon carnet d'adresse, que je n'hésiterai pas à contacter pour une un avis ou une soirée!

Les Castrais (Nico Casa, Castoche, Steph, Thomas, Felix, Loulou, Nadim, Chloé, Léa, Maman Ramborde, Truc Minh), je garde de supers souvenir de ces six mois avec vous dans la campagne Tarnaise. Le mélange détonnant de fortes personnalités sous le toit de l'internat, nous a permis de passer des moments géniaux. Entre soirées improvisées (Nosa !) et sessions squash musclées, je ne me suis pas ennuyé une seule fois dans la cellule miteuse qui me servait de chambre.

I.	Introduction.....	13
II.	Le facteur de transcription STAT3.....	14
1.	Structure de la protéine STAT3.....	14
2.	Mécanismes de signalisation de STAT3	17
i.	Activation de STAT3.....	17
ii.	Régulation de l'activité de STAT3.....	19
iii.	Fonctions oncogéniques de STAT3.....	19
III.	Leucémie à grands lymphocytes à grains.....	21
1.	Grands lymphocytes à grains	23
i.	Mécanismes de cytotoxicité.....	23
ii.	Homéostasie des LGL	25
2.	Epidémiologie et incidence des leucémies à LGL	25
3.	Diagnostic clinique.....	25
4.	Diagnostic biologique	28
i.	Cytologie sanguine	28
ii.	Cytologie et anatomopathologie médullaire et splénique.....	28
iii.	Immunophénotypage	29
iv.	Recherche de clonalité.....	30
v.	Analyse cytogénétique.....	31
vi.	Stratégie diagnostique.....	31
5.	Physiopathologie de la leucémie à LGL	33
i.	Prolifération des LGL.....	33
A.	Première étape : stimulation antigénique ?	33
B.	Deuxième étape : amplification du signal d'activation par les cytokines	34
C.	Troisième étape : pérennisation du processus d'activation par dérégulation de l'apoptose	34
ii.	Cytopénies périphériques	35

iii. Manifestations auto-immunes.....	35
iv. Voies de signalisation impliquées	36
A. RAS-MAP2K1-MAPK1	36
B. PI3KCA-AKT1	36
C. NFKB1	36
D. IL-15.....	37
E. PDAP1	37
F. JAK-STAT	37
6. Traitements des leucémies à LGL.....	40
IV. Matériels et méthodes.....	42
1. Echantillons et patients sélectionnés	42
2. Réarrangement TCR γ	42
3. PCR High-Résolution-Melting (HRM).....	43
4. Séquençage.....	46
V. Résultats	47
1. Mise en place de la technique et validation des méthodes.....	47
2. Analyse des deux cohortes	49
i. Proliférations T clonales	49
ii. Proliférations LGL.....	49
3. Description des patients mutés.....	50
i. Patient 1 (mutation K658R, cohorte 1).....	50
ii. Patient 2 (mutation K658S, cohorte 1)	50
iii. Patient 3 (mutation Y640F, cohorte 1)	50
iv. Patient 4 (mutation Y640F, cohorte 1).....	51
v. Patient 5 (mutation Y640F, cohorte 1).....	51
vi. Patient 6 (mutation D661Y, cohorte 2)	51
vii. Patient 7 (mutation D661Y, cohorte 2)	52

viii. Patient 8 (mutation D661Y, cohorte 2)	52
ix. Patient 9 (mutation Y640F, cohorte 2)	52
x. Patient 10 (mutation Y640F, cohorte 2)	52
xi. Patient 11 (mutation Y640F, cohorte 2)	52
xii. Patient 12 (mutation Y657_K658insY, cohorte 2)	53
4. Analyse des 12 patients mutés	54
VI. Discussion	56
1. Présentation des résultats de Koskela et Jerez	56
i. Koskela <i>et al.</i> [2]	56
ii. Jerez <i>et al.</i> [3]	56
iii. Autres cas de mutations de STAT3	57
2. Comparaison des patients de la cohorte à ceux de la littérature.....	58
3. Intérêt pour le diagnostic	59
4. Intérêt pour le pronostic	60
5. Intérêt thérapeutique.....	61
VII. Conclusion.....	62
VIII. Bibliographie	63

Liste des abréviations

LGL: Large Granular Lymphocytes

CTL: Cytotoxic T Lymphocytes

NK: cellules Natural Killer

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

T-LGL: Leucémies à Grands Lymphocytes T à grains

CLPD-NK: syndromes lymphoprolifératifs chroniques à cellules NK

TCR: T Cell Receptor

APRF: Réponse de Phase Aigüe de l'Inflammation

RANTES: Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted

EGF: Epidermal Growth Factor

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

HGF: Hepatocyte Growth Factor

FGF2: basic Fibroblast Growth Factor

MMP: Matrix MetalloProteinase

LLC: Leucémie Lymphoïde Chronique

TNFSF10: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

HLA: Human Leucocyte Antigen

NKG: récepteur cellules NK

KIR: NK cell Inhibitory Receptor

KAR: NK cell Activation Receptor

NLS: Séquence de Localisation Nucléaire

OSM: Oncostatin M

SOCS: Suppressors Of Cytokine Signalling

PIAS: Protein Inhibitor of Activated STAT

EBV: Epstein Barr Virus

GZMB: Granzyme B

PRF1: Perforine

TNF: Tumor Necrosis Factor

LAL-B: Leucémie Aigüe Lymphoïde B

AICD: Activation-Induced Cell Death

HTLV: HumanT-cell Leukemia Virus
DCs: Cellules Dendritiques médullaires
CPA: Cellule Présentatrice d' Antigène
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
ITAM: Immuno-receptor Tyrosine Activation Motif
RAG: Recombination Activating Gene
CDR3: Complementarity Determining Region 3
CSH: Cellule Souche Hématopoïétique
GL: Ganglions Lymphatiques
G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor
CCL: chemokine (C-C motif) Ligand
ITIM: Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motif
ADCC: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
SS: Syndrome de Sezary
PCR: Polymerase Chain Reaction
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
PBL: Polyclonal B Lymphocyte
dNTP: DésoxyNucléotide TriPhosphate
Gb: Globules blancs
Hb: Hémoglobine
Plq: Plaquettes
PNN: PolyNucléaire Neutrophile
Om: Organomégalie
ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase
SMD: Syndrome MyéloDysplasique
AM: Aplasie Médullaire
BOM : Biopsie Ostéo-Médullaire

I. Introduction

La leucémie à grands lymphocytes à grains (LGL) est un syndrome lymphoprolifératif rare de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) ou de cellules natural killer (NK). La classification OMS 2008 des néoplasmes à cellules T et NK matures distingue trois formes de proliférations clonales à LGL. Les leucémies à grands lymphocytes T à grains (T-LGL), les syndromes lymphoprolifératifs chroniques à cellules NK (CLPD-NK) et les leucémies agressives à cellules NK[1]. Les T-LGL et les CLPD-NK ont une évolution indolente, principalement marquée par l'existence d'une cytopénie ou d'une pathologie auto-immune associée. Leur pronostic est conditionné par l'existence de complications infectieuses secondaires à la neutropénie.

Récemment, des mutations du gène codant pour la protéine STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) ont été rapportées par Koskela *et al.* chez 31/77 (40%) patients atteints de T-LGL, impliquant cette protéine dans les processus de prolifération et de persistance de ces cellules tumorales[2]. La protéine STAT3 est un facteur de transcription clé souvent muté dans les tumeurs.

Jerez *et al.* ont poursuivi ces recherches et ont montré que 33/120 patients (28%) atteints de T-LGL et 15/50 (30%) patients atteints de CLPD-NK portaient la mutation sur le domaine SH2 de la protéine STAT3 [3]. Les mutations de ce domaine ont pour conséquence une augmentation de l'activité protranscriptionnelle de la protéine STAT3. Le fait de retrouver des mutations communes du domaine SH2 de STAT3 dans les T-LGL et CLPD-NK suggère un mécanisme commun dans l'expansion et la persistance des cellules malignes dans ces deux sous-types de proliférations clonales à LGL.

Au cours de ce travail, nous allons rechercher la présence de ces mutations sur un premier groupe de 136 patients qui présentent un syndrome lymphoprolifératif clonal en TCR γ , et un second groupe de 32 proliférations LGL validées par cytométrie de flux et/ou cytologiquement. Ensuite, nous comparerons ces patients mutés avec ceux décrits dans la littérature. Enfin nous évaluerons l'utilité de cette recherche de mutation pour le diagnostic, le pronostic et le traitement de ces patients.

II. Le facteur de transcription STAT3

Dès 1994, STAT3 a été identifié comme étant une protéine s'associant aux éléments de réponse à l'IL-6 dans les promoteurs des gènes de réponse de phase aiguë de l'inflammation (APRF) suite à la stimulation d'hépatocytes par l'IL-6 [4]. De plus, il fut indépendamment identifié comme étant une protéine se fixant à l'ADN en réponse à la stimulation par EGF [5]. On sait désormais que STAT3 est impliqué dans de nombreuses signalisations cytokiniques (IL-6, IL-10, RANTES, EGF, PDGF...).

STAT3 appartient à la famille des facteurs de transcription STAT. Cette famille de protéines se compose de 7 membres (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT6 et les protéines apparentées STAT5A et STAT5B). Ces protéines possèdent deux caractéristiques principales : elles peuvent transmettre un signal au niveau du cytoplasme puis agir comme facteur de transcription dans le noyau.

Les interactions protéines-protéines induites par ces molécules reposent sur des résidus tyrosine dont la phosphorylation conditionne leur dimérisation. Elles peuvent former des homodimères (STAT3/STAT3) ou des hétérodimères (STAT1/STAT3). Après formation, les complexes sont rapidement acheminés dans le noyau par des protéines de type « importine » pour se lier à leurs séquences spécifiques et réguler les gènes cibles. Il existe à ce jour deux séquences consensus pour la fixation de STAT3 décrites dans la littérature. La séquence consensus la plus communément citée est «TTCCNGGAA » où N est un nucléotide quelconque [6]. La seconde séquence consensus, décrite plus récemment est la suivante: « TTCCRGG » ou R = G ou A selon le code IUPAC.

1. Structure de la protéine STAT3

STAT3 est une protéine de 92 kDa, longue de 770 acides aminés et codée par un gène localisé sur le chromosome 17q21. Cette protéine possède deux isoformes issues d'un épissage alternatif et présentant des fonctionnalités différentes. La première isoforme, la plus longue, est nommée STAT3 α et possède l'intégralité des domaines protéiques nécessaires aux fonctions de STAT3. On dénombre des domaines de type « coiled-coil » pour les interactions protéines - protéines, une séquence de localisation nucléaire (NLS) pour la translocation dans

le noyau, un domaine de liaison à l'ADN, un domaine SH2 qui permet l'interaction avec des tyrosines phosphorylées et un domaine de transactivation en position C-terminale. La seconde isoforme, nommée STAT3 β , est tronquée dans la partie C-terminale et ne dispose pas du domaine de transactivation important pour les fonctions effectrices de STAT3. A ce titre, STAT3 β a été considéré pendant longtemps comme étant un dominant négatif pouvant agir comme modulateur de la fonction de STAT3 α en formant des hétérodimères inactifs. Pourtant des données récentes attribuent à STAT3 β un rôle de substitut à STAT3 α qui pourrait parfois prendre en charge certaines de ses fonctions [7].

STAT3 possède deux sites de phosphorylation différents au niveau des Tyrosine 705 (Y705) et Sérine 727 (S727) et un site d'acétylation au niveau de la Lysine 685 (L685) qui vont conditionner l'activité de STAT3. STAT3 est activé par de nombreuses cytokines (IL-6, Oncostatin M (OSM), IL-10, TNF- α) [4], facteurs de croissances (EGF, PDGF) [8] et hormones. STAT3 est nécessaire au développement embryonnaire puisque les souris déficientes pour STAT3 ne survivent pas au-delà du jour 7 de l'embryogenèse [9].

En raison du grand nombre de protéines nécessitant STAT3 pour leur signalisation, ce dernier joue un rôle crucial dans de nombreux mécanismes biologiques incluant l'hématopoïèse, la survie cellulaire, la prolifération, l'angiogenèse mais aussi plus particulièrement dans l'inflammation, la transformation cellulaire et l'invasion tumorale. Par conséquent, STAT3 est considéré comme étant un oncogène [10]. En effet, une activation de STAT3 a déjà été décrite dans près de 70% des tumeurs solides et des pathologies hématologiques malignes [11].

Figure 1 : Représentation de la protéine STAT3 (Lin *et al.*, 2009)

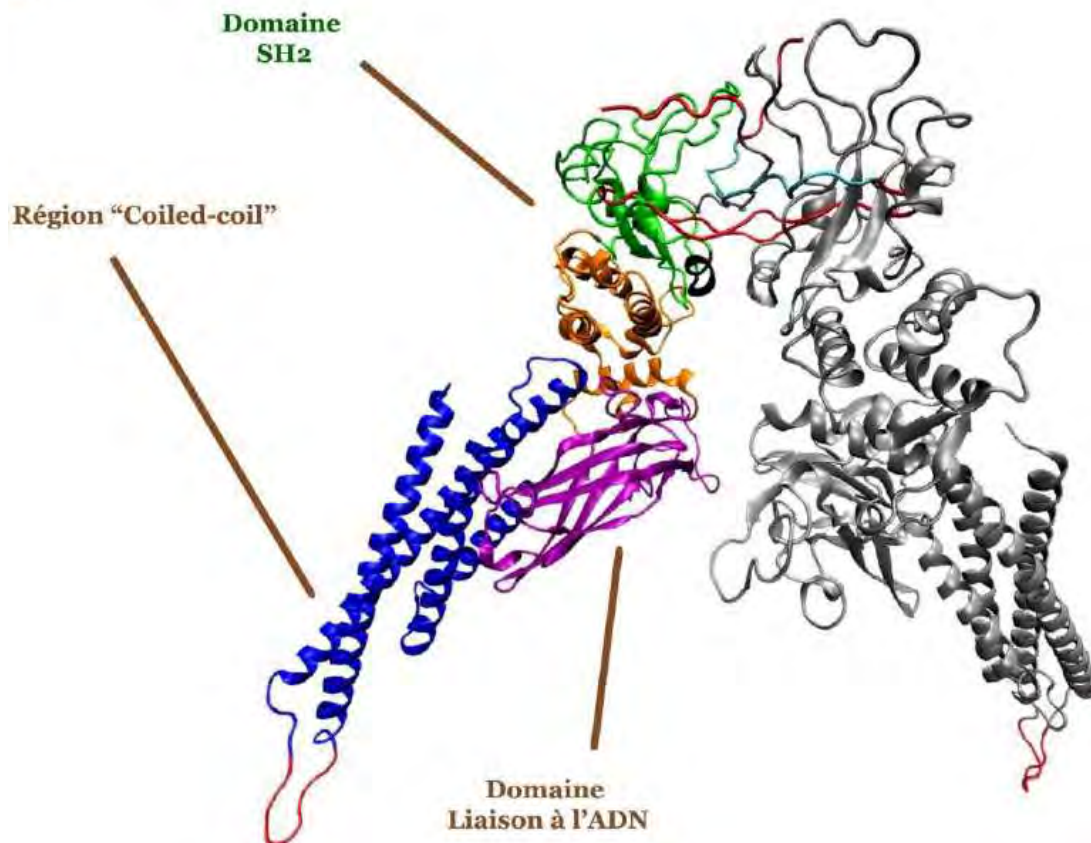
A. STAT3 possède un domaine « Coiled-coil » qui contient la séquence spécifique de localisation dans le noyau NLS. Le domaine SH2 est important pour la dimérisation de STAT3 et le domaine de transactivation contient les deux sites de phosphorylation influençant les fonctions de STAT3.

A.



B. Structure cristallographique en trois dimensions représentant un dimère STAT3. Le domaine «Coiled-coil » est représenté en bleu, le domaine de liaison à l'ADN en violet, le domaine SH2 en vert.

B.



2. Mécanismes de signalisation de STAT3

i. Activation de STAT3

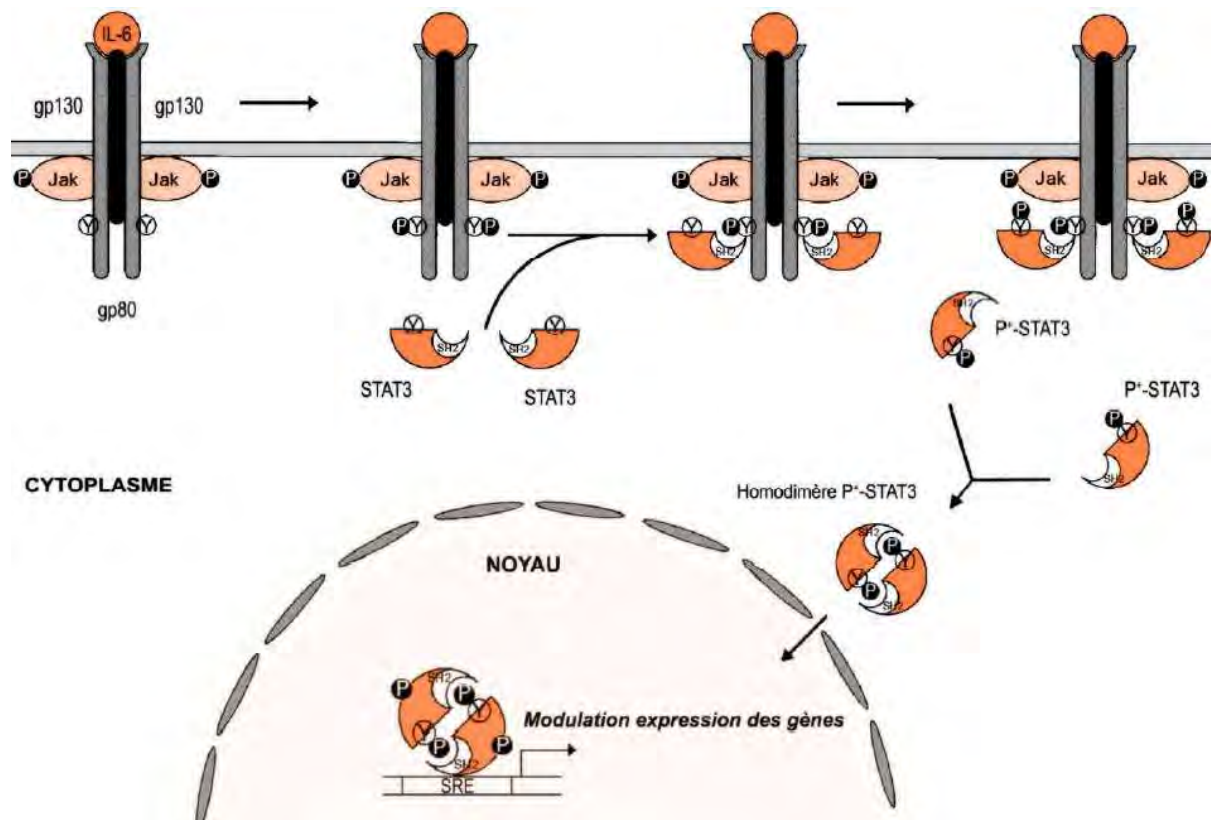
La signalisation des protéines STAT a été décrite dans un premier temps suite à des traitements par des cytokines en condition physiologique. STAT1 est par exemple nécessaire pour la signalisation de l'IFN- α alors que STAT3 est plutôt induit par les traitements à l'IL-6. Lors de la transduction du signal, les protéines STAT servent de point de convergence à trois voies de signalisation cellulaire médiées par les récepteurs aux cytokines (l'IFN- α , IL-6), les récepteurs aux facteurs de croissance (EGF, PDGF), et des tyrosines kinases non-liées à des récepteurs.

Puisque la plupart des récepteurs de cytokines ou facteurs de croissance ne possèdent pas de domaines à activité tyrosine kinase dans leur portion intracellulaire, ils s'associent à des tyrosines kinases pour transmettre leur signal après engagement de leurs ligands. Dans le cas des voies de signalisation impliquant STAT3, la famille préférentiellement utilisée est la famille des tyrosine-kinases JAK (Janus Kinase). Les tyrosine-kinases SRC et ABL peuvent aussi phosphoryler les protéines STAT.

On peut citer la transduction du signal de l'IL-6 comme exemple. La fixation de l'IL-6 dans la partie extracellulaire de son récepteur IL-6R entraîne l'activation des kinases JAK (JAK1, JAK2, JAK3) associées. Les JAK kinases se phosphorylent mutuellement puis stimulent la phosphorylation des résidus tyrosines présents dans la fraction intracellulaire du récepteur de l'IL-6. La formation de résidus tyrosines phosphorylés fournit une zone d'ancrage aux protéines possédant un domaine SH2, notamment STAT3 et STAT1. Le déplacement des monomères STAT3 inactifs à la membrane et à proximité des JAK kinases entraîne leur phosphorylation au niveau de la tyrosine Y705. Pour finir, les protéines STAT3 phosphorylées forment des homodimères. Cette dimérisation libère les domaines spécifiques de localisation dans le noyau NLS et le dimère STAT3 peut être transporté dans le noyau pour stimuler les gènes cibles associés [12].

Figure 2 : Activation et signalisation de STAT3 (Heinrich et al., 1998)

Après fixation du ligand (IL-6) à son récepteur, les kinases JAK présentes au niveau intracellulaire vont se phosphoryler mutuellement. Par la suite, elles vont phosphoryler les résidus tyrosine présents sur les chaînes intracellulaires du récepteur IL-6, ce qui va permettre le recrutement des monomères de STAT3 via leur domaine SH2. Le recrutement des monomères STAT3 catalyse leur phosphorylation sur les résidus tyrosine Y705 qui favorise l'homodimérisation de STAT3. Après dimérisation, la séquence NLS est reconnue et permet le transport du dimère actif dans le noyau. STAT3 peut alors exercer ses fonctions de modulation d'expression génique.



ii. Régulation de l'activité de STAT3

L'activation de STAT3 est régulée négativement par des nombreuses voies de signalisation. On compte les protéines SOCS (suppressors of cytokine signaling), PIAS (protein inhibitor of activated STAT) et les tyrosines phosphatases. Tout d'abord, les phosphatases (SHP-1, PTPRT) peuvent directement affecter l'état de phosphorylation des partenaires de STAT3 (JAK Kinase, partie intracellulaire du récepteur à IL-6) ou STAT3 lui-même. Deuxièmement, STAT3 active fortement l'expression des protéines de la famille SOCS. Ces protéines assurent un rôle d'« ubiquitine transferase » et catalyse l'ubiquitinylation des JAK Kinases. Les protéines ubiquitinylées sont ensuite dégradées par le protéasome, prévenant l'activation de STAT3. La dernière voie d'inhibition de STAT3 implique les protéines PIAS. Elles interagissent avec le dimère STAT3 et catalysent sa sumoylation. Cette modification prévient l'interaction de STAT3 avec l'ADN [13].

iii. Fonctions oncogéniques de STAT3

Les facteurs de transcription de la famille STAT jouent un rôle dans le développement, la prolifération et la survie des cellules tumorales. STAT3 est d'ailleurs le plus communément observé comme étant constitutivement activé lors de nombreux cancers. On le retrouve activé dans certaines hémopathies, telles que les leucémies à LGL, ainsi que dans de nombreuses tumeurs solides, comme le cancer du poumon, du sein, du rein, de la prostate, du pancréas, du colon, du foie, de l'ovaire, dans les cancers cervicaux et gastriques[11].

L'activation de STAT3 au cours de la transformation tumorale favorise les signaux de survie. STAT3 peut directement induire l'expression de BCL2L1, BCL-2 ou encore la BIRC5 [14] et compenser les signaux pro-apoptotiques qui devraient détruire les cellules instables et potentiellement dangereuses.

Le cycle cellulaire est activé par STAT3 et notamment la cycline D1 qui favorise l'entrée des cellules en phase de prolifération. L'ensemble de ces propriétés sont importantes pour la promotion cancéreuse associée à STAT3.

STAT3 est aussi capable d'affecter l'angiogénèse tumorale. L'activation constitutive de

STAT3 augmente l'expression du VEGF [15]. L'importance de STAT3 dans l'angiogenèse a pu être étayée par des modèles utilisant des siRNA ciblant STAT3. Dans ce contexte, les cellules transgéniques obtenues produisent moins de VEGF et une répression de la croissance tumorale était observée [16]. D'autres données montrent un rôle de STAT3 dans l'induction de Hepatocyte Growth Factor (HGF) dans le cancer du sein et du Basic Fibroblast Growth Factor (FGF2) dans les mélanomes, deux molécules fortement impliquées dans l'angiogenèse.

Enfin, le dernier point permettant de qualifier le rôle de STAT3 dans la tumorigenèse concerne les preuves de son implication dans les mécanismes de métastase et d'invasion cellulaire. A titre d'exemple, l'activation de STAT3 régule l'expression de MMP2. Ces endopeptidases zinc-dépendantes dégradent les éléments de la matrice extracellulaire, favorisant la libération des cellules tumorales de la structure matricielle et accentuent leur caractère invasif. STAT3 augmente la transcription de MMP2. La répression de STAT3 entraîne une répression significative de l'invasion tumorale dans des modèles de xénogreffes murines[17].

L'impact des mutations décrites dans les leucémies à LGL sera présenté dans le chapitre traitant de la physiopathologie de la leucémie à LGL.

III. Leucémie à grands lymphocytes à grains

Les grands lymphocytes granuleux (LGL) représentent une population physiologique de lymphocytes correspondant à 10 à 15 % des lymphocytes circulants totaux. Cytologiquement, ils se caractérisent par la présence d'un cytoplasme abondant riche en granulations azurophiles.

Les leucémies à LGL appartiennent au groupe des syndromes lymphoprolifératifs T et Natural Killer périphériques matures. Des proliférations chroniques de LGL ont été rapportées depuis 1975 [18] sous des appellations diverses, traduisant les incertitudes nosologiques : hyperlymphocytose chronique à cellules T, syndrome T, LLC T. Le terme de leucémie à LGL a été proposé par Loughran [19,20] pour désigner une maladie caractérisée par une prolifération monoclonale de grands lymphocytes à grains, infiltrant la moelle osseuse, la rate et le foie.

La classification OMS 2008 des néoplasmes à cellules T et NK matures continue de distinguer trois formes de proliférations clonales à LGL: les leucémies à grands lymphocytes à grains T (T-LGL), les syndromes lymphoprolifératifs chroniques à cellules NK (CLPD-NK) et les leucémies agressives à cellules NK [1].

Elles constituent une entité hétérogène aux caractéristiques immunophénotypiques, clonales et évolutives très différentes. Les proliférations chroniques à LGL distinguent selon leur profil immunophénotypique les leucémies T-LGL, les plus fréquentes, qui sont CD3+, CD8+, CD57+ (lymphocytes T cytotoxiques activés), les CLPD-NK qui sont CD3-, CD16+, CD56+, et les leucémies agressives à cellules NK qui sont aussi CD3-, CD16+, CD56+.

Les lymphocytes T CD8+ représentent la quasi-totalité de l'activité lymphocytaire T cytotoxique. Les lymphocytes T CD8+ naïfs se différencient, après la reconnaissance antigénique, en lymphocytes T mémoires et en lymphocytes T effecteurs ou CTL.

Les lymphocytes natural killer (NK) sont des LGL appartenant au système immunitaire inné au même titre que les mastocytes, éosinophiles et basophiles. Ils

représentent entre 5 et 20% de la population lymphocytaire totale. Ils ont la capacité apparemment spontanée à lyser des cellules tumorales ou infectées en l'absence d'immunisation spécifique préalable. Cette propriété les distingue des CTL, qui exercent, par l'intermédiaire de leur TCR, une cytotoxicité spécifique vis-à-vis de cellules présentant un épitope antigénique donné. Les cellules NK peuvent sécréter de nombreuses cytokines inflammatoires et disposent de mécanismes de lyse proches de ceux des lymphocytes CTL [21].

Les T-LGL et les CLPD-NK se caractérisent par une évolution indolente, une association étroite à des maladies auto-immunes et la présence de cytopénies fréquentes qui grèvent le pronostic de la maladie. Les CLPD-NK sont de diagnostic parfois difficile, l'identification du caractère clonal de cette expansion étant parfois impossible. Les rares leucémies agressives à cellules NK sont surtout observées au Moyen Orient, il s'agit d'une affection agressive de l'adulte jeune, étroitement liée à l'Epstein Barr Virus (EBV). La médiane de survie de cette affection grave est inférieure à 2 mois, cette forme est parfois difficile à distinguer des lymphomes extra-nodaux NK/T disséminés qui surviennent également dans les populations asiatiques infectées par l'EBV[22].

Les leucémies à LGL représentent 2 à 5 % des syndromes lymphoprolifératifs en Occident. Cette prévalence est plus forte en Asie où elle peut atteindre 9 %. Les formes les plus fréquentes sont les leucémies T-LGL CD3+ qui représentent environ 85 % des cas [19]. Les leucémies LGL doivent être distinguées des hyperlymphocytoses LGL poly- ou oligoclonales, parfois réactionnelles, pour lesquelles l'évolution maligne et tumorale est exceptionnelle. On peut par exemple observer des proliférations LGL transitoires lors d'infection virale (CMV, HIV, HCV) ou en post-chirurgie. De même, des proliférations oligoclonales sont parfois observées lors de traitement par des inhibiteurs de tyrosine kinase (Dasatinib ®) [23], ou après une greffe de cellules souches hématopoïétiques et d'organes solides.

Les leucémies agressives à cellules NK exceptionnelles en Occident ne seront pas développées dans cette thèse.

1. Grands lymphocytes à grains

Les grands lymphocytes granuleux (LGL) représentent une population physiologique de lymphocytes correspondant à 10 à 15 % des lymphocytes circulants totaux.

Malgré leurs importantes différences de fonction et d'origine, les CTL partagent de nombreuses caractéristiques avec les NK. Ils sont communément désignés ensemble comme des LGL cytotoxiques. Dans l'examen du frottis sanguin périphérique, les LGL se caractérisent par un cytoplasme abondant contenant des granulations azurophiles dans le cytoplasme. Ces LGL sont des effecteurs importants de la réponse immune. Ils surveillent activement les cellules infectées par un virus ainsi que les cellules tumorales. Après reconnaissance de la cellule cible, les LGL induisent son apoptose par différents mécanismes.

i. Mécanismes de cytotoxicité

Les LGL disposent de deux types de mécanismes de cytotoxicité pour induire la mort par apoptose de leurs cellules cibles spécifiques. Le premier mécanisme de lyse, fréquemment considéré comme majeur, correspond à la voie perforine/granzymes, qui est basée sur l'exocytose polarisée par le LGL du contenu de granules cytotoxiques. Ceci aboutit à la libération de protéines cytolytiques, dont les principales sont la perforine (PRF1) et les sérine-protéases de la famille des granzymes, notamment le granzyme B (GZMB). Après sécrétion par les LGL, le GZMB est internalisé dans la cellule cible par endocytose, de manière récepteur-dépendante, puis l'action de la perforine entraîne sa libération dans le cytoplasme où il va activer le programme apoptotique de la cellule cible[21].

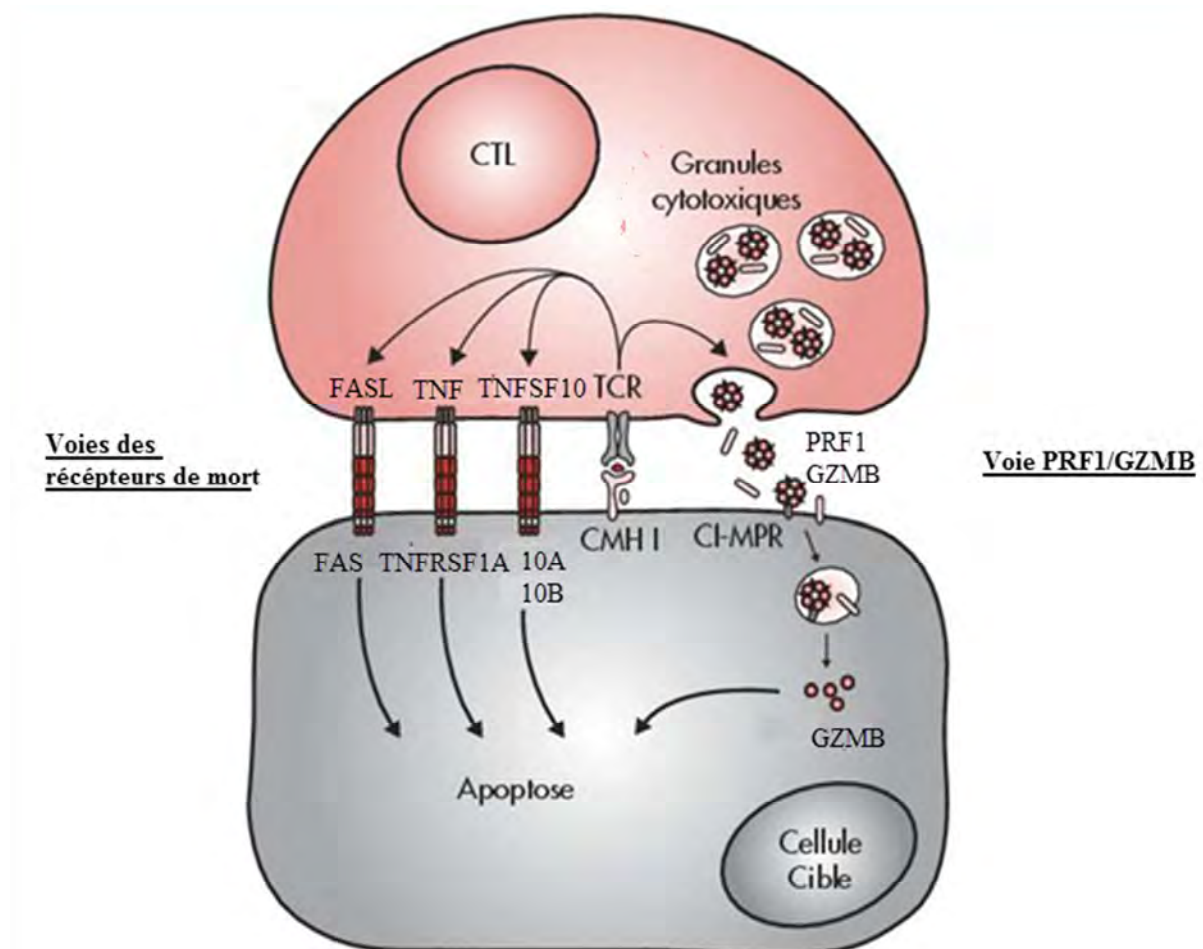
Le deuxième mécanisme de cytotoxicité utilisé par les LGL correspond à la voie impliquant des récepteurs à domaine de mort de la famille du récepteur au TNF (Tumor Necrosis Factor). Cette voie implique des ligands de la famille du TNF exprimés par les LGL activés (FASLG, TNF, TNFSF10), qui vont engager sur la cellule cible des récepteurs à domaine de mort appartenant à la famille des récepteurs au TNF (FAS, TNFRSF1A, TNFRSF10A, TNFRSF10B). Ces récepteurs de mort sont tous des protéines membranaires de type I, comportant dans leur partie extracellulaire de 2 à 4 domaines riches en cystéines, et dans leur partie cytoplasmique un motif d'environ 80 acides aminés appelé «domaine de

mort». Ce domaine confère aux récepteurs de mort la capacité de recruter et d'activer la caspase 8 après engagement par leurs ligands respectifs, via le recrutement de protéines adaptatrices interagissant avec cette dernière. Cette activation proximale de la caspase 8 va alors permettre de déclencher le programme de mort apoptotique de la cellule cible[24].

Ces mécanismes cytotoxiques pro-apoptotiques représentés dans la figure suivante pour les CTL sont communs aux cellules NK.

Figure 3 : Voies de cytotoxicité des CTL

Les CTL utilisent deux types de mécanismes de cytotoxicité pour tuer leur cellule cible spécifique : l'engagement de récepteurs de mort (FAS, TNFRSF1A, TNFRSF10A, TNFRSF10B) exprimés à la surface de la cellule cible, et l'exocytose du contenu de granules cytotoxiques (PRF1, GZMB).



ii. Homéostasie des LGL

L'homéostasie lymphocytaire est une balance entre prolifération et apoptose. Cette balance est nécessaire aux fonctions immunes et en cas de dérégulation peut conduire à des processus cancéreux ou auto-immuns[25]. L'activation et la prolifération du lymphocyte T naif est dépendant de la reconnaissance antigénique. En quelques jours, une prolifération importante provoque une augmentation des lymphocytes T spécifiques de l'antigène avec acquisition des fonctions effectrices [26]. Ces cellules activées sont éliminées après clairance antigénique par un processus de mort cellulaire induite par l'activation (AICD [*activation-induced cell death*])[25]. L'AICD permet de maintenir l'homéostasie des lymphocytes T. Un de ces mécanismes implique les récepteurs à domaine de mort, en particulier l'interaction FAS-FASLG qui induit l'apoptose.

Lors de l'activation des CTL, FAS et FASLG sont sur-exprimés pour préparer ces cellules à leur élimination après clairance de l'antigène cible. L'interaction FAS-FASLG a maintenant lieu à la surface et entre les CTL activés, provoquant ainsi l'apoptose des CTL et contrôlant ainsi leur prolifération.

2. Epidémiologie et incidence des leucémies à LGL

La leucémie à LGL est une pathologie rare qui représente seulement 2 à 5% des syndromes lymphoprolifératifs en Occident. En Asie, la prévalence est plus importante et s'élève jusqu'à 9%. Les T-LGL constituent 85% des leucémies à LGL, elles affectent les adultes entre 55 et 60 ans [19]. Les CLPD-NK sont plus rares mais surviennent sur un terrain similaire aux T-LGL [27].

3. Diagnostic clinique

Les leucémies T-LGL et CLPD-NK sont d'évolution indolente avec près d'un tiers des patients asymptomatiques au diagnostic [19]. La survie moyenne à dix ans est d'environ 70%. Leur présentation clinique est similaire dans la plupart des séries publiées [27]. Les signes généraux sont rares, le syndrome tumoral est plus fréquent avec une splénomégalie rapportée dans 20 à 50 % des cas selon les séries et une hépatomégalie plus rare avec une prévalence

inférieure à 20 %. Les autres signes cliniques éventuels sont secondaires aux cytopénies ou aux maladies auto-immunes associées.

Les infections récidivantes sont la conséquence de la neutropénie chronique parfois profonde (25% des patients ont une neutropénie < 0,5 G/L). Il s'agit majoritairement d'infections bactériennes touchant la sphère dermatologique, ORL, génito-urinaire ou broncho-pulmonaire. Les infections virales sont rares et les infections opportunistes exceptionnelles[28].

Les maladies auto-immunes sont fréquentes, rencontrées dans environ un tiers des cas. Il s'agit principalement de la polyarthrite rhumatoïde (25 à 30 % des cas) avec une forte liaison au cluster HLA-DR4 tel que cela est observé dans le syndrome de Felty (qui est défini par la triade polyarthrite rhumatoïde (PR), splénomégalie et neutropénie), ce qui laisse supposer un même spectre pathogénique. De nombreuses associations ont été rapportées avec d'autres connectivites : syndrome de Goujerot-Sjögren primaire, lupus érythémateux aigu systémique, sclérodermie, thyroïdite, maladie coéliqua [29]. Parmi les cytopénies auto-immunes, en dehors de la neutropénie qui est la plus fréquente (61% des patients), des associations ont été décrites avec des anémies hémolytiques auto-immunes, des purpuras thrombopéniques immunologiques, des aplasies médullaires et des érythroblastopénies.

Les autres pathologies associées concernent les hémopathies lymphoïdes B avec une prévalence de 5 % environ, les myélodysplasies et les néoplasies solides qui restent rares [27,29].

Tableau 1 : Pathologies associées aux leucémies LGL

Maladies auto-immunes

- Polyarthrite rhumatoïde
- Vascularite
- Endocrinopathie
- Syndrome de Goujerot-Sjögren
- Glomérulonéphrite
- Maladies inflammatoires chroniques intestinales

Cytopénies auto-immunes

- Aplasie médullaire
- Anémie hémolytique
- Purpura thrombopénique idiopathique
- Syndrome d'Evans

Néoplasies

- Hémopathies lymphoïdes B
 - o Lymphome non Hodgkinien
 - o Lymphome de bas grade
 - o Lymphome B diffus
 - o Leucémie lymphoïde chronique
- Myélome multiple
- Myélodysplasie
- Leucémie aigüe myéloïde

4. Diagnostic biologique

i. Cytologie sanguine

Le taux physiologique de LGL est de 0,25 G/L [19]. Au cours des leucémies LGL, ce taux peut atteindre 10 G/L mais le diagnostic peut être posé en deçà de ces chiffres sous réserve que l'expansion soit chronique et monoclonale. Les lymphocytoses LGL transitoires réactionnelles aux infections virales n'excèdent généralement pas 0,4 G/L. La classification OMS 2008 retient pour le diagnostic une prolifération de LGL supérieur à 2 G/L pendant plus de six mois. Cependant dans le registre français des leucémies LGL, la lymphocytose à LGL est inférieure à 1 G/L chez plus d'un tiers des patients, ce qui peut rendre le diagnostic difficile[27]. Les analyses médullaires et la mise en évidence d'une clonalité permettent alors de conforter le diagnostic.

ii. Cytologie et anatomopathologie médullaire et splénique

L'infiltration lymphocytaire dépasse rarement 50 % des cellules nucléées. Les lignées mégacaryocytaire et érythroblastique sont sensiblement normales. La lignée granuleuse est souvent hypoplasique avec parfois un aspect d'arrêt de maturation au stade myélocytaire. L'envahissement médullaire est interstitiel et diffus. Le marquage par la protéine TIA-1 identifie les granules cytoplasmiques au sein des lymphocytes T CD8+ intra sinusoidaux. À cette infiltration T CD8+ s'associe une infiltration lymphoïde polyclonale B et T [30].

L'atteinte splénique est caractérisée par une infiltration de la pulpe rouge par les LGL et une hyperplasie folliculaire de la pulpe blanche. Les LGL sont identifiés par le marquage TIA-1, PRF1 et GZMB et ont un phénotype CD45RO⁻ et CD5⁻ (à la différence des LT spléniques qui sont CD5⁺). Au cours des hémopathies de phénotype NK, l'analyse anatomopathologique de la moelle osseuse et de la rate est très similaire à la différence près que les LGL sont des cellules NK de profil CD3⁻, CD8⁺, CD16⁺, CD56⁺.

iii. Immunophénotypage

Il est indispensable à la caractérisation de la leucémie LGL. Les T-LGL ont un profil de cellules post-thymiques matures activées : CD3+/TCR $\alpha\beta$ + /CD4- /CD8+ /CD5^{dim-} /CD27- /CD28- /CD45RO- /CD57+. Le TCR est typiquement $\alpha\beta$. Ils expriment constitutivement le récepteur β de l'interleukine-2 (IL2RB, CD122) mais pas le récepteur α de l'IL-2 (p55, CD25). L'expression de FAS (CD95) et du FASLG (CD178) est retrouvée dans la majorité des cas. Quelques formes de phénotype inhabituel sont décrites : CD4+ avec ou sans co-expression du CD8, TCR $\gamma\delta$ sans expression du CD8 dont la présentation clinique et le pronostic sont proches des LGL T CD3+ /CD4- /TCR $\alpha\beta$ +[31].

Les LGL de type NK présentent le phénotype suivant : CD3- /CD2+ /CD4- /CD8+ /CD16+ /CD56+. Le CD56 est caractéristique.

Tableau 2 : Immunophénotypage des leucémies à LGL.

Type de leucémie	Marqueurs phénotypiques	Variante
T-LGL	CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD8+CD57+	Formes rares exprimant le CD4 ou TCR $\gamma\delta$
CLPD-NK	CD3-CD8+CD16+CD56+	Expression du CD57 inhabituelle

iv. Recherche de clonalité

La recherche de clonalité est indispensable au diagnostic de leucémie LGL, le caractère polyclonal étant associé aux expansions LGL réactionnelles. Cette analyse est aisée dans le contexte d'expansion T-LGL à partir de l'étude du réarrangement du gène codant pour le TCR γ par PCR sur ADN génomique.

Le TCR γ est réarrangé précocement dans la différenciation lymphoïde T. Sa structure génomique est bien connue et le nombre limité de segments V γ et J γ permet l'amplification de la majorité des combinaisons de jonction V γ -J γ possibles avec un nombre restreint d'amorces (4 pour V γ et 3 pour J γ). Cette faible diversité jonctionnelle est à la fois un avantage, puisqu'elle facilite l'amplification PCR et un inconvénient, en rendant difficile la discrimination des réarrangements oligoclonaux. Une population polyclonale qui montre un réarrangement V γ -J γ rare peut, par exemple, être prise par erreur pour une population monoclonale. De même, une autre cause possible de faux positif est l'existence de réarrangements « canoniques » lors d'accumulation de LT $\gamma\delta$ qui présentent peu de diversités jonctionnelles différentes [32].

Elle peut aussi être réalisée de façon indirecte, à partir de l'analyse du répertoire v β par cytométrie de flux, avec une bonne concordance avec les résultats obtenus par biologie moléculaire. Ceci est parfois réalisé au laboratoire, mais nous ne disposons d'un résultat que pour de très rares patients.

L'identification d'une clonalité est plus complexe en ce qui concerne les expansions NK en l'absence de réarrangement du TCR. La mise en évidence d'une intégration clonale de l'EBV dans les leucémies agressives à cellules NK contribue à conforter le caractère monoclonal de la prolifération [33]. L'étude phénotypique des récepteurs à la surface des cellules NK a toutefois permis d'identifier certains récepteurs d'intérêt dans la recherche de clonalité. Ainsi, l'étude des récepteurs de type lectin C objective une surexpression de NKG2A, NKG2D et CD94. Au niveau des récepteurs KIR, il existe un déséquilibre net du ratio des récepteurs activateurs/inhibiteurs à la surface des cellules NK au profit des récepteurs activateurs qui sont surexprimés alors que certains récepteurs inhibiteurs, tels que

KIR3DL1, sont absents [34]. La recherche d'une clonalité NK, par analyse des récepteurs KIR en cytométrie, n'est pas réalisée au laboratoire.

v. Analyse cytogénétique

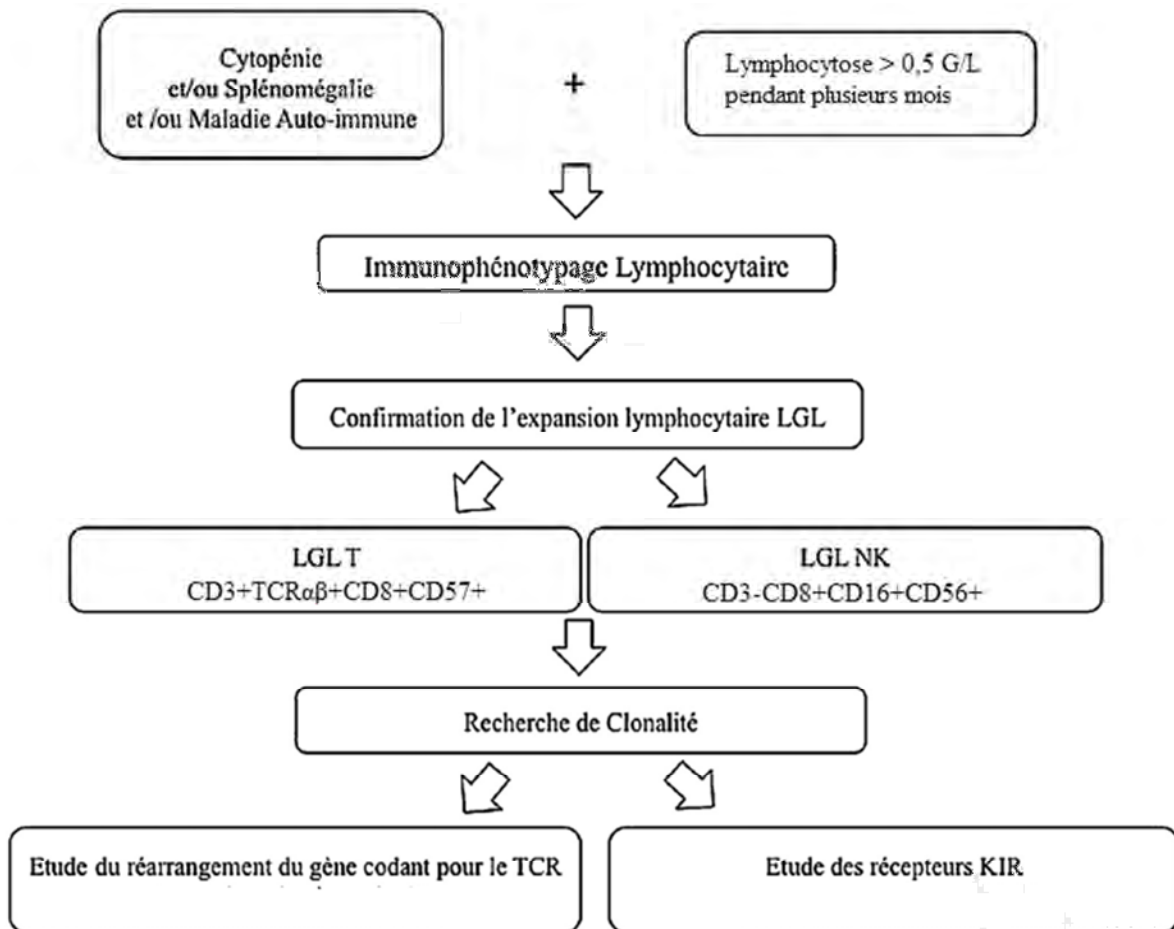
Le caryotype est anormal dans 10 % des leucémies LGL avec quelques cas décrits de trisomies 3, 8 et 14, des délétions des chromosomes 6 et 5q et des inversions des chromosomes 12p et 14q. Ils n'y a actuellement aucune corrélation entre la présence de ces anomalies et la gravité de la maladie. Cependant, une analyse cytogénétique peut être intéressante dans les CLPD-NK pour essayer de déterminer son caractère clonal.

vi. Stratégie diagnostique

En dehors des situations où il existe un syndrome tumoral franc associé à des signes généraux faisant suspecter une hémopathie, les leucémies LGL sont classiquement recherchées en cas de cytopénie associée à une lymphocytose chronique à LGL ($> 0,5$ G/L), une splénomégalie et ce d'autant plus qu'il existe un contexte auto-immun. En effet, l'OMS 2008 retient un seuil de LGL > 2 G/L pour le diagnostic mais l'étude française d'une cohorte de 229 cas a montré que 36% des patients avaient un taux de LGL < 1 G/L [27].

Les cytopénies ne sont pas constantes, on rencontre une neutropénie (< 1.5 G/L) dans 61% des cas, une anémie chez 24% et une thrombopénie chez seulement 19% des patients [27]. Pour cela, les manifestations auto-immunes inexplicables telles qu'une pneumopathie interstitielle diffuse, une hypertension portale, une maladie inflammatoire chronique de l'intestin par exemple doivent également alerter le clinicien et faire rechercher une leucémie LGL [30]. La réalisation d'un immunophénotypage lymphocytaire est l'étape clé indispensable à la confirmation de l'expansion LGL. La recherche de clonalité est réalisée dans un second temps et permet de faire le diagnostic différentiel avec les proliférations poly ou oligoclonales réactionnelles. L'exploration médullaire n'est indiquée qu'en l'absence d'augmentation du taux de LGL ou de difficulté diagnostique.

Figure 4 : Proposition de démarche diagnostique



5. Physiopathologie de la leucémie à LGL

i. Prolifération des LGL

A. Première étape : stimulation antigénique ?

Plusieurs hypothèses vont dans le sens d'une sélection lymphocytaire T, dirigée par un antigène spécifique, endogène ou exogène, qui induirait l'expansion d'un clone de cellules T cytotoxiques. En effet, les LGL utilisent préférentiellement un répertoire $v\beta$ restreint ($v\beta 6$, $v\beta 13.1$) [35]. Il a récemment été démontré que cette restriction d'hétérogénéité se fait au profit de certains clones immunodominants témoins d'une même stimulation antigénique [36].

L'hypothèse de l'existence d'un antigène endogène a été évoquée devant la fréquence des maladies auto-immunes associées aux leucémies à LGL, ce qui suggère un même spectre pathogénique. L'association la plus commune est le "pseudosyndrome de Felty" rencontré chez des patients affectés d'un syndrome de Felty accompagné d'une lymphoprolifération LGL [37].

L'hypothèse rétrovirale est avancée sur la base d'analyses sérologiques ayant montré une positivité des anticorps dirigés contre certaines protéines de rétrovirus HTLV I et II (Human T-cell Leukemia Virus) dans le sérum de patients atteints de T-LGL. Cette séroréactivité, retrouvée dans 50 % des T-LGL, serait dirigée contre l'épitope spécifique BA21 qui présente une forte homologie de structure avec une protéine d'enveloppe de HTLV I, la protéine p21 [38].

Ainsi, le virus pourrait être l'élément déclenchant initial d'une activation lymphocytaire T chronique monoclonale. Des données relatives aux cellules dendritiques (DCs) viennent conforter cette hypothèse. Il a en effet été établi qu'au niveau de la moelle osseuse les lymphocytes granuleux sont en contact étroit avec les DCs et prolifèrent de façon significative après stimulation élective des DCs. Les DCs de la moelle osseuse seraient donc la cible initiale du virus et précipiteraient une fois activées l'expansion clonale LGL [39].

Le facteur déclenchant viral n'est cependant pas retrouvé de façon constante et il est possible que d'autres facteurs endogènes ou exogènes soient impliqués.

B. Deuxième étape : amplification du signal d'activation par les cytokines

Après une première étape d'initiation par un antigène, l'intervention des interleukines pourrait faciliter l'expansion clonale. En effet, l'expansion du clone lymphocytaire est dépendante de l'expression de certaines cytokines dont l'IL-2, l'IL-12 et l'IL-15. Les LGL expriment constitutivement l'IL2RB, récepteur commun à l'IL-2 et l'IL-15. Alors que l'IL-2 est d'origine lymphocytaire, les DCs et les monocytes sont les principales sources d'IL-12 et d'IL-15, renforçant ainsi le rôle de ces cellules dans la physiopathologie de la maladie [39].

C. Troisième étape : pérennisation du processus d'activation par dérégulation de l'apoptose

De manière similaire aux CTL, les LGL leucémiques ont constitutivement des taux plus élevés de FAS-FASLG. Malgré cela, les LGL leucémiques des patients sont résistants à l'apoptose médiée par le couple FAS-FASLG[40]. L'étude moléculaire des LGL leucémiques montre une dérégulation et un découplage de l'activation et des voies apoptotiques de l'AICD. Les LGL leucémiques ont acquis leurs fonctions effectrices mais certains gènes pro-apoptotiques sont sous-exprimés alors que des gènes anti-apoptotiques sont sur-exprimés. Aucune mutation de FAS ou FASLG n'a été retrouvée ce qui suggère que cette résistance à l'apoptose n'est pas dépendante du couple FAS-FASLG[41]. De plus, l'inhibition de différentes voies de survie cellulaire rétablit l'apoptose FAS-FASLG dépendante, ce qui confirme l'activité intacte de FAS-FASLG dans le mécanisme apoptotique[42].

Dans le sérum des patients malades, on a constaté une élévation significative de la forme soluble de FAS (SFAS) par rapport à un groupe sain. SFAS pourrait entrer en compétition avec FAS et contribuer à la résistance à l'apoptose des cellules leucémiques. On a pu aussi démontrer que les cellules productrices de SFAS étaient en fait les LGL leucémiques eux-mêmes. Le séquençage du génome des LGL de patients leucémiques a permis de mettre en évidence des variants d'épissage de FAS, certains de ces variants codent pour la protéine SFAS. Des cellules COS ont ensuite été transfectées par ces variants, et le surnageant était capable de bloquer l'apoptose FAS-dépendante de lymphocytes T activés normaux[41].

De même, des taux élevés de FASLG soluble (SFASLG) ont été observés dans le sérum de patients atteints alors qu'il était indétectable dans le groupe sain[42].

ii. Cytopénies périphériques

La cytotoxicité des leucémies à LGL est induite par l'augmentation du nombre de granules intralymphocytaires et par la sécrétion de multiples cytokines (IL-6, IL-8, interféron γ , TNF α), de leurs récepteurs solubles (par exemple celui de l'IL-2), de molécules d'adhésion (LFA-1, etc.), à l'origine des perturbations de l'hématopoïèse et des cytopénies observées [43].

La surexpression de FASLG soluble (SFASLG), dont les taux sériques sont très élevés dans le sérum de ces patients, participe également à l'apoptose des cellules circulantes, particulièrement à celle de la lignée granuleuse et explique en partie la neutropénie fréquemment observée [37]. Il a par ailleurs été constaté une corrélation entre la correction des cytopénies et la diminution des taux circulants de SFASLG [44]. Les érythroblastopénies sont secondaires à une cytotoxicité directe des LGL sur les progéniteurs érythroïdes [45].

L'envahissement médullaire des LGL tumoraux contribue aussi à la constitution des cytopénies observées.

iii. Manifestations auto-immunes

L'association fréquente des leucémies LGL à des maladies auto-immunes pourrait être le reflet d'un mécanisme physiopathologique initial commun, résultat d'une stimulation antigénique chronique. Les manifestations auto-immunes observées seraient secondaires à une activation de la voie Th2 du fait d'une surexpression de l'IL-4 favorisant l'expansion des cellules B [46].

iv. Voies de signalisation impliquées

De nombreuses voies de signalisation ont été décrites comme étant impliquées dans les mécanismes de prolifération clonale des LGL. Nous citerons sans détailler les principales voies de signalisation dérégulées en s'attardant plus longuement sur la voie JAK-STAT3 qui nous intéresse dans ce travail.

A. RAS-MAP2K1-MAPK1

Les gènes de la famille RAS jouent un rôle important dans le développement tumoral. On les retrouve mutés dans plus de 30% des cancers. La signalisation RAS est une voie majeure de la survie lymphocytaire T. Dans les CLPD-NK, la voie de signalisation RAS-MAP2K1-MAPK1 a été décrite comme étant constitutivement active. Une inhibition de RAS, de MAP2K1 ou de MAPK1 induit l'apoptose et restaure la sensibilité FAS-FASLG des LGL leucémiques[47].

B. PI3KCA-AKT1

La voie de signalisation PI3KCA-AKT1 a un rôle central dans la prolifération tumorale. Elle contrôle le métabolisme, la prolifération, la survie et la transformation de cellules. Au cours des T-LGL, il y a une augmentation de l'activité de la voie PI3KCA-AKT1 dans les LGL du patient par rapport à des cellules T d'un donneur sain[48].

C. NFKB1

NFKB1 est un facteur de transcription impliqué dans la protection contre l'apoptose des lymphocytes T activés. NFKB1 est constitutivement actif dans les LGL leucémiques au cours des T-LGL. L'inhibition de NFKB1 entraîne l'apoptose des LGL leucémiques [49].

D. IL-15

Cette interleukine participe à la régulation et la survie des cellules T et NK. Dans les T-LGL, on a pu montrer une expression plus importante d'un récepteur à l'IL-15, IL15RA [50].

E. PDAP1

Il s'agit d'un facteur de croissance qui régule la division et prolifération cellulaire. Des taux importants de PDAP1 ont été retrouvés dans le sérum de patients T-LGL par rapport à des sérums contrôles[51].

F. JAK-STAT

Comme nous l'avons vu précédemment, les protéines STAT sont des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'angiogenèse et la réponse immune. Ces protéines servent de point de convergence de trois voies de signalisation cellulaire médiées par les récepteurs aux cytokines (IFN- α , IL-6), les récepteurs aux facteurs de croissance (EGF, PDGF) et des tyrosines kinases non-liées à des récepteurs.

Après fixation du ligand à son récepteur, les tyrosines kinases présentes au niveau intracellulaire vont se phosphoryler mutuellement. Par la suite, elles vont phosphoryler les résidus tyrosine présents sur les chaînes intracellulaires du récepteur, ce qui va permettre le recrutement des monomères de STAT3 via leur domaine SH2. Le recrutement des monomères STAT3 catalyse leur phosphorylation sur les résidus tyrosine Y705 qui favorise l'homodimérisation de STAT3. Après dimérisation, la séquence NLS est reconnue et permet le transport du dimère actif dans le noyau. STAT3 peut alors exercer ces fonctions de modulation d'expression génique.

Dans les cellules normales, la durée de l'activation des protéines STAT est finement régulée. Cependant, une activation aberrante de ces protéines a été décrite dans de nombreux cancers. Dès 2001, on a pu démontrer que STAT3 était constitutivement activé dans les leucémies à LGL [52]. Deux publications récentes ont précisé ces mécanismes par séquençage de génomes de LGL. Koskela *et al.* [2] ont étudié une cohorte de 76 patients atteints de

T-LGL dont 36 (40%) présentaient une mutation de la protéine STAT3. De même Jerez *et al.* ont poursuivi ces recherches et ont montré que 33/120 patients (28%) atteints de T-LGL et 15/50 (30%) patients atteints de CLPD-NK présentaient des mutations du gène codant pour le facteur de transcription STAT3 [3]. Toutes ces mutations portent sur la région codant pour le domaine SH2 de la protéine STAT3 responsable de sa dimérisation.

Ils ont ensuite démontré par Western Blot que les patients atteints de T-LGL et de CLPD-NK présentaient un taux de phosphorylation de STAT3 (pSTAT3, forme active de la protéine) significativement plus élevé par rapport à des cellules mononuclées normales. Ces taux augmentés étaient présents que les patients présentent la mutation ou non, suggèrent son activation constitutive dans les LGL leucémiques.

Ils ont poursuivi en étudiant l'expression des gènes sous le contrôle de STAT3 chez les patients malades, mutés ou non. Les deux populations présentent une augmentation des gènes sous le contrôle de STAT3 et partagent environ 50% de gènes dérégulés avec un tropisme pour les gènes codants la voie apoptotique.

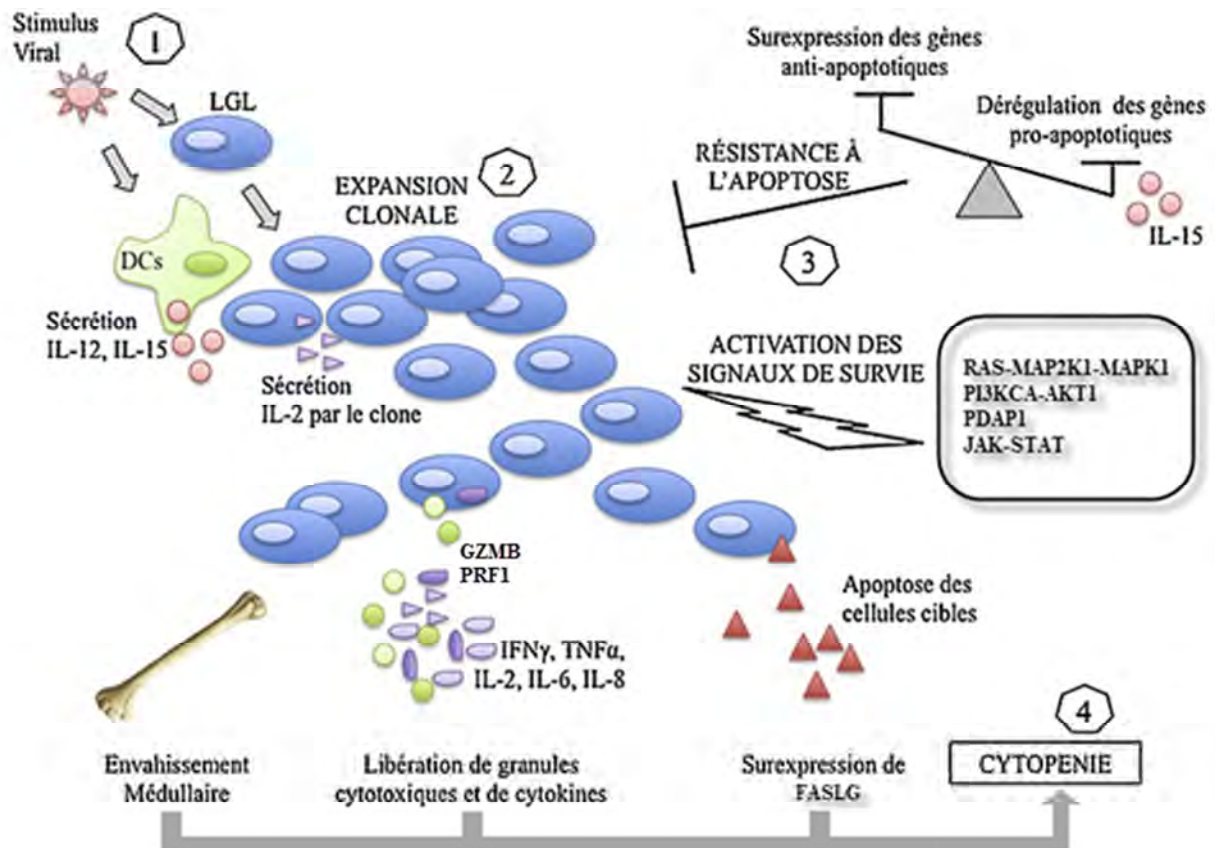
Un inhibiteur de la dimérisation et de la liaison à l'ADN de STAT3 (STA21) a été utilisé sur des LGL leucémiques (mutés ou non) et sur des cellules contrôles. STA-21 induit une apoptose dose-dépendante sur les LGL leucémiques (quel que soit le statut mutationnel de STAT3) significativement supérieure à celle des cellules contrôles. STAT3 est donc impliqué dans les mécanismes de résistance à l'apoptose des cellules leucémiques.

Ces résultats permettent de conclure que des mécanismes d'activation de STAT3, autres que la mutation du domaine SH2, interviennent dans le développement de cette maladie. On a pu, par exemple, démontrer que SOCS3, un inhibiteur de la voie JAK/STAT3, était sous exprimé chez les patients atteints de leucémies à LGL [53]. De même, une mutation (V995M) du gène codant pour la protéine PTPRT, tyrosine phosphatase responsable de la déphosphorylation de pSTAT3, a été identifiée chez un patient atteint d'une leucémie T-LGL et ne présentant pas de mutation de la protéine STAT3 [54].

La présence de STAT3 muté n'est pas corrélée à la valeur absolue des LGL chez les patients malades. Par contre, les patients mutés présentent plus de formes symptomatiques (70% vs 40% ; $p < 0.001$) et requièrent plus de lignes de traitement (2,4 vs 1,2 $p = 0.03$). En ce

qui concerne les comorbidités, les patients mutés présenteraient significativement plus d'anémies hémolytiques auto-immunes et d'arthrites rhumatoïdes. En revanche, on n'observe pas de différence significative en termes de survie.

Figure 5 : physiopathologie des leucémies à LGL



L'expansion du clone lymphocytaire LGL serait induite par un stimulus viral (1) et une forte libération cytokinique par les LGL, les DCs et les monocytes (2). La persistance du clone relève d'un mécanisme intrinsèque aux LGL qui sont capables de résister à l'apoptose et d'activer des voies de signalisation de survie cellulaire (3). La prolifération des LGL dans les tissus hématopoïétiques et leur capacité à sécréter des granules cytotoxiques, de nombreuses cytokines et du FASLG soluble contribuent largement aux cytopénies observées (4).

6. Traitements des leucémies à LGL

Le traitement est normalement indiqué sur l'un des quatre critères suivants :

- neutropénie sévère inférieure à 0.5 G/L ;
- neutropénie modérée supérieure à 0.5 G/L compliquée d'infections récurrentes ;
- anémie symptomatique ;
- existence d'une maladie auto-immune associée justifiant un traitement [29].

Le pronostic de cette maladie repose sur les complications infectieuses avec une mortalité à quatre ans de 20 %. La médiane de survie est supérieure à dix ans [28].

L'efficacité des immunosuppresseurs est en général évaluée à l'issue de quatre mois de traitement, date à laquelle une modification thérapeutique peut être discutée. Une réponse complète est classiquement définie par une normalisation du taux des polynucléaires neutrophiles ($> 1,5$ G/L), des plaquettes (> 150 G/L), de l'hémoglobine (> 12 g/dL), des lymphocytes (< 4 G/L) et des LGL ($< 0,5$ G/L). Une rémission moléculaire complète traduit une disparition du clone lymphocytaire T ou NK.

Deux immunosuppresseurs prédominent dans l'arsenal thérapeutique des leucémies LGL : le méthotrexate et la ciclosporine. Le méthotrexate est la molécule la plus utilisée en cas de neutropénie, d'autant plus que la pathologie est fréquemment associée à la polyarthrite rhumatoïde. À la posologie hebdomadaire de 10 mg/m^2 , le taux de réponse est d'environ 55 % dans la plus large série publiée, avec un délai estimé de réponse de quatre à douze semaines [27]. Ce traitement est maintenu au long cours en l'absence d'effets secondaires. Dans l'essai prospectif ECOG E5998 évaluant la réponse au méthotrexate des leucémies LGL en première ligne, le taux de réponse est de 37 % [55]. La ciclosporine se positionne surtout en cas d'érythroblastopénie ou en deuxième ligne après le méthotrexate avec des taux de réponse globale proches de ceux obtenus avec le méthotrexate [56]. Son maintien au long cours est toutefois souvent grevé par les complications rénales et l'hypertension artérielle.

Le cyclophosphamide utilisé par voie orale à la posologie de 50 à 100 mg par jour est une alternative thérapeutique au méthotrexate ou à la ciclosporine, en première ligne ou en cas d'échec de ces thérapeutiques, avec un taux de réponse globale de 66 % [27]. La durée de ce

traitement est de préférence limitée à 12 mois du fait des effets secondaires. Dans l'essai prospectif ECOG E5998, utilisé en cas d'échec au méthotrexate, le cyclophosphamide a permis d'obtenir une réponse complète ou partielle de 64 % [55]. Une étude prospective NCT01976182 est en cours pour évaluer son efficacité en première ligne.

En cas d'absence de réponse à ces trois immunosuppresseurs de référence (méthotrexate, ciclosporine et cyclophosphamide), les alternatives reposent sur les analogues puriques (pentostatine, fludarabine et cladribine), l'alemtuzumab (anti CD52) ou la splénectomie mais le faible nombre de patients traités par ces stratégies limite leurs indications. L'expérience avec les analogues puriques est restreinte dans la littérature à une quarantaine de cas rapportés [57]. Les corticoïdes, les facteurs de croissance granulocytaires et l'érythropoïétine peuvent être utilisés ponctuellement mais leur intérêt au long cours n'est pas démontré [55].

Une meilleure connaissance de la physiopathologie de la maladie a permis le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques actuellement en essais de phase I : l'anticorps monoclonal MiK- β -1 dirigé contre le CD122, sous-unité commune aux récepteurs de l'IL-2 et IL-15 (Clinical Trials NCT 00079196), le siplizumab dirigé contre le CD2 (Clinical Trials NCT 00075361 et NCT 00105313) et le tipifarnib, inhibiteur de la voie de signalisation de survie RAS-MAP2K1-MAPK1 [58]. Un inhibiteur de STAT3 semble montrer des résultats prometteurs chez la souris [59].

Récemment, la mise en évidence d'inhibiteurs spécifiques de la voie de signalisation STAT3 présente des perspectives intéressantes. Plusieurs inhibiteurs spécifiques de STAT3 ont montré des résultats prometteurs pour bloquer la voie JAK-STAT. Par exemple, STA-21 (inhibiteur de la dimérisation et de la liaison à l'ADN de STAT3) a été utilisé sur des LGL leucémiques (mutés ou non) et sur des cellules contrôles, induisant une apoptose dose dépendante significativement supérieure à celle des cellules contrôles, quel que soit le statut mutationnel de STAT3.

IV. Matériels et méthodes

1. Echantillons et patients sélectionnés

La leucémie à LGL est une pathologie le plus souvent indolente, probablement sous-diagnostiquée. L'une des principales difficultés, de cette étude rétrospective, était d'identifier les patients susceptibles d'avoir une leucémie à LGL. Nous avons ainsi sélectionné, dans un premier temps, tous les échantillons reçus au laboratoire depuis 2010 présentant une population clonale au regard du réarrangement du TCR γ . Un groupe 1 de 136 patients a pu être constitué.

Nous avons également sélectionné un deuxième groupe constitué de 32 patients pour lesquels une prolifération LGL a pu être mise en évidence soit par étude cytologique (LGL > 0,5 G/l) soit par immunophénotypage. Nous avons recherché chez ces patients une clonalité TCR γ , en parallèle de la recherche des mutations STAT3. Parmi ces patients, 20 patients ont un TCR γ réarrangé et 12 un TCR γ oligo ou polyclonal.

2. Réarrangement TCR γ

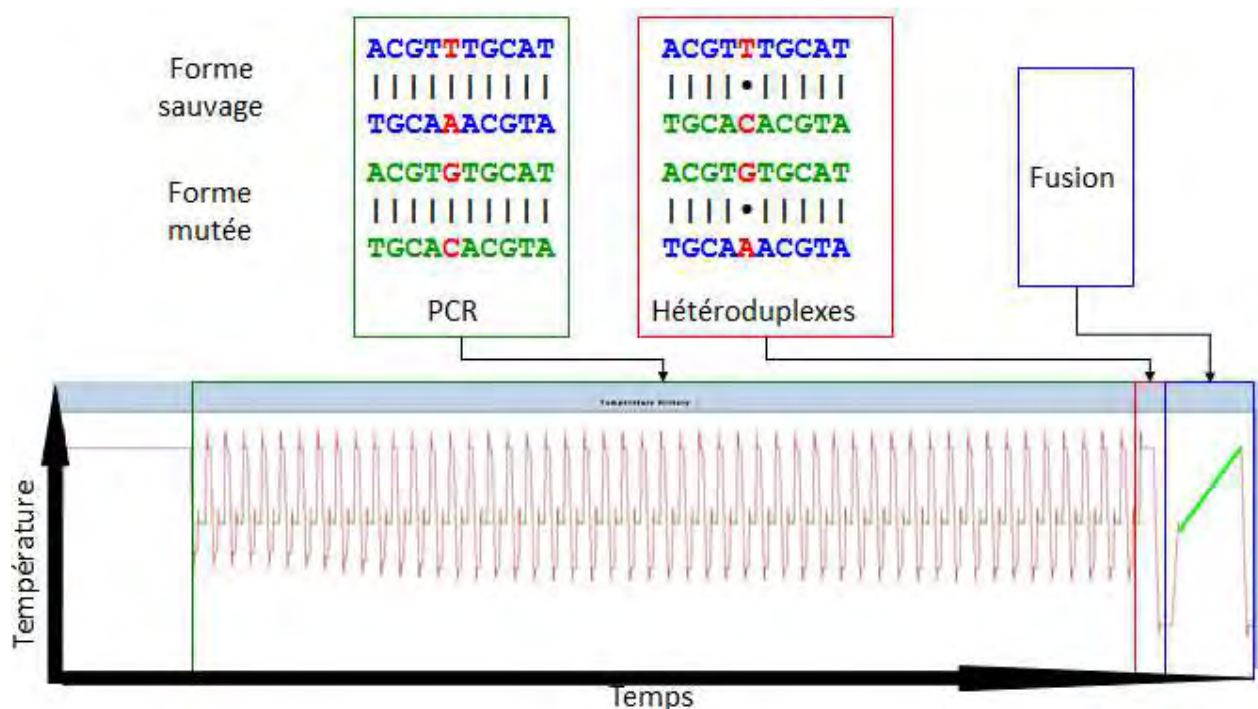
Le TCR γ est réarrangé précocement dans la différenciation lymphoïde T. Sa structure génomique est bien connue et le nombre limité de segments V γ et J γ permet l'amplification de la majorité des combinaisons de jonction V γ -J γ possibles avec un nombre restreint d'amorces (4 pour V γ et 3 pour J γ). Les couples d'amorces utilisés sont ceux présentés dans le travail de standardisation Biomed 2 permettant la recherche d'une clonalité lymphocytaire [60]. Les produits de PCR sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'acrylamide qui permet la distinction entre une population clonale (bande discrète) et une population polyclonale (bande diffuse).

3. PCR High-Résolution-Melting (HRM)

Cette technique de PCR permet la réalisation d'un criblage rapide en détectant des mutations hétérozygotes par dissociation préférentielle des hétéroduplexes comportant un polymorphisme ou une mutation, par chauffage et perte de fluorescence liée à la dissociation d'un fluorochrome spécifique de l'ADN double brin. L'analyse comporte trois étapes :

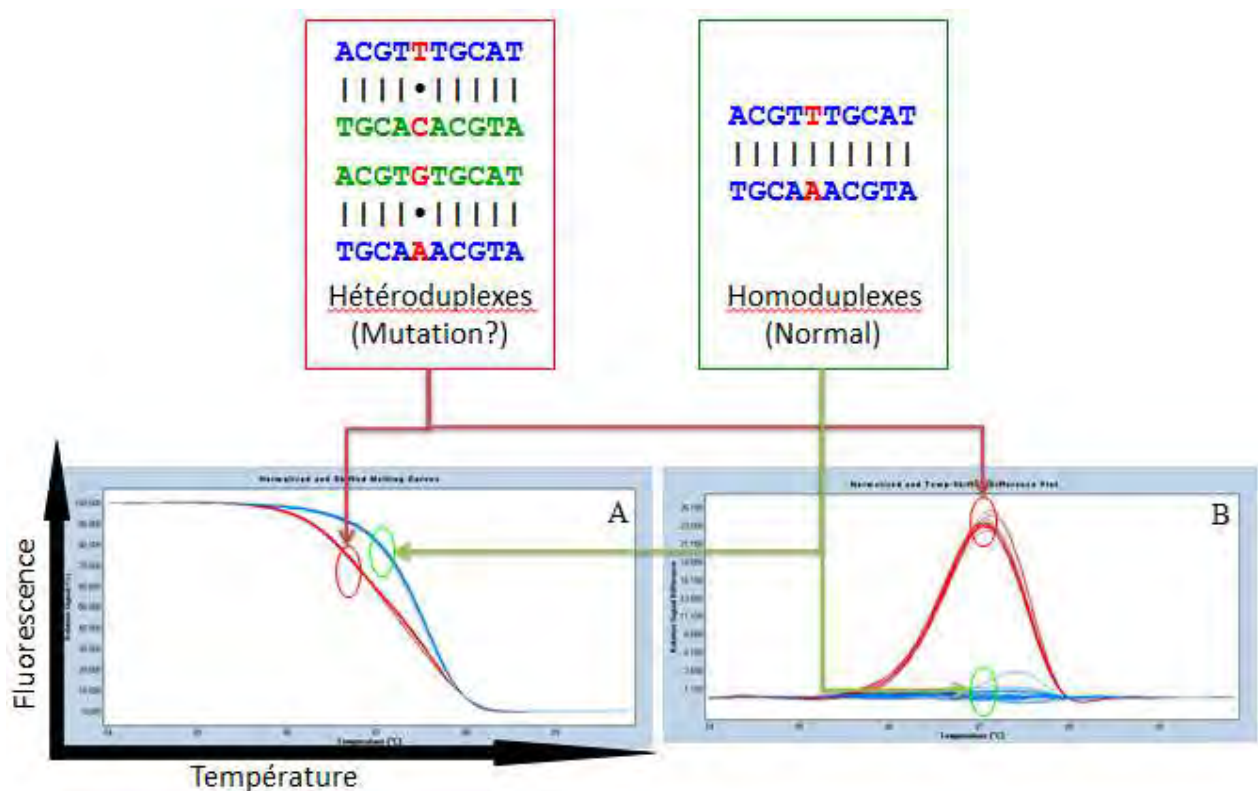
- une amplification par PCR en présence d'un intercalant fluorescent de l'ADN double brin, permettant la génération spécifique d'un amplicon en quantité suffisante,
- la formation d'hétéroduplexes par dénaturation prolongée (95°C pendant 5 min) et refroidissement rapide (40°C pendant 1 min),
- la courbe de fusion proprement dite à haute résolution. Dans cette dernière étape, la fluorescence liée à la présence de l'intercalant fluorescent dans l'ADN double brin est suivie au cours d'une montée en température progressive de 60°C à 95°C. Lors de la dénaturation de l'ADN, l'ADN simple brin ne s'associe plus avec l'intercalant fluorescent, conduisant à une perte de fluorescence. Les hétéroduplexes vont se dénaturer plus rapidement, modifiant leur courbe de fluorescence en fonction de la température.

Figure 6 : principe de la technique PCR HRM



Après analyse, les plaques sont conservées à 4°C. L'exploitation des résultats est réalisée avec le logiciel LightCycler 480 Software. Le logiciel permet l'acquisition des courbes d'amplification et de fusion en temps réel. On peut ensuite normaliser les signaux obtenus avant (signal à 100%) et après fusion (signal à 0%) (A) et ainsi distinguer des profils de fusion différents entre mutés et non mutés. Un autre type de courbe appelé « différence plot » (B) analyse les profils de fusion en comparaison aux témoins négatifs.

Figure 7 : courbes de fusion après normalisation



Les amorces sélectionnées encadrent les sites de mutations décrits dans la littérature localisés au niveau des exons 20 et 21 de STAT3. Ces amorces répondent aux critères suivants :

- longueur de 17 à 30 nucléotides,
- composition G+C inférieure à 67%,
- T_m compris entre 58 et 60°C,
- pas d'auto complémentarité et absence de complémentarité entre les amorces F et R pour éviter la formation de dimères d'amorces,
- absence de séquence complémentaire dans le génome.

Les amorces utilisées sont pour l'exon 20 :

- X20F1- 5'CCTGCTCTCAGCAAGCCAGT3'
- X20R1- 5'CAGCAGCCACCAGCAGGT3'

Pour l'exon 21 :

- X21F1- 5'TTCCTTCCCATGTCCTGTGAC3'
- X21R1-5'CAAGGATCCCAAATTTCCAAC3'
- X21F2- 5'AGATCCAGTCCGTGGAACC3'
- X21R2- 5'CCAGTGGAGACACCAGGATA3'

Un mélange de PCR est préparé de façon à déposer dans chaque puits un volume de mélange de 8 μ L contenant :

- 1,4 μ L d'H₂O
- 5 μ L de « LC 480 HRM MASTER MIX » qui contient la Taq polymérase thermostable, le tampon, l'intercalant fluorescent et les dNTP
- 1,2 μ L de MgCl₂ à la concentration initiale de 25 μ M (concentration finale 3mM)
- 0,2 μ L d'amorce F à la concentration initiale de 10 μ M (concentration finale 0.2 μ M)
- 0,2 μ L d'amorce R à la concentration initiale de 10 μ M (concentration finale 0.2 μ M)

Dans chaque puits, on ajoute à ce mélange 2 μ L d'ADN du patient de concentration initiale comprise entre 10 et 30 ng/ μ L.

Les échantillons sont répartis en plaque 96 puits et chaque patient est testé en double. Des puits sont dédiés au témoin positif (un patient STAT3 muté), au témoin négatif (PBL), et à l'eau comme témoin de non contamination lors de la préparation du mix et des plaques.

Le programme d'HRM utilisé est le suivant :

- Dénaturation : 95°C pendant 10 min
- 45 cycles d'amplification :
 - o 95°C pendant 15 sec
 - o 63°C pendant 15 sec
 - o 72°C pendant 25 sec
- Fusion
 - o 95°C pendant 5 min
 - o 40°C pendant 1 min
 - o 60°C pendant 5 sec
 - o Chauffage progressif jusqu'à 95°C à raison d'1°C/sec avec une acquisition continue de 25 acquisitions/°C

4. Séquençage

Les échantillons positifs en PCR HRM, susceptibles de contenir une mutation de STAT3, sont vérifiés par séquençage de type Sanger.

L'analyse des séquences obtenues est réalisée grâce au logiciel Finch TV et Sequencher 4.10.1.

V. Résultats

1. Mise en place de la technique et validation des méthodes

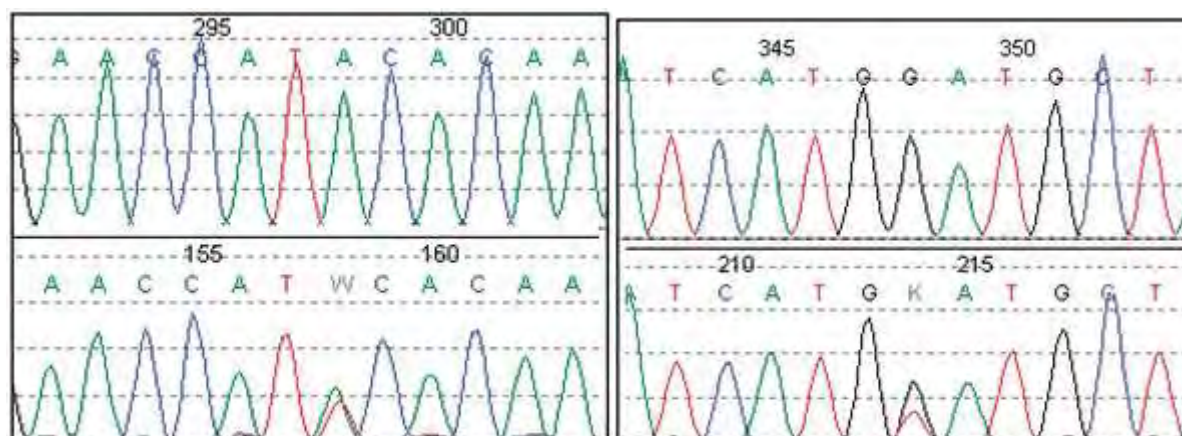
Les mutations du gène STAT3 ont été recherchées sur les exons 20 et 21. En effet, les mutations de STAT3 des leucémies à LGL, décrites dans la littérature, sont toutes situées sur ces deux exons. Elles portent sur la région codant pour le domaine SH2 de la protéine STAT3, responsable de sa dimérisation, étape indispensable à son transport dans le noyau[2], [3].

Pour ce faire, nous avons commencé par définir au laboratoire des couples d'amorces couvrant les exons 20 (X20F1 et X20R1) et 21 (X21F1 et X21R1). La majorité des mutations étant retrouvées sur l'exon 21, nous avons tout d'abord fait une analyse portant sur une trentaine de patients. Tous les patients ont été testés en double. Nous avons mis en évidence deux échantillons potentiellement mutés. Après séquençage, nous avons identifié 2 mutations Y640F fréquemment décrites dans la littérature.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de mutation D661Y très fréquemment rencontrée dans la littérature, pouvant ne pas être détectée par ce 1^{er} jeu d'amorces (X21F1 et X21R1).

Nous avons donc décidé de tester un deuxième couple d'amorces X21F2 et X21R2 afin d'améliorer la sensibilité de la technique HRM. L'ensemble des échantillons a été retesté avec ce nouveau couple d'amorces, grâce auquel nous avons confirmé les mutations précédemment retrouvées et détecté 3 échantillons contenant des mutations de type D661Y.

Figure 8 : Mise en évidence des mutations ponctuelles



2051 A>T. Y640F

2113 G>T. D661Y

L'analyse de l'exon 20 de STAT3 a été réalisée avec un programme HRM standard du laboratoire et un mélange contenant les amorces X20F1 et X20R1. Sur l'ensemble des échantillons, aucune mutation de l'exon 20 n'a été détectée. Devant le très faible nombre de mutations situées sur cet exon dans la littérature, il est probable qu'aucun patient ne présentait de mutation dans notre cohorte.

2. Analyse des deux cohortes

i. Proliférations T clonales

Cette première cohorte est constituée de 136 échantillons présentant un réarrangement du TCR γ clonal. Ils sont donc susceptibles d'être porteur d'une leucémie T-LGL. Dans ce groupe, seuls cinq patients présentent une mutation de l'exon 21 de STAT3 (4%) (Patients 1 à 5). Trois ont d'une mutation Y640F fréquemment décrite dans la littérature [2,3], deux autres ont une mutation en position 658, où la lysine K est substituée soit par une arginine (K658R) soit par une sérine (K658S). Les mutations en position 658 ont été décrites mais la lysine K était substituée par un acide aminé différent [2,3].

ii. Proliférations LGL

Le 2^{ème} groupe est constitué de 32 patients pour lesquels une prolifération LGL a pu être mise en évidence cytologiquement ou par cytométrie en flux. Dans ce groupe, 20 patients ont un TCR γ clonal. On retrouve 5 proliférations LGL NK, 25 proliférations LGL T et 2 proliférations LGL mises en évidence cytologiquement mais sans immunophénotypage. Sept échantillons (patients 6 à 12) présentent des mutations au niveau de l'exon 21, soit 22%. Ces mutations sont situées au niveau des codons 661 (3 mutations D661Y), 640 (3 mutations Y640F) fréquemment décrites dans la littérature [2,3], ainsi qu'une mutation par insertion c.1968_1969ins(TAT) (Y657_K658insY) décrite dans de rares cas [2,61].

Parmi les patients mutés, deux (n°6 et 10) ne présentent pas de réarrangement du TCR γ clonal. Sur les 17 proliférations LGL T clonales en TCR γ , on retrouve 5 patients mutés (n° 7, 8, 9, 11 et 12) soit 29%. Sur les 8 proliférations LGL T polyclonales en TCR γ , on ne détecte qu'un patient muté (n° 10) soit 12.5%. Sur les 5 proliférations NK, un seul patient est muté (n°6) soit 20%.

3. Description des patients mutés

L'analyse des dossiers médicaux de 12 patients présentant des mutations de STAT3 a permis de recueillir les données clinico-biologiques résumées dans le tableau 2.

i. Patient 1 (mutation K658R, cohorte 1)

Patient âgé de 83 ans au diagnostic. Il est porteur de la mutation K658R. Il présente une anémie chronique évoluant depuis plusieurs mois qui nécessite la transfusion régulière de culots globulaires. L'immunophénotypage lymphocytaire sur sang montre une infiltration de LGL T CD3+ CD8+ TCR $\alpha\beta$ + CD57+ et le TCR γ clonal. La 1^{ère} ligne thérapeutique par Méthotrexate est arrêtée pour cause de toxicité médullaire, la 2^{ème} ligne par Ciclosporine est stoppée à cause de la toxicité rénale. Suite au début du traitement de 3^{ème} ligne par Cyclophosphamide, le patient décède d'une septicémie à *Campylobacter* associée à un important épanchement pleural.

ii. Patient 2 (mutation K658S, cohorte 1)

Patient âgé de 67 ans pour lequel un diagnostic de syndrome de Sezary (SS) a été retenu. Le patient présente une erythrodermie prurigineuse diffuse depuis 6 mois sans organomégalie. La biopsie cutanée met en évidence une infiltration par des lymphocytes T CD8+ (dans le SS des infiltrations CD4+ sont retrouvées). La 1^{ère} ligne thérapeutique est constituée de Méthotrexate pendant 1 an et la 2^{ème} de cures d'UV thérapie associées au Targretin® (bexarotène). A ce jour, l'erythrodermie prurigineuse est stable.

iii. Patient 3 (mutation Y640F, cohorte 1)

Patiente âgée de 33 ans au diagnostic présentant une neutropénie sévère et une anémie profonde qui nécessite l'utilisation de concentrés de culots globulaires. La présence d'une infiltration de LGL T CD3+ CD8+ TCR $\alpha\beta$ + CD57+ sur sang en immunophénotypage et d'une clonalité en TCR γ confirme le diagnostic de T-LGL. En 1^{ère} ligne, la Ciclosporine est débutée puis stoppée pour cause de toxicité rénale. En 2^{ème} ligne, le Méthotrexate permet de corriger l'anémie, la neutropénie persiste sans infections intercurrentes. Après six mois de

traitement, l'immunophénotypage lymphocytaire sur sang montre une persistance de 33% de LGL.

iv. Patient 4 (mutation Y640F, cohorte 1)

Patient âgé de 49 ans au moment du diagnostic. Il est hospitalisé pour pancytopénie fébrile avec altération de l'état général et transfusion de culots globulaires. La BOM montre une importante infiltration de LGL et une myélofibrose secondaire à cette infiltration. Le TCR γ est clonal sur moelle. Il a bénéficié de nombreuses lignes de traitement qui n'ont pas permis de corriger les cytopénies. L'évolution est marquée par des infections fréquentes de la sphère ORL et le patient décède suite à une aplasie fébrile aillant entraîné une défaillance multiviscérale.

v. Patient 5 (mutation Y640F, cohorte 1)

Patiente âgée de 57 ans au moment du diagnostic. Dans ses antécédents, on retrouve une polyarthrite rhumatoïde traitée par AINS. La patiente présente une neutropénie asymptomatique oscillante entre 0,5 G/L et 1 G/L depuis plusieurs années. Il n'a pas été observé chez elle d'organomégalie ou d'altération de l'état général. Le diagnostic de leucémie T-LGL a été posé après mise en évidence d'une infiltration sanguine et médullaire de LGL T CD3+ CD8+ TCR $\alpha\beta$ + CD57+ ainsi que d'une clonalité T en TCR γ . Le traitement proposé repose sur le G-CSF si apparition d'aphtose buccale, infection ou agranulocytose. L'évolution est satisfaisante mais la neutropénie persistante.

vi. Patient 6 (mutation D661Y, cohorte 2)

Patient âgé de 63 ans au diagnostic. Depuis plusieurs mois, le patient présente une altération de l'état général avec une perte de poids de 10 kg, une hépatosplénomégalie importante et une pancytopénie qui a nécessité des transfusions de culots globulaires. L'immunophénotypage lymphocytaire montre une infiltration de LGL NK CD3- CD8+ CD16+ CD56+ CD57- sur sang et moelle, le TCR γ est oligoclonal, le diagnostic de CLPD-NK est retenu. Le traitement curatif par Méthotrexate permet de corriger les cytopénies, l'hépatosplénomégalie et l'infiltration LGL.

vii. Patient 7 (mutation D661Y, cohorte 2)

Patient âgé de 50 ans au diagnostic chez qui on découvre fortuitement une prolifération LGL. L'immunophénotypage lymphocytaire sur sang révèle une infiltration LGL T CD3+ CD8+ TCR $\alpha\beta$ + CD57+ et le TCR γ est clonal. Le patient est asymptomatique et aucun traitement n'est mis en place.

viii. Patient 8 (mutation D661Y, cohorte 2)

Patiente âgée de 59 ans au diagnostic, chez qui on découvre une prolifération LGL suite à l'exploration d'une neutropénie asymptomatique. L'immunophénotypage lymphocytaire sur sang montre une infiltration de LGL T CD3+ CD8+ TCR $\alpha\beta$ + CD57+ et le TCR γ est clonal. La patiente est asymptomatique, aucun traitement n'est débuté.

ix. Patient 9 (mutation Y640F, cohorte 2)

Patiente âgée de 22 ans au diagnostic. Exploration d'un tableau d'hyperlymphocytose associé à une neutropénie et une thrombopénie. L'immunophénotypage lymphocytaire sur sang montre une infiltration de LGL T CD3+ CD8+ TCR $\alpha\beta$ + CD57+ et le TCR γ est clonal sur sang. La patiente est asymptomatique et aucun traitement n'est débuté.

x. Patient 10 (mutation Y640F, cohorte 2)

Patient âgé de 68 ans au diagnostic. Il est atteint d'une polyarthrite rhumatoïde. Il est hospitalisé pour altération de l'état général associé à une agranulocytose et une prolifération de LGL. L'immunophénotypage lymphocytaire montre une infiltration de LGL T CD3+ CD8+ TCR $\alpha\beta$ + CD57+ sur sang mais le TCR γ est oligoclonal. Le traitement par Ciclosporine mis en place permet une nette amélioration de la neutropénie.

xi. Patient 11 (mutation Y640F, cohorte 2)

Cette patiente, âgée de 83 ans au diagnostic, est traitée pour une polyarthrite rhumatoïde depuis plusieurs années. Lors d'un bilan de routine, une thrombopénie et une neutropénie profonde associées à une importante prolifération LGL sont découvertes de manière fortuite. L'immunophénotypage lymphocytaire sur sang montre une infiltration de

LGL T CD3+ CD8+ TCR $\alpha\beta$ + CD57+ et le TCR γ clonal sur sang, le diagnostic de T-LGL est retenu. La patiente est asymptomatique et aucun traitement n'est débuté.

xii. Patient 12 (mutation Y657 K658insY, cohorte 2)

Patient âgé de 71 ans au diagnostic. Découverte fortuite d'une agranulocytose associée à une hépatosplénomégalie importante. L'immunophénotypage lymphocytaire sur sang montre une infiltration de LGL T CD3+ CD4- CD8- CD16/56- TCR $\gamma\delta$ + et le TCR γ est clonal, le diagnostic de T-LGL est retenu. L'efficacité du traitement par Méthotrexate et G-CSF entrepris est en cours d'évaluation.

4. Analyse des 12 patients mutés

Conformément à ce que l'on peut observer dans la littérature, la présentation clinique des patients mutés est très hétérogène.

Pour l'analyse des résultats et leur comparaison avec ceux des travaux de Koskela *et al.* [2] et Jerez *et al.* [3], nous allons présenter les données des 11 patients mutés et diagnostiqués "Leucémie à LGL" en excluant le patient 2 atteint de syndrome de Sezary. Les deux auteurs se sont en effet concentrés dans leurs travaux sur les leucémies à LGL.

L'âge moyen au diagnostic est de 58 ans (de 22 à 83 ans). On retrouve 6 hommes pour 5 femmes, sexe ratio 1,2:1. On observe une anémie (Hb < 10g/dL) dans 4 cas (36%), une thrombopénie (Plq < 100 G/L) dans un cas (9%), une neutropénie (PNN < 1.5 G/L) dans 9 cas (81%). Le décompte des LGL est difficile à interpréter dans cette étude rétrospective, car en pratique au laboratoire, on ne différencie les LGL des lymphocytes « normaux » que lorsqu'il y a une neutropénie profonde associée. Ceci a probablement pour conséquence une sous-estimation de leur présence. Six patients étaient symptomatiques au moment du diagnostic (55%), les 6 patients traités ont nécessité en moyenne 2 lignes de traitement. Enfin 3 patients avaient une polyarthrite rhumatoïde associée (27%) et 3 une organomégalie au diagnostic (27%).

Tableau 3 : patients mutés

Cas	Mutation	TCR γ	CMF	Age	Sexe	Gb	LGL	Hb	Plq	PNN	Lignes TT	SC au diagnostic	PAR	Décès
1	K658R	+	T	83	H	10,1	0	7,9	332	2,8	3	+	0	+
2	K658S	+	T	67	H	6,2	0	13	194	2,7	2	+	0	0
3	Y640F	+	T	33	F	3,9	3,09	5,4	157	0,6	2	+	0	0
4	Y640F	+	T	49	H	1,2	0	5,8	132	0,5	5	+	0	+
5	Y640F	+	T	57	F	2,8	0,28	13	250	0,7	0	0	+	0
6	D661Y	0	NK	63	H	12,4	8,3	5	108	0,4	1	+	0	0
7	D661Y	+	T	50	H	10,4	4,24	16	205	2,3	0	0	0	0
8	D661Y	+	T	59	F	7,21	3,8	12,8	158	0,6	0	0	0	0
9	Y640F	+	T	22	F	11,6	8	13	130	0,9	0	0	0	0
10	Y640F	0	T	68	H	3,8	1,5	11,9	169	0,11	1	+	+	0
11	Y640F	+	T	83	F	16,6	12	12,4	94	0,33	0	0	+	0
12	Y657_ K658insY	+	T	71	H	1,95	0	12,3	265	0,06	1	+	0	0

Hb en g/dL, Plq en G/L, Gb en G/L, LGL en G/L, PNN en G/L, Om : organomégalie.

VI. Discussion

1. Présentation des résultats de Koskela et Jerez

i. Koskela et al. [2]

Au cours de cette étude, les auteurs ont formé une cohorte de 76 patients atteints de T-LGL. Chez un patient index porteur d'une leucémie T-LGL, ils ont réalisé en parallèle sur des lymphocytes CD8⁺ (leucémiques) et des CD4⁺ (non leucémiques) un séquençage de l'ensemble de l'exome. Ceci leur a permis d'identifier une mutation du gène codant pour la protéine STAT3. La mutation D661Y localisée dans le domaine SH2 de STAT3 était présente seulement sur les cellules leucémiques CD8⁺.

Ils ont ensuite analysé les 6 exons codants pour le domaine SH2 de STAT3 sur une cohorte de 77 patients atteints d'une leucémie T-LGL. 40% des patients présentaient une mutation de l'exon 21. Aucune mutation STAT3 n'a été retrouvée parmi les 9 proliférations LGL réactionnelles (post infection CMV et traitées par Dasatinib ®). Les mutations de l'exon 21 de STAT3 semblent donc spécifiques des proliférations clonales à LGL.

Enfin Koskela *et al.* ont comparé les caractéristiques cliniques des patients mutés et non mutés. Il n'y avait aucune différence significative en termes de survie, d'âge, de sexe, d'anémie, de thrombopénie, de nombre de LGL et d'organomégalie. Toutefois, les patients mutés présentaient significativement plus de polyarthrites rhumatoïdes (26% vs 6% p=0,02) et de neutropénies (77% vs 50% p=0,02).

ii. Jerez et al.[3]

Dans cette étude, les auteurs ont sélectionné un premier groupe de 120 patients atteints de T-LGL et un second de 50 patients atteints de CLPD-NK. Le sexe ratio est de 1,22:1 et l'âge moyen de 64 ans au diagnostic. L'analyse a porté sur les exons codants pour les domaines SH2 des protéines de la famille STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a,

STAT5b et STAT6). D'autres gènes de la voie JAK/STAT connues pour être des points chauds de mutation (JAK2 V617F, JAK3 exons 13-17) ont été également analysés.

Toutes les mutations identifiées sont localisées sur les exons 20 et 21 de STAT3. 28% des patients T-LGL portaient une mutation et 30% des patients CLPD-NK. Les auteurs ont d'abord démontré qu'il n'y avait aucune différence significative de présentation clinique entre les patients T-LGL et les CLPD-NK.

Ils ont ensuite comparé les caractéristiques cliniques des patients mutés et des non mutés. Il n'y a aucune différence significative en termes d'âge, de sexe, de médiane de survie, de neutropénie, d'anémie, de thrombopénie, de nombre de LGL, d'organomégalie, d'aplasie associée, et de myélodysplasie. Cependant, les patients mutés et traités nécessitent plus de lignes de traitement (2,4 vs 1,2 p=0.03), ils sont plus symptomatiques au diagnostic (75% vs 40% p=0.001). En ce qui concerne les comorbidités, les patients mutés présentent plus de polyarthrites rhumatoïdes (18% vs 7% p=0,03) et d'anémies hémolytiques (14% vs 4% p=0.03).

iii. Autres cas de mutations de STAT3

En explorant la littérature, on s'aperçoit que les mutations du domaine SH2 de STAT3 ne sont pas spécifiques des leucémies à LGL. En effet, Ohgami *et al.* ont recherché en 2013 les mutations du domaine SH2 de STAT3 dans d'autres pathologies lymphoïdes T. Ils ont pu mettre en évidence 2 mutations STAT3 (N647I, D661H) sur 12 lymphomes anaplasiques ALK-, 2 mutations (Y640F) sur 29 lymphomes T périphériques, aucune sur les 13 syndromes de Sezary [62]. Toutefois, une activation constitutive de STAT3 a pu déjà être mise en évidence dans le syndrome de Sezary [63].

De la même manière, Couronné *et al.* ont recherché en 2013 des mutations STAT3 dans des pathologies lymphoïdes T, B et dans des pathologies myéloïdes. Ceci leur a permis de mettre en évidence 1 mutation (Y640F) sur 32 lymphomes T périphériques, 1 mutation (Y657ins) sur 13 lymphomes T $\gamma\delta$, 2 (D661ins, D661Y) sur 10 lymphomes anaplasiques ALK- et 2 (E616del) sur 79 lymphomes B à grandes cellules [59].

Enfin, Pilati *et al.* ont montré en 2011 que des mutations Y640F de STAT3 sont retrouvées dans 6% des tumeurs solides hépatiques [64].

La majorité des mutations retrouvées dans ces 3 publications ont été décrites dans les leucémies à LGL. Le fait de retrouver une mutation du domaine SH2 de STAT3 n'est donc pas spécifique des proliférations malignes à LGL. Cette observation a pu être également faite dans notre cohorte, où un patient muté est atteint d'un syndrome de Sezary, sans qu'aucune prolifération LGL n'ait pu être mise en évidence chez lui.

Rajala *et al.* ont détecté 4 mutations du gène codant pour la protéine STAT5b sur 211 T-LGL (2%). Ces mutations portent aussi sur la région codant pour le domaine SH2 de la protéine[65].

Palomero *et al.* ont retrouvé récemment des mutations de RHOA dans 18% des lymphomes T périphériques sans autre spécificité [66]. D'autres mécanismes semblent impliqués dans les processus de tumorigenèse des lymphomes T périphériques.

2. Comparaison des patients de la cohorte à ceux de la littérature

Dans la cohorte 2, il y a 17 proliférations LGL T clonales en TCR γ , qui correspondent à des leucémies de type T-LGL. On retrouve 29% de patients mutés dans cette population, résultats comparables aux 40% de la cohorte de Koskela *et al.* et aux 28% de la cohorte de Jerez *et al.*.

Dans la cohorte de Koskela *et al.* [2], les patients mutés présentaient plus de neutropénies (77% vs 50%), et de polyarthrites rhumatoïdes associées (26% vs 6% ; p=0,02) que les non mutés. Dans nos résultats, on observe que 81% des patients mutés sont neutropéniques, et 27% des patients ont une polyarthrite rhumatoïde associée.

Dans la cohorte de Jerez *et al.* [3], les patients mutés ont plus de lignes de traitement (2,4 vs 1,2 ; p=0,03), de polyarthrites rhumatoïdes (18% vs 7% ; p=0,03). Ils sont aussi plus souvent symptomatiques au diagnostic (75% vs 40% p=0,001). Sur notre cohorte, 55% des

patients sont symptomatiques au moment du diagnostic, les patients traités ont nécessité en moyenne 2 lignes de traitement [3].

Au final, nos résultats concordent avec ceux des travaux de Koskela et Jerez.

3. Intérêt pour le diagnostic

Dans la première cohorte composée de patients clonaux en TCR γ , nous avons retrouvé seulement 5 patients mutés (4%). Pour 4 patients, le diagnostic de leucémie T-LGL avait été posé après la mise en évidence d'une clonalité TCR γ qui confirmait la malignité de la prolifération. Le diagnostic du dernier patient était, quant à lui, un syndrome de Sézary et aucune prolifération LGL n'a pu être mise en évidence chez lui. Devant la faible proportion de positif et l'impact diagnostique limité de la présence de STAT3 muté, il apparaît peu utile de rechercher les mutations STAT3 en systématique chez les patients clonaux en TCR γ .

Dans la deuxième cohorte, nous avons pu identifier 7 patients présentant des mutations de STAT3, dont 5 possèdent une clonalité positive en TCR γ qui confirme le diagnostic de T-LGL. Chez un autre patient (n°10), malgré la présence d'une prolifération LGL de type T bien caractérisée à l'immunophénotypage, aucune clonalité T n'avait pu être mise en évidence en TCR γ , pouvant faire passer cette prolifération LGL pour une expansion polyclonale réactionnelle. La présence de STAT3 muté nous permet d'affirmer le caractère clonal en faveur d'une prolifération maligne.

En tout, sur les 25 proliférations LGL T clonales et polyclonales de la deuxième cohorte, la recherche du statut mutationnel de STAT3 nous a permis de confirmer le diagnostic d'une seule T-LGL supplémentaire par rapport aux 17 mises en évidence grâce à la clonalité TCR γ . Ces résultats soulignent le faible intérêt diagnostique de la recherche de la mutation STAT3 dans les proliférations LGL T.

Dans les CLPD-NK, la mise en évidence d'une clonalité passe par l'étude des récepteurs KIR. Cette technique, difficile à mettre en œuvre, n'est disponible que dans de rares laboratoires spécialisés. C'est pourquoi la plupart des auteurs retiennent comme diagnostic positif de CLPD-NK, une prolifération NK chronique supérieure à six mois. Dans

la plupart des séries publiées, des mutations STAT3 sont retrouvées dans environ 30% des proliférations NK chroniques [3]. La présence de mutation permet dans ces cas de prouver le caractère clonal de la prolifération, d'affirmer sa malignité et donc de la discriminer d'une prolifération polyclonale réactionnelle. Une recherche de mutation STAT3 pourrait avoir un intérêt pour confirmer le diagnostic de près d'un tiers des CLPD-NK. En effet, sur les 5 proliférations NK, un seul patient (n°6) présentait une mutation de STAT3 (20%), nous permettant d'affirmer le caractère malin de cette prolifération.

En résumé, la recherche des mutations STAT3 a permis de « rattraper » le diagnostic de deux patients seulement parmi les nombreux patients testés (une prolifération NK et une prolifération T). Même si la recherche des mutations STAT3 semble avoir un intérêt théorique dans le diagnostic des CLPD-NK, la faible fréquence et l'indolence de ces pathologies ne justifient pas la mise en place de cette recherche en routine au laboratoire. Les patients atteints de proliférations NK chroniques, associées à des cytopénies profondes ou à une pathologie auto-immune, seront traités que la clonalité soit prouvée ou non.

4. Intérêt pour le pronostic

L'évolution des T-LGL et des CLPD-NK est généralement indolente, principalement marquée par l'existence d'une cytopénie ou d'une pathologie auto-immune associée. Leur pronostic est bon et souvent conditionné par l'existence de complications infectieuses secondaires à la neutropénie.

Dans les deux principales cohortes de Koskela *et al.* [2] et Jerez *et al.* [3], il n'y a pas de différences significatives de survie entre les patients mutés et non mutés, l'impact pronostique de la présence de mutation est donc très faible. On observe cependant que les patients mutés semblent être plus symptomatiques au diagnostic et plus souvent atteints de pathologies associées à la leucémie à LGL. Par exemple, la polyarthrite rhumatoïde est la pathologie auto-immune la plus fréquemment associée. Elle partage avec la leucémie à LGL, une prolifération de CTL, une hyper-expression de molécules cytotoxiques ainsi qu'une résistance à l'apoptose [67]. Dans la polyarthrite rhumatoïde, STAT3 promeut la survie des fibroblastes synoviaux qui participent à la destruction du cartilage articulaire. On a pu récemment montrer que l'action des sels d'or, utilisés comme traitement, dépendait du blocage de la voie de

signalisation JAK/STAT3 [68]. Ces découvertes pourraient expliquer le lien pathogénique entre la présence de mutation dans les leucémies à LGL et la polyarthrite rhumatoïde.

Enfin Koskela *et al.* ont formé 3 groupes de patients mutés en fonction de la mutation identifiée. Un groupe de 7 patients porteurs d'une mutation D661V, un groupe de 7 patients D661Y et un groupe de 13 patients Y640F. Il n'y avait pas de différences significatives de survie ou de signes cliniques entre ces trois groupes [2]. La position de la mutation sur la séquence codant le domaine SH2 de STAT3 ne semble pas influencer non plus le pronostic des patients STAT3 mutés.

L'ensemble de ces résultats démontre qu'il n'y pas d'intérêt d'intégrer la recherche de mutation STAT3 comme marqueur pronostique des leucémies à LGL.

5. Intérêt thérapeutique

On a pu voir précédemment que les patients mutés semblent nécessiter plus de lignes de traitement. Cependant aucune étude n'a pour l'instant démontré que la présence de mutations conduisait à une sensibilité accrue à un traitement. Une fois cette constatation faite, la recherche de mutation ne nous permettra donc pas d'adapter le traitement en cas de positivité.

Des nouvelles molécules qui inhibent la dimérisation de STAT3 et sa liaison à l'ADN sont en cours d'étude. Par exemple, STA21 [3] semble prometteur. Lorsque l'on met en contact STA21 et des LGL leucémiques en culture, il y a une augmentation dose dépendante de l'apoptose des cellules leucémiques. Par contre, les LGL normaux s'avèrent beaucoup moins sensibles à cette molécule. Toutefois, l'apoptose des LGL leucémiques ne dépend pas du statut mutationnel, les LGL STAT3 mutés sont tout aussi sensibles que les STAT3 non mutés [3]. Dans la perspective de l'utilisation clinique de STA21, la recherche de mutations STAT3 ne présenterait pas d'intérêt.

VII. Conclusion

Dans la première cohorte, composée de 136 patients clonaux en TCR γ , nous avons retrouvé 4% de mutations de STAT3 et 22% dans la cohorte 2 composée de 32 patients. Nos résultats confirment l'implication de la voie JAK-STAT dans les leucémies à LGL. Toutefois, la détection de mutations de STAT3 semble n'avoir qu'un impact diagnostique, pronostique et thérapeutique limité. La mise en place de sa recherche en routine au laboratoire n'est donc pas justifiée.

Récemment, *Jerez et al.* ont poursuivi leurs travaux en recherchant des mutations STAT3 chez des patients atteints de syndrome myélodysplasique (SMD) et d'aplasie médullaire (AM). Ils ont bien sûr pu mettre en évidence des mutations STAT3 lorsque ces pathologies étaient associées à une prolifération LGL. Mais, de manière plus étonnante, ils ont mis en évidence des mutations STAT3 (8 D661Y et 5 Y640F) dans un petit nombre de MDS (2,5%) et d'AM (7%) sans aucune prolifération LGL identifiable cytologiquement ou par immunophénotypage. Ensuite, les auteurs ont pu montrer que les mutations STAT3 étaient spécifiquement portées par des CTL CD3+, CD8+, CD57+ de la moelle [69]. Ces résultats indiquent que les LGL et leur « immortalisation » par mutation STAT3 pourraient avoir une implication dans le développement des MDS et des AM.

VIII. Bibliographie

- [1] S. H. Swerdlow, I. A. for R. on Cancer, et W. H. Organization, *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. International Agency for Research on Cancer, 2008.
- [2] H. L. M. Koskela, S. Eldfors, P. Ellonen, A. J. van Adrichem, H. Kuusanmäki, E. I. Andersson, S. Lagström, M. J. Clemente, T. Olson, S. E. Jalkanen, M. M. Majumder, H. Almusa, H. Edgren, M. Lepistö, P. Mattila, K. Guinta, P. Koistinen, T. Kuittinen, K. Penttinen, A. Parsons, J. Knowles, J. Saarela, K. Wennerberg, O. Kallioniemi, K. Porkka, T. P. Loughran, C. A. Heckman, J. P. Maciejewski, et S. Mustjoki, « Somatic *STAT3* Mutations in Large Granular Lymphocytic Leukemia », *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, n° 20, p. 1905-1913, mai 2012.
- [3] A. Jerez, M. J. Clemente, H. Makishima, H. Koskela, F. Leblanc, K. Peng Ng, T. Olson, B. Przychodzen, M. Afable, I. Gomez-Segui, K. Guinta, L. Durkin, E. D. Hsi, K. McGraw, D. Zhang, M. W. Wlodarski, K. Porkka, M. A. Sekeres, A. List, S. Mustjoki, T. P. Loughran, et J. P. Maciejewski, « *STAT3* mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia », *Blood*, vol. 120, n° 15, p. 3048-3057, oct. 2012.
- [4] S. Akira, Y. Nishio, T. Tanaka, M. Inoue, T. Matsusaka, X. J. Wang, S. Wei, N. Yoshida, et T. Kishimoto, « Transcription factors NF-IL6 and APRF involved in gp130-mediated signaling pathway », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 762, p. 15-27; discussion 27-28, juill. 1995.
- [5] Z. Zhong, Z. Wen, et J. E. Darnell Jr, « Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6 », *Science*, vol. 264, n° 5155, p. 95-98, avr. 1994.
- [6] C. M. Horvath, Z. Wen, et J. E. Darnell Jr, « A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain », *Genes Dev.*, vol. 9, n° 8, p. 984-994, avr. 1995.
- [7] D. Maritano, M. L. Sugrue, S. Tininini, S. Dewilde, B. Strobl, X. Fu, V. Murray-Tait, R. Chiarle, et V. Poli, « The *STAT3* isoforms alpha and beta have unique and specific functions », *Nat. Immunol.*, vol. 5, n° 4, p. 401-409, avr. 2004.
- [8] M. L. Vignais, H. B. Sadowski, D. Watling, N. C. Rogers, et M. Gilman, « Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, n° 4, p. 1759-1769, avr. 1996.
- [9] K. Takeda, K. Noguchi, W. Shi, T. Tanaka, M. Matsumoto, N. Yoshida, T. Kishimoto, et S. Akira, « Targeted disruption of the mouse *Stat3* gene leads to early embryonic lethality », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, n° 8, p. 3801-3804, avr. 1997.
- [10] J. F. Bromberg, M. H. Wrzeszczynska, G. Devgan, Y. Zhao, R. G. Pestell, C. Albanese, et J. E. Darnell Jr, « *Stat3* as an oncogene », *Cell*, vol. 98, n° 3, p. 295-303, août 1999.
- [11] H. Yu et R. Jove, « The STATs of cancer--new molecular targets come of age », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, n° 2, p. 97-105, févr. 2004.
- [12] P. C. Heinrich, I. Behrmann, G. Müller-Newen, F. Schaper, et L. Graeve, « Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway », *Biochem. J.*, vol. 334 (Pt 2), p. 297-314, sept. 1998.

- [13] J. S. Rawlings, G. Rennebeck, S. M. W. Harrison, R. Xi, et D. A. Harrison, « Two Drosophila suppressors of cytokine signaling (SOCS) differentially regulate JAK and EGFR pathway activities », *BMC Cell Biol.*, vol. 5, n° 1, p. 38, oct. 2004.
- [14] K. Mahboubi, F. Li, J. Plescia, N. C. Kirkiles-Smith, M. Mesri, Y. Du, J. M. Carroll, J. A. Elias, D. C. Altieri, et J. S. Pober, « Interleukin-11 up-regulates survivin expression in endothelial cells through a signal transducer and activator of transcription-3 pathway », *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 81, n° 3, p. 327-334, mars 2001.
- [15] G. Niu, K. L. Wright, M. Huang, L. Song, E. Haura, J. Turkson, S. Zhang, T. Wang, D. Sinibaldi, D. Coppola, R. Heller, L. M. Ellis, J. Karras, J. Bromberg, D. Pardoll, R. Jove, et H. Yu, « Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis », *Oncogene*, vol. 21, n° 13, p. 2000-2008, mars 2002.
- [16] W.-C. Li, S.-L. Ye, R.-X. Sun, Y.-K. Liu, Z.-Y. Tang, Y. Kim, J. G. Karras, et H. Zhang, « Inhibition of growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by antisense oligonucleotide targeting signal transducer and activator of transcription 3 », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 12, n° 23, p. 7140-7148, déc. 2006.
- [17] M. Itoh, T. Murata, T. Suzuki, M. Shindoh, K. Nakajima, K. Imai, et K. Yoshida, « Requirement of STAT3 activation for maximal collagenase-1 (MMP-1) induction by epidermal growth factor and malignant characteristics in T24 bladder cancer cells », *Oncogene*, vol. 25, n° 8, p. 1195-1204, févr. 2006.
- [18] J.-C. Brouet, M. Sasportes, G. Flandrin, J.-L. Preud'Homme, et M. Seligmann, « CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKÆMIA OF T-CELL ORIGIN IMMUNOLOGICAL AND CLINICAL EVALUATION IN ELEVEN PATIENTS », *The Lancet*, vol. 306, n° 7941, p. 890-893, nov. 1975.
- [19] T. P. Loughran Jr, « Clonal diseases of large granular lymphocytes. Blood 1993 ; 382 : 1-4. », *Blood*, vol. 82, n° 1, p. 1-14, juill. 1993.
- [20] T. P. Loughran Jr, G. Starkebaum, P. Kidd, et P. Neiman, « Clonal proliferation of large granular lymphocytes in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988 ; 31 : 31-6. », *Arthritis Rheum.*, vol. 31, n° 1, p. 31-36, janv. 1988.
- [21] G. Bossi et G. M. Griffiths, « CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle », *Semin. Immunol.*, vol. 17, n° 1, p. 87-94, févr. 2005.
- [22] Y. L. Kwong, A. C. Chan, R. Liang, A. K. Chiang, C. S. Chim, T. K. Chan, D. Todd, et F. C. Ho, « CD56+ NK lymphomas: clinicopathological features and prognosis », *Br. J. Haematol.*, vol. 97, n° 4, p. 821-829, juin 1997.
- [23] S. Mustjoki, M. Ekblom, T. P. Arstila, I. Dybedal, P. K. Epling-Burnette, F. Guilhot, H. Hjorth-Hansen, M. Höglund, P. Kovanen, T. Laurinolli, J. Liesveld, R. Paquette, J. Pinilla-Ibarz, A. Rauhala, N. Shah, B. Simonsson, M. Sinisalo, J. L. Steegmann, L. Stenke, et K. Porkka, « Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy », *Leukemia*, vol. 23, n° 8, p. 1398-1405, août 2009.
- [24] F. K. Chan, H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui, et M. J. Lenardo, « A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling », *Science*, vol. 288, n° 5475, p. 2351-2354, juin 2000.
- [25] J. Zhang, X. Xu, et Y. Liu, « Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity », *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 1, n° 3, p. 186-192, juin 2004.
- [26] M. A. Williams et M. J. Bevan, « Effector and memory CTL differentiation », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 25, p. 171-192, 2007.
- [27] B. Bateau, J. Rey, M. Hamidou, J. Donadieu, J. Morcet, O. Reman, N. Schleinitz, O. Tournilhac, M. Roussel, T. Fest, et T. Lamy, « Analysis of a French cohort of patients

- with large granular lymphocyte leukemia: a report on 229 cases », *Haematologica*, vol. 95, n° 9, p. 1534-1541, sept. 2010.
- [28] F. Pandolfi, T. P. Loughran Jr, G. Starkebaum, T. Chisesi, T. Barbui, W. C. Chan, J. C. Brouet, G. De Rossi, R. W. McKenna, et F. Salsano, « Clinical course and prognosis of the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. A multicenter study », *Cancer*, vol. 65, n° 2, p. 341-348, janv. 1990.
- [29] T. Lamy et T. P. Loughran, « How I treat LGL leukemia », *Blood*, vol. 117, n° 10, p. 2764-2774, mars 2011.
- [30] N. Osuji, K. Beiske, U. Randen, E. Matutes, G. Tjonnfjord, D. Catovsky, et A. Wotherspoon, « Characteristic appearances of the bone marrow in T-cell large granular lymphocyte leukaemia », *Histopathology*, vol. 50, n° 5, p. 547-554, avr. 2007.
- [31] H. Olteanu, N. J. Karandikar, C. Eshoa, et S. H. Kroft, « Laboratory findings in CD4(+) large granular lymphocytoses », *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 32, n° 1 Pt 1, p. e9-16, févr. 2010.
- [32] J. J. M. van Dongen, A. W. Langerak, M. Brüggemann, P. a. S. Evans, M. Hummel, F. L. Lavender, E. Delabesse, F. Davi, E. Schuurung, R. García-Sanz, J. H. J. M. van Krieken, J. Droese, D. González, C. Bastard, H. E. White, M. Spaargaren, M. González, A. Parreira, J. L. Smith, G. J. Morgan, M. Kneba, et E. A. Macintyre, « Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936 », *Leukemia*, vol. 17, n° 12, p. 2257-2317, 2003.
- [33] K. Kawa-Ha, S. Ishihara, T. Ninomiya, K. Yumura-Yagi, J. Hara, F. Murayama, A. Tawa, et K. Hirai, « CD3-negative lymphoproliferative disease of granular lymphocytes containing Epstein-Barr viral DNA. », *J. Clin. Invest.*, vol. 84, n° 1, p. 51-55, juill. 1989.
- [34] P. K. Epling-Burnette, J. S. Painter, P. Chaurasia, F. Bai, S. Wei, J. Y. Djeu, et T. P. Loughran Jr, « Dysregulated NK receptor expression in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes », *Blood*, vol. 103, n° 9, p. 3431-3439, mai 2004.
- [35] R. Zambello, L. Trentin, M. Facco, A. Cerutti, R. Sancetta, A. Milani, R. Raimondi, C. Tassinari, C. Agostini, et G. Semenzato, « Analysis of the T cell receptor in the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: superantigen activation of clonal CD3+ granular lymphocytes », *Cancer Res.*, vol. 55, n° 24, p. 6140-6145, déc. 1995.
- [36] M. W. Wlodarski, C. O'Keefe, E. C. Howe, A. M. Risitano, A. Rodriguez, I. Warshawsky, T. P. Loughran Jr, et J. P. Maciejewski, « Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia », *Blood*, vol. 106, n° 8, p. 2769-2780, oct. 2005.
- [37] E. J. Burks et T. P. Loughran Jr, « Pathogenesis of neutropenia in large granular lymphocyte leukemia and Felty syndrome », *Blood Rev.*, vol. 20, n° 5, p. 245-266, sept. 2006.
- [38] T. P. Loughran Jr, K. G. Hadlock, R. Perzova, T. C. Gentile, Q. Yang, S. K. Fong, et B. J. Poiesz, « Epitope mapping of HTLV envelope seroreactivity in LGL leukaemia », *Br. J. Haematol.*, vol. 101, n° 2, p. 318-324, mai 1998.
- [39] R. Zambello, T. Berno, G. Cannas, I. Baesso, G. Binotto, E. Bonoldi, P. Bevilacqua, M. Miorin, M. Facco, L. Trentin, C. Agostini, et G. Semenzato, « Phenotypic and functional analyses of dendritic cells in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes (LDGL) », *Blood*, vol. 106, n° 12, p. 3926-3931, déc. 2005.

- [40] T. Lamy, J. H. Liu, T. H. Landowski, W. S. Dalton, et T. P. Loughran Jr, « Dysregulation of CD95/CD95 ligand-apoptotic pathway in CD3(+) large granular lymphocyte leukemia », *Blood*, vol. 92, n° 12, p. 4771-4777, déc. 1998.
- [41] J. H. Liu, S. Wei, T. Lamy, Y. Li, P. K. Epling-Burnette, J. Y. Djeu, et T. P. Loughran Jr, « Blockade of Fas-dependent apoptosis by soluble Fas in LGL leukemia », *Blood*, vol. 100, n° 4, p. 1449-1453, août 2002.
- [42] M. Tanaka, T. Suda, K. Haze, N. Nakamura, K. Sato, F. Kimura, K. Motoyoshi, M. Mizuki, S. Tagawa, S. Ohga, K. Hatake, A. H. Drummond, et S. Nagata, « Fas ligand in human serum », *Nat. Med.*, vol. 2, n° 3, p. 317-322, mars 1996.
- [43] M. Ozaki, Y. Kawabe, H. Nakamura, K. Migita, A. Kawakami, K. Tsukazaki, et K. Eguchi, « Elevated serum cytokine levels in a rheumatoid arthritis patient with large granular lymphocyte syndrome », *Rheumatology*, vol. 40, n° 5, p. 592-593, janv. 2001.
- [44] J. H. Liu, S. Wei, T. Lamy, P. K. Epling-Burnette, G. Starkebaum, J. Y. Djeu, et T. P. Loughran, « Chronic neutropenia mediated by fas ligand », *Blood*, vol. 95, n° 10, p. 3219-3222, mai 2000.
- [45] R. Handgretinger, A. Geiselhart, A. Moris, R. Grau, O. Teuffel, W. Bethge, L. Kanz, et P. Fisch, « Pure red-cell aplasia associated with clonal expansion of granular lymphocytes expressing killer-cell inhibitory receptors », *N. Engl. J. Med.*, vol. 340, n° 4, p. 278-284, janv. 1999.
- [46] D. de Toter, G. Reato, F. Mauro, A. Cignetti, S. Ferrini, A. Guarini, M. Gobbi, C. E. Grossi, et R. Foa, « IL4 production and increased CD30 expression by a unique CD8+ T-cell subset in B-cell chronic lymphocytic leukaemia », *Br. J. Haematol.*, vol. 104, n° 3, p. 589-599, mars 1999.
- [47] P. K. Epling-Burnette, F. Bai, S. Wei, P. Chaurasia, J. S. Painter, N. Olashaw, A. Hamilton, S. Sebti, J. Y. Djeu, et T. P. Loughran, « ERK couples chronic survival of NK cells to constitutively activated Ras in lymphoproliferative disease of granular lymphocytes (LDGL) », *Oncogene*, vol. 23, n° 57, p. 9220-9229, déc. 2004.
- [48] A. E. Schade, M. W. Wlodarski, et J. P. Maciejewski, « Pathophysiology defined by altered signal transduction pathways: the role of JAK-STAT and PI3K signaling in leukemic large granular lymphocytes », *Cell Cycle Georget. Tex.*, vol. 5, n° 22, p. 2571-2574, nov. 2006.
- [49] R. Zhang, M. V. Shah, J. Yang, S. B. Nyland, X. Liu, J. K. Yun, R. Albert, et T. P. Loughran Jr, « Network model of survival signaling in large granular lymphocyte leukemia », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, n° 42, p. 16308-16313, oct. 2008.
- [50] D. L. Hodge, J. Yang, M. D. Buschman, P. M. Schaughency, H. Dang, W. Bere, Y. Yang, R. Savan, J. J. Subleski, X.-M. Yin, T. P. Loughran Jr, et H. A. Young, « Interleukin-15 enhances proteasomal degradation of bid in normal lymphocytes: implications for large granular lymphocyte leukemias », *Cancer Res.*, vol. 69, n° 9, p. 3986-3994, mai 2009.
- [51] J. Yang, X. Liu, S. B. Nyland, R. Zhang, L. K. Ryland, K. Broeg, K. T. Baab, N. R. Jarbada, R. Irby, et T. P. Loughran Jr, « Platelet-derived growth factor mediates survival of leukemic large granular lymphocytes via an autocrine regulatory pathway », *Blood*, vol. 115, n° 1, p. 51-60, janv. 2010.
- [52] P. K. Epling-Burnette, J. H. Liu, R. Catlett-Falcone, J. Turkson, M. Oshiro, R. Kothapalli, Y. Li, J. M. Wang, H. F. Yang-Yen, J. Karras, R. Jove, et T. P. Loughran Jr, « Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression », *J. Clin. Invest.*, vol. 107, n° 3, p. 351-362, févr. 2001.

- [53] A. Teramo, C. Gattazzo, F. Passeri, A. Lico, G. Tasca, A. Cabrelle, V. Martini, F. Frezzato, V. Trimarco, E. Ave, E. Boscaro, F. Piazza, M. Facco, L. Trentin, G. Semenzato, et R. Zambello, « Intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to maintain the JAK/STAT pathway aberrantly activated in T-type large granular lymphocyte leukemia », *Blood*, vol. 121, n° 19, p. 3843-3854, S1, mai 2013.
- [54] E. I. Andersson, H. L. M. Rajala, S. Eldfors, P. Ellonen, T. Olson, A. Jerez, M. J. Clemente, O. Kallioniemi, K. Porkka, C. Heckman, T. P. Loughran, J. P. Maciejewski, et S. Mustjoki, « Novel somatic mutations in large granular lymphocytic leukemia affecting the STAT-pathway and T-cell activation », *Blood Cancer J.*, vol. 3, n° 12, p. e168, déc. 2013.
- [55] T. Loughran, X. Yao, et J. Bennett, « Results of a prospective multicenter phase II study of initial treatment with methotrexate in LGL leukemia (ECOG Protocol E5998) (abstract 702). », *Blood*, 2010.
- [56] A. Pawarode, P. K. Wallace, L. A. Ford, M. Barcos, et M. R. Baer, « Long-term safety and efficacy of cyclosporin A therapy for T-cell large granular lymphocyte leukemia », *Leuk. Lymphoma*, vol. 51, n° 2, p. 338-341, févr. 2010.
- [57] B. Bareau, J. Rey, M. Hamidou, J. Donadieu, J. Morcet, O. Reman, N. Schleinitz, O. Tournilhac, M. Roussel, T. Fest, et T. Lamy, « Analysis of a French cohort of patients with large granular lymphocyte leukemia: a report on 229 cases », *Haematologica*, vol. 95, n° 9, p. 1534-1541, sept. 2010.
- [58] P. K. Epling-Burnette, L. Sokol, X. Chen, F. Bai, J. Zhou, M. A. Blaskovich, J. Zou, J. S. Painter, T. D. Edwards, L. Moscinski, J. A. Yoder, J. Y. Djeu, S. Sebti, T. P. Loughran Jr, et S. Wei, « Clinical improvement by farnesyltransferase inhibition in NK large granular lymphocyte leukemia associated with imbalanced NK receptor signaling », *Blood*, vol. 112, n° 12, p. 4694-4698, déc. 2008.
- [59] L. Couronné, L. Scourzic, C. Pilati, V. D. Valle, Y. Duffourd, E. Solary, W. Vainchenker, J.-P. Merlio, M. Beylot-Barry, F. Damm, M.-H. Stern, P. Gaulard, L. Lamant, E. Delabesse, H. Merle-Beral, F. Nguyen-Khac, M. Fontenay, H. Tilly, C. Bastard, J. Zucman-Rossi, O. A. Bernard, et T. Mercher, « STAT3 mutations identified in human hematologic neoplasms induce myeloid malignancies in a mouse bone marrow transplantation model », *Haematologica*, vol. 98, n° 11, p. 1748-1752, nov. 2013.
- [60] A. W. Langerak, P. J. T. A. Groenen, M. Brüggemann, K. Beldjord, C. Bellan, L. Bonello, E. Boone, G. I. Carter, M. Catherwood, F. Davi, M.-H. Delfau-Larue, T. Diss, P. a. S. Evans, P. Gameiro, R. Garcia Sanz, D. Gonzalez, D. Grand, Å. Håkansson, M. Hummel, H. Liu, L. Lombardia, E. A. Macintyre, B. J. Milner, S. Montes-Moreno, E. Schuurin, M. Spaargaren, E. Hodges, et J. J. M. van Dongen, « EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations », *Leukemia*, vol. 26, n° 10, p. 2159-2171, oct. 2012.
- [61] A. Fasan, W. Kern, V. Grossmann, C. Haferlach, T. Haferlach, et S. Schnittger, « STAT3 mutations are highly specific for large granular lymphocytic leukemia », *Leukemia*, vol. 27, n° 7, p. 1598-1600, juill. 2013.
- [62] R. S. Ohgami, L. Ma, J. D. Merker, B. Martinez, J. L. Zehnder, et D. A. Arber, « STAT3 mutations are frequent in CD30+ T-cell lymphomas and T-cell large granular lymphocytic leukemia », *Leukemia*, vol. 27, n° 11, p. 2244-2247, nov. 2013.
- [63] K. W. Eriksen, K. Kaltoft, G. Mikkelsen, M. Nielsen, Q. Zhang, C. Geisler, M. H. Nissen, C. Röpke, M. A. Wasik, et N. Odum, « Constitutive STAT3-activation in Sezary syndrome: tyrphostin AG490 inhibits STAT3-activation, interleukin-2 receptor

- expression and growth of leukemic Sezary cells », *Leukemia*, vol. 15, n° 5, p. 787-793, mai 2001.
- [64] C. Pilati, M. Amessou, M. P. Bihl, C. Balabaud, J. T. V. Nhieu, V. Paradis, J. C. Nault, T. Izard, P. Bioulac-Sage, G. Couchy, K. Poussin, et J. Zucman-Rossi, « Somatic mutations activating STAT3 in human inflammatory hepatocellular adenomas », *J. Exp. Med.*, vol. 208, n° 7, p. 1359-1366, juill. 2011.
- [65] H. L. M. Rajala, S. Eldfors, H. Kuusanmäki, A. J. van Adrichem, T. Olson, S. Lagström, E. I. Andersson, A. Jerez, M. J. Clemente, Y. Yan, D. Zhang, A. Awwad, P. Ellonen, O. Kallioniemi, K. Wennerberg, K. Porkka, J. P. Maciejewski, T. P. Loughran Jr, C. Heckman, et S. Mustjoki, « Discovery of somatic STAT5b mutations in large granular lymphocytic leukemia », *Blood*, vol. 121, n° 22, p. 4541-4550, mai 2013.
- [66] T. Palomero, L. Couronné, H. Khiabani, M.-Y. Kim, A. Ambesi-Impiombato, A. Perez-Garcia, Z. Carpenter, F. Abate, M. Allegretta, J. E. Haydu, X. Jiang, I. S. Lossos, C. Nicolas, M. Balbin, C. Bastard, G. Bhagat, M. A. Piris, E. Campo, O. A. Bernard, R. Rabadan, et A. A. Ferrando, « Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas », *Nat. Genet.*, vol. 46, n° 2, p. 166-170, févr. 2014.
- [67] G. Starkebaum, « Leukemia of large granular lymphocytes and rheumatoid arthritis », *Am. J. Med.*, vol. 108, n° 9, p. 744-745, juin 2000.
- [68] A. Korb, H. Pavenstädt, et T. Pap, « Cell death in rheumatoid arthritis », *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death*, vol. 14, n° 4, p. 447-454, avr. 2009.
- [69] A. Jerez, M. J. Clemente, H. Makishima, H. Rajala, I. Gómez-Seguí, T. Olson, K. McGraw, B. Przychodzen, A. Kulasekararaj, M. Afable, H. D. Husseinzadeh, N. Hosono, F. LeBlanc, S. Lagström, D. Zhang, P. Ellonen, A. Tichelli, C. Nissen, A. E. Lichtin, A. Wodnar-Filipowicz, G. J. Mufti, A. F. List, S. Mustjoki, T. P. Loughran Jr, et J. P. Maciejewski, « STAT3 mutations indicate the presence of subclinical T-cell clones in a subset of aplastic anemia and myelodysplastic syndrome patients », *Blood*, vol. 122, n° 14, p. 2453-2459, oct. 2013.

Détection et impact des mutations de STAT3 dans les syndromes lymphoprolifératifs T et NK

Résumé :

La leucémie à grands lymphocytes à grains (LGL) est un syndrome lymphoprolifératif rare de lymphocytes T cytotoxiques ou de cellules natural killer. La classification OMS 2008 distingue les leucémies à grands lymphocytes à grains T (T-LGL) et les syndromes lymphoprolifératifs chroniques à cellules NK (CLPD-NK). Récemment, des mutations du gène codant pour la protéine STAT3 ont été rapportées dans environ un tiers des T-LGL et des CLPD-NK, ce qui unifie la pathogenèse de ces deux entités. Nous avons développé une méthode de recherche de mutations de ce gène dans deux cohortes de lymphoproliférations T et NK. La première cohorte de 136 patients (syndromes lymphoprolifératifs clonaux en TCR γ) n'identifie que 5 patients mutés (4%). Une seconde cohorte de 32 patients présentant une lymphoprolifération spécifique à LGL identifie 7 patients mutés (22%). Les patients mutés n'ont pas de différence identifiée dans le diagnostic ou le pronostic, posant la question de l'utilité de cette détection dans le cadre des lymphoproliférations T ou NK.

Titre en Anglais: Detection and impact of STAT3 mutations in lymphoproliferative disorders T and NK

Large granular lymphocyte (LGL) leukemia is a rare lymphoproliferative disorder of cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. The WHO 2008 classification distinguish T-cell large granular lymphocytic leukemia (T-LGL) from chronic lymphoproliferative disorders of NK cells (CLPD-NK) cells. Recently, mutations in the gene encoding STAT3 protein have been reported in approximately one third of T-LGL and CLPD-NK, which unifies the pathogenesis of these two entities. We developed a diagnosis method looking for the STAT3 mutations gene in two cohorts of T and NK lymphoproliferations. The first cohort of 136 patients (lymphoproliferative disorders clonal for TCR γ) detected only 5 patients with a STAT3 mutation (4%). A second cohort of 32 patients with a specific LGL lymphoproliferation identifies 7 mutated patients (22 %). Patients bearing a STAT3 mutation have no identified difference regarding the diagnosis or the prognosis, raising the question of the usefulness of its detection in the context of T or NK lymphoproliferations.

DISCIPLINE administrative : BIOLOGIE MEDICALE

MOTS-CLES : Syndromes lymphoprolifératifs T et NK, Leucémie à grands lymphocytes à grains, T-LGL, CLPD-NK, STAT3

Laboratoire de Biologie Moléculaire
Place du Dr Baylac, Pavillon Lefebvre, CHU Toulouse
31059 Toulouse Cedex 9

Directeur de thèse : Professeur DELABESSE, Eric