HAL
open science

Lymphomes Natural-Killer T cells (NKT) : impact des stimulations antigéniques chroniques et mécanismes de la lymphomagénèse

Rémy Robinot

▶ **To cite this version:**

Rémy Robinot. Lymphomes Natural-Killer T cells (NKT) : impact des stimulations antigéniques chroniques et mécanismes de la lymphomagénèse. Cancer. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1255 . tel-01744676

HAL Id: tel-01744676

https://theses.hal.science/tel-01744676

Submitted on 27 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre NNT : 2017LYSE1255 Année 2017

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N°340

(Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire)

Spécialité : Immunologie et Cancérologie

Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 05/12/2017 par

Rémy Robinot

LYMPHOMES NATURAL-KILLER T (NKT) : Impact des stimulations antigéniques chroniques et mécanismes de lymphomagenèse

---

Directeur de thèse : Docteur Laurent Genestier

Devant le jury composé de :

Docteur Véronique Maguer-Satta, DR2 CNRS	*Présidente*
Professeur Philippe Lehours, PU-PH Université de Bordeaux	*Rapporteur*
Docteur Maria Leite de Moraes, DR1 CNRS	*Rapporteur*
Professeur Philippe Gaulard, PU-PH Université Paris Est	*Examinateur*
Docteur Sylvie Hermouet, MCU-PH Université de Nantes	*Examinatrice*
Professeur Germain Gillet, PU-PH Université de Lyon	*Examinateur*
Docteur Laurent Genestier, CR INSERM	*Directeur de thèse*

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

A Ludo

Remerciements

Je tiens tout d'abords à remercier Philippe Lehours et Maria Leite de Moraes d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse.
Merci à mes examinateurs, Philippe Gaulard, Sophie Hermouet et Germain Gillet.
Merci à Véronique Maguer-Sata d'avoir accepté de présider ce jury.

Laurent,
Merci de m'avoir donné ma chance, malgré un « trou » dans mon CV, mon manque d'expérience technique en immunologie, et mon ignorance complète de la cancérologie. Je suis très heureux d'avoir passé ces 4 années sous ton encadrement. Merci pour ton enseignement et ta sympathie. J'espère avoir été à la hauteur, malgré tout. Désolé de m'être cassé le poignet ! Je suis très heureux également d'avoir pu vivre avec toi la création de ta propre équipe avec Gilles. Ce changement de laboratoire en cours de thèse aurait pu être déroutant, mais il s'est avéré plus que bénéfique pour mes 2 dernières années. C'est avec une certaine frustration que je dois clôturer ce chapitre « étudiant » de ma vie, un sentiment d'inachevé… Mais la frustration semble bien être une constante du monde de la recherche… il faut encore que je m'y fasse ! Espérons que parmi toutes les hypothèses que nous avons pu émettre ces dernier mois, au moins une s'avèrera vérifiable ! Encore une fois, merci pour tout.

Je tiens à adresser mes remerciements tout particuliers à Thierry Defrance et Gilles Salles, m'ayant accueillit tour à tour dans leurs équipes respectives. Merci pour votre sympathie et votre accessibilité.

Mirjam,
We both arrived in the team during late 2013, we have been working together, almost just by 2 of us in the beginning, on this tricky project. We both lived very frustrating moments, but we hold on! I admire your great combativeness and I wish you the best for your future projects. For your support: Kiitos !

A mes compagnons de thèse : Ludo, Sylvain, Pascal, Antoine, Chien Cha, Alice, Seb…
Sylvain, j'ai beaucoup appris grâce à toi durant ces 2 dernières années, que ce soit par ta formation médicale enrichissante ou par ton sérieux. Sache que j'admire ta façon de travailler.

Manu,
C'est à moi qu'est revenu la lourde tache de te succéder sur le projet lymphome NKT et de faire vivre ta découverte (même si on sait tous que c'est Lolo qui a fait les premiers marquages tétramères !). Être padawan après toi n'a pas été une mince affaire, tant Laurent semble t'admirer. J'ai beaucoup apprécié nos discussions depuis ton retour des US. Garde un œil sur ton bébé NKT !

Merci à toutes les personnes que j'ai côtoyé au sein du CIRI. La « Defrance team » : Morgan, Olivier, Maël, Dimitri, Paul, Helena, Mathilde, Nathalie… et toutes les personnes de la tour Cervi m'ayant filé un coup de main (Emilie, Cyril, Bariza, Antoine…). Merci à nos secrétaires de compet' : Céline, Véronique et Christelle !
J'ai passé 2 super années en votre compagnie !

Puis est arrivé le moment du départ pour le CRCL et la « LGS team », 2 super années également ! Amel, merci pour ton aide très précieuse en particulier durant ces derniers mois difficiles. Merci Dimitri (encore !), Emilie (encore !!), Nathalie (et ses gâteaux élévateur de moral), Aurélie, pour votre aide technique et pas que ! Pierre, merci pour ton optimisme et tes nombreux conseils en biomol. Merci à Stéphanie, Jean-Pierre « mister PCR », Camille, Marc, Martine, Alexandra, Sandrine…
Merci aux personnes des autres équipes de la plateforme CERVO: Nathalie pour la ddPCR, Celine pour la microscopie.
Merci également aux personnes du CBS pour leur aide : Kaddour, Isabelle, Garance, Laurianne.

Merci Professeur Benoit Jaulhac, de CNR des Borrelia pour sa collaboration. Merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu correspondre pour préparer toutes ces manips à distance : Laurence, Lisa, Elody et Danièle. Sans votre réactivité, ce projet aurait difficilement pu se faire.

Pour leur aide précieuse et leur disponibilité, je remercie les personnes des plateaux techniques, en particulier les membres du PBES (Nadine, Marie, Jean-François, Patrick, Jean-Louis, Pascaline, Agnès…) et du plateau de cytométrie (Thibault, Seb, Priscillia).

Merci à Marie-Cécile Michallet et Anne Marie-Cardine, pour leur conseils tout au long des différents comités de suivit de thèse. Marie, les discussions que nous avons eues ont été un soutien moral précieux.

Merci à ma famille et mes amis pour leur soutien sans faille, en particulier mes parents, toujours là pour moi, et mes pirates adorés de Toter Fisch, toujours compréhensifs vis à vis de la charge de travail que m'imposait la thèse. Merci à Nico, mon toupain colloc' avec qui j'ai pu partager les joies et les déboires de la thèse, mais aussi les épreuves que la vie a mis en travers de nos chemins.

Enfin, merci à Margaux, sans laquelle je n'y serais jamais arrivé. Les 6 derniers mois ont été autant difficile pour toi que pour moi, mais tu as tenu bon et m'a soutenu jusqu'au bout. J'ai de la chance de t'avoir.

Ludo,
Cela me paraît bien étrange de te remercier alors que tu n'es plus parmi nous… Mais je me dois de partager l'impact que tu as eu sur ces 4 années de ma vie. De collègues, nous sommes rapidement devenus amis. Nous avons partagé la science, notre passion pour le Metal, des bières, un groupe de musique, des concerts, des soirée jeux... Tu m'as appris beaucoup de choses au labo, notamment en cytométrie pour laquelle tu étais le référent officiel dans l'équipe. Ton organisation limite maniaque, ta curiosité et ton sens de la mise en forme étaient un exemple pour nous tous. Contrairement à moi, tu ne faisais jamais les choses à moitié. Pour tout ça, et tous les bons moments que nous avons passé ensemble : merci, du fond du cœur. Tu nous manques.

Sommaire

Liste des abréviations principales **8**

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **10**

CHAPITRE A : LES LYMPHOCYTES T NON CONVENTIONNELS **11**

I - Les Natural Killer T-cells (NKT) 12

1) Généralités 12

1-1. Un TCR particulier pour une restriction particulière 13

1-2. Les sous-types de iNKT 14

1-3. Les dNKT 15

1-4. NKT-*like* 16

2) Développement 16

2-1. Le signal TCR, premier événement de la différenciation NKT 16

2-2. PLZF, le « *master regulator* » NKT 17

2-3. Les stades de différenciation NKT 18

2-4. Rôle des lipides dans la sélection thymique 19

3) Mécanismes d'activation 20

3-1. Détection et prise en charge des lipides exogènes 21

3-2. Présentation des antigènes glycolipidiques par CD1d 22

3-3. Interaction CD1d/TCR 22

3-4. Le signal TCR 24

3-5. Activation directe *vs* indirecte 24

3-6. Mécanismes d'activation alternatifs 26

4) Fonctions dans les réponses immunitaires 26

4-1. Réponses antibactériennes 28

4-1.a - *Borrelia burgdorferi* 28

4-1.b - *Streptococcus pneumoniae* 29

4-2. Réponses antivirales 29

4-2.a - Herpesvirus 29

4-2.b - HIV 31

4-3. Réponses antiparasitaires et antifongiques 31

4-4. NKT et microbiote 31

II – Les lymphocytes T Gamma-Delta 32

1) Les sous-types 32

2) Développement 34

3) Ligands et restriction 35

4) Fonctions immunitaires 36

4-1. Les sentinelles des épithéliums 37

4-2. Fonctions cytotoxiques 38

4-3. Réponses antimicrobiennes 38

III – Les Mucosal Associated Invariant T-cells (MAIT) 40

1) Généralités 40

1-1. Distribution *in vivo* 40

1-2. Caractéristiques phénotypiques 41

1-3. Développement 42

2) Présentation antigénique 42

2-1. Les ligands MAIT 42

2-2. Mécanismes de présentation par MR1 43

2-3. Trafic intracellulaire de MR1 43

3) Fonctions immunitaires 44

3-1. Réponses antibactériennes 44

3-2. Réponses antivirales 45

3-3. Autres fonctions dans les maladies non infectieuses 45

CHAPITRE B – LES LYMPHOMES T **47**

I – Classification, clinique et épidémiologie 47

1) Classification 47

1-1. Complexité du compartiment lymphocytaire T normal 48

1-2. Les types de lymphomes T 48
2) Clinique 51
2-1. Découverte de la maladie 51
2-2. Diagnostic 51
2-3. Pronostic 52
2-4. Complications 52
2-5. Traitements 52
3) Epidémiologie 53
3-1. Evolution et répartition 53
3-2. Une hétérogénéité dans l'incidence des différents sous-types de lymphomes T 54
3-3. Facteurs de risque 54
II – Physiopathologie des lymphomes T 54
1) L'activation lymphocytaire T comme mécanisme de lymphomagenèse 55
1-1. Stimulations exogène 55
1-1.a - Biologie de l'activation des lymphocytes T normaux 56
1-1.b - Les stimulations exogènes comme éléments initiateurs de la transformation T 59
1-1.b-i) Cas de l'EATL et de la maladie coeliaque (MC) 60
1-1.b-ii) Cas des lymphomes T cutanés 64
1-1.b-iii) Cas des T-LGL 67
1-1.b-iv) Cas des ALCL associés aux prothèses mammaires 69
1-1.b-v) Cas des infections chroniques (transformation indirecte) 71
Lymphomes T cutanés 73
Lymphome T hépatosplénique (HSTL) 75
1-1.c - Les stimulations exogènes comme facteurs de croissance et de survie tumorale 76
1-1.c-i) Signal 1 : le TCR 77
1-1.c-ii) Signal 2 : les molécules de costimulation 78
1-1.c-iii) Signal 3 : Les cytokines 79
1-2. Stimulations endogènes 80
1-2.a - Signal 1 : le TCR 80
1-2.a-i) Fusion ITK-SYK 80
1-2.a-ii) GTPases (Ras, Rho…) et molécules associées 81
1-2.b - Signal 2 : les molécules de costimulation 83
1-2.c - Signal 3 : Les cytokines et voies de signalisation associées 84
2) Modifications épigénétiques 86
2-1. TET2, DNMT3A et lymphomes T_{FH} 86
2-2. SETD2 et autres membres de la famille des SET Domain 88
3) Voie p53 89
CHAPITRE C – LES LYMPHOMES T « NON-CONVENTIONNELS » 92
I – LES DIFFERENTES ENTITES DE LYMPHOMES T « NON-CONVENTIONNELS » 92
1) Les lymphomes T gamma-delta 92
1-1. Les lymphomes T hépatospléniques (HSTL) 92
1-2. Les lymphomes T cutanés gd (PCGD-TCL) 93
1-3. MEITCL 93
2) Autres (NKT, MAIT) 93
2-1. Lymphomes MAIT 93
2-2. Lymphomes NKT/CD1d-restreints 94
II – IMPORTANCE DES FACTEURS EPIGENETIQUES 95
1) SETD2 et lymphomes Tgd 95
2) Id2 et Id3 96
3) Cas des lymphoproliférations NKT 96
RESULTATS 99
ARTICLE 1 : 102
ARTICLE 2 : 120
DISCUSSION 163
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 179

Liste des abréviations principales

Pour les abréviations des différentes entités de lymphomes T, voir Tableau 3 page 49

Ac/Ab	Anticorps/Antibody
Ag	Antigènes/Antigen
αGC	Alpha-galactosyl ceramide
APC	Antigen presenting cell
BCR	B-cell receptor
CD	Cluster of differenciation
CDR	Complementary determining region
CMV	Cytomegalovirus
CTCL	*Cutaneous T-cell lymphoma*
DAG	Diacylglycerol
DC	Dendritic cell
DETC	Dendritic epidermal T-cells
DP/DN	Double positive/Double negative (CD4/CD8)
EBV	Epstein-Barr virus
Egr	Early growth response
FcR	Fragment crystallizable receptor
GSL	Glycosphingolipid
HBV	Hepatitis B virus
HCV	Hepatitis C virus
HIV	Human immunodeficiency virus
HTLV	Human T cell leukemia/ lymphoma virus
ICOS	Inducible T-cell costimulator
IEL	Intra-epithelial lymphocytes
IFN	Interferon
IL	Interleukine
IP_3	Inositol 1, 4, 5-triphosphate
ITK	Inducible T cell kinase
JAK	Janus kinase
LAT	Linker for activation of T cells
LCK	Lymphocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAIT	Mucosal associated invariant T-cell
MHC	Major histocompatibility complex
MR1	MHC-related protein 1
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF-kB	Nuclear factor-kappa B
NGS	Next Generation Sequencing
NK	Natural-Killer
NKT	Natural-Killer T-cell
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PD-1	Programmed cell death protein 1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP_2	Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate
PLCγ	*Phospholipase C gamma*
PLZF	Promyelocytic leukemia zinc finger
PRR	Pattern recognition receptor
PTCL	*Peripheral T-cell lymphoma*
SAP	SLAM-associated protein
SH	Src homology region
SLAM	Signaling lymphocytic activation molecule
SLP-76	SH2 domain containing leukocyte 76kD protein
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SYK	Spleen tyrosine kinase
TCR	T-cell receptor
T_{FH}	Follicular helper T lymphocyte
T_H	Helper T lymphocyte
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
VDJ	Variable, Diversity, Joining
ZAP70	Zeta-chain associated protein kinase 70

Résumé

Les lymphomes T périphériques (PTCL) sont des néoplasmes rares et agressifs représentant environ 12% des lymphomes chez l'Homme. Nos travaux récents dans des souris *p53*$^{-/-}$ ont révélé une nouvelle entité de PTCL, émergeant de cellules Natural-Killer T-cell (NKT), un type particulier de lymphocyte T reconnaissant des antigènes lipidiques. Nous avons montré que ces lymphomes NKT (PTCL-NKT) présentent des caractéristiques de NKT stimulés chroniquement, et que la lymphomagenèse est initiée via l'activation chronique du TCR. Chez l'Homme, de nombreux PTCL sont suspectés pour être associés à des stimulations antigéniques chroniques, mais les mécanismes de transformation impliqués sont encore mal connus.

Borrelia burgdorferi (*Bb*), l'agent responsable de la maladie de Lyme, provoque des infections chroniques dont l'implication dans certains lymphomes T cutanés (CTCL) a été suggérée. Cependant, cette observation manque de preuves cliniques et expérimentales. De manière intéressante, *Bb* est connue pour exprimer des glycolipides activateurs des NKT. Nous avons donc infecté des souris *p53*$^{-/-}$ avec des *Bb* vivantes, et montré que l'infection augmente significativement la fréquence des PTCL-NKT. Par traitement antibiotique précoce de souris infectées et par injections de *Bb* inactivées, nous avons également démontré que la chronicité de l'infection est nécessaire au développement de ces lymphomes. L'analyse phénotypique de ces PTCL-NKT a confirmé nos observations précédentes, montrant des caractéristiques de cellules NKT activées chroniquement, telles que l'expression de marqueurs d'activation et d'exhaustion (perte de NK1.1, surexpression de PD-1). Ces résultats suggèrent une implication de *Borrelia* dans la lymphomagenèse T. En se basant sur l'analyse de différents marqueurs phénotypiques et de leur production cytokinique, nous avons également montré que ces lymphomes présentent un profil dérégulé se rapprochant du sous-type NKT2. Une étude génomique par séquençage *whole-exome* sur 6 PTCL-NKT a révélé de larges pertes récurrentes du chromosome 13. Au sein de la zone minimale de délétion, nous avons identifié *Jarid2*, codant un facteur épigénétique impliqué dans le développement NKT par une activité histone-methytransférase. Ce gène est retrouvé altéré dans 20% des CTCL. De manière intéressante, les souris *Jarid2*$^{-/-}$ présentent une expansion périphérique de NKT au profil immature/NKT2, partageant donc des caractéristiques avec les PTCL-NKT. La perte de *Jarid2* a été détectée dans presque tous les PTCL-NKT. Nous avons confirmé la perte de Jarid2 au niveau ARN et protéique. Nos résultats préliminaires montrent une hypométhylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9), la cible de Jarid2, soutenant un effet fonctionnel dans la physiopathologie des PTCL-NKT. Par conséquent, nous pensons que la perte de Jarid2 pourrait être un événement important de la lymphomagenèse NKT, puisque de plus en plus d'altérations de facteurs épigénétiques sont retrouvées dans les PTCL humains. Pour réponse à cette question, nous sommes notamment en train de générer des souris *p53*$^{-/-}$ x *Jarid2*$^{-/-}$.

En conclusion, nos données viennent renforcer le concept selon lequel certaines infections peuvent initier la transformation des cellules T par l'activation chronique du TCR. Nous avons également identifié un nouveau facteur épigénétique potentiellement impliqué dans la lymphomagenèse NKT.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE A : LES LYMPHOCYTES T NON CONVENTIONNELS

Le système immunitaire est un ensemble complexe de composantes anatomiques, cellulaires et moléculaires. On distingue généralement deux types d'immunités :

- L'immunité innée, qui intervient dans les phases précoces. Sa mise en place se fait par la reconnaissance de signaux de danger non spécifiques comme les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) via leurs récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR). Elle s'associe toujours au développement d'une inflammation. Au delà de l'effet rapide de l'immunité innée, elle va déclencher le second type d'immunité.
- L'immunité adaptative, plus longue à se mettre en place, va permettre une réponse spécifique face au signal pathogénique rencontré (agents infectieux, allergènes…), dont les acteurs principaux sont les lymphocytes T et B. Une prolifération clonale de lymphocytes dirigés contre des antigènes précis a alors lieu. Il s'en suit également la mise en place d'une réponse mémoire, qui permettra une réponse plus rapide et plus efficace lors d'un prochain contact avec les antigènes en question.

Cependant, il existe un certain nombre d'acteurs cellulaires qui présentent des caractéristiques à la frontière entre l'inné et l'adaptatif. Ils possèdent en effet des capacités effectrices/cytotoxiques tout en ayant un mode d'activation rapide, et ne nécessitant pas forcément de reconnaissance antigénique. C'est le cas des Natural-Killer (NK), dont l'activation repose sur une balance entre signaux inhibiteurs et activateurs.

D'autre part, certaines populations lymphocytaires T et B possèdent un récepteur antigénique au panel de reconnaissance tellement large qu'il peut être comparé à la reconnaissance type PAMPs/PRR, et ces cellules sont généralement qualifiées de « innate-like », ou encore de lymphocytes non conventionnels. Que ce soit le récepteur antigénique B (le BCR) ou T (le TCR), on parle alors de polyréactivité antigénique. Les lymphocytes B de la zone marginale en sont un exemple, mais nous nous concentrerons dans cette thèse sur les principales populations T possédant ce type de caractéristiques : les lymphocytes T γδ, les lymphocytes T Natural-Killer (NKT), et les MAIT (Musosal Associated Invariant T cells).

I - Les Natural Killer T-cells (NKT)

1) Généralités

Tout comme leur nom le laisse supposer, les « Natural-Killer T cells», ou NKT, ont à l'origine été décrits chez la souris comme des cellules T (possédant un TCR) $CD4^+$ ou $CD4^-$ /$CD8^-$ (DN) exprimant NK1.1, un marqueur caractéristique de cellules NK (exprimé dans le fond génétique murin C57Bl/6). Paru en 1994, le premier papier décrivant ce type particulier de cellules parle alors de thymocytes NK1.1[1]. Rapidement, les travaux d'Albert Bendelac (entre autres) posent alors de nombreuses bases sur les caractéristiques NKT, bases que nous approfondirons tout au long de cette partie introductive : reconnaissance d'antigènes lipidiques via des molécules de présentation « MHC-*like* » (CD1d)[2], production de grande quantité de cytokines[3], expression d'un TCR semi-invariant[4-6]…

Toutefois, il est intéressant de noter que quelques années auparavant, une étude mettait déjà en évidence une population de thymocytes présentant un biais d'expression des gènes variables de la chaine β (Vβ) du TCR, en faveur de Vβ8[7], autre caractéristique retrouvée chez une partie des NKT. De même, certaines études au tout début des années 90 évoquaient des lymphocytes T hépatiques DN exprimant un niveau de CD3 intermédiaire et CD122 (IL-2Rβ) constitutivement[8].

Bien que les recherches dans ce domaine aient rapidement progressé, les chercheurs de l'époque avec les outils à leur disposition ne pouvaient observer que la partie émergée de « l'iceberg » NKT, puisque ces lymphocytes se sont révélés par la suite bien plus variés, avec de très nombreuses populations hétérogènes, aux fonctions parfois antagonistes. Les NKT sont encore aujourd'hui le fruit de découvertes, et malgré les progrès technologiques accomplis, certains aspects de leur biologie demeurent inconnus. Nous considèrerons dans ce travail de thèse les NKT comme des lymphocytes T αβ CD1d-restreints.

Lorsque l'on parle de lymphocytes NKT, il s'agit habituellement des NKT dits « invariants » (iNKT) également appelés NKT de type I. Cette généralisation quelque peu abusive est sans nul doute le reflet d'une certaine méconnaissance des autres types de NKT, que nous évoquerons plus bas : NKT de type II (ou dNKT, pour « diverse » NKT), NKT-*like*... Cette partie introductive se concentrera donc principalement sur les iNKT, dont la biologie est

mieux connue, mais peut tout de même être entendue dans une certaine mesure à la biologie des autres NKT.

Il est également intéressant de noter que les iNKT représentent la majorité des NKT chez la souris, et que la tendance inverse est observée chez l'homme, où les dNKT sont majoritaires. Grace aux nombreux modèles transgéniques développés et la prédominance des iNKT, les fonctions NKT sont donc bien mieux décrites chez la souris.

1-1. Un TCR particulier pour une restriction particulière

Comme mentionné précédemment, les lymphocytes iNKT expriment un TCR invariant, ou plutôt semi-invariant : une chaine Vα14-Jα18 (Vα24-Jα18 chez l'homme) constante, associée à une chaine Vβ semi-invariante : Vβ8, Vβ7 ou Vβ2 chez la souris et Vβ11 chez l'homme[4-6]. L'expression de ce TCR est la première étape permettant le processus de différenciation NKT (voir partie 2 sur le développement). En effet, ce TCR leur confère une restriction CMH bien particulière puisque qu'elles ne reconnaissent non pas des peptides présentés par les molécules de CMH classiques I et II (comme c'est le cas pour les T conventionnels), mais des antigènes lipidiques présentés par une molécule « CMH I-like » non polymorphique : CD1d[3]. L'alpha-galactosylceramide (αGC), un glycolipide dérivé d'une éponge marine (*Agelasmauritianus*) fut le premier ligand NKT identifié, ayant la particularité d'être reconnu par tous les iNKT[9]. Cet antigène a engendré le développement de tétramères de CD1d chargés avec l'αCG, permettant ainsi un marquage simple des iNKT par cytométrie en flux[10,11]. Ces tétramères sont encore très largement utilisés aujourd'hui et restent le meilleur moyen de marquer et d'isoler les iNKT (**Figure 1**).

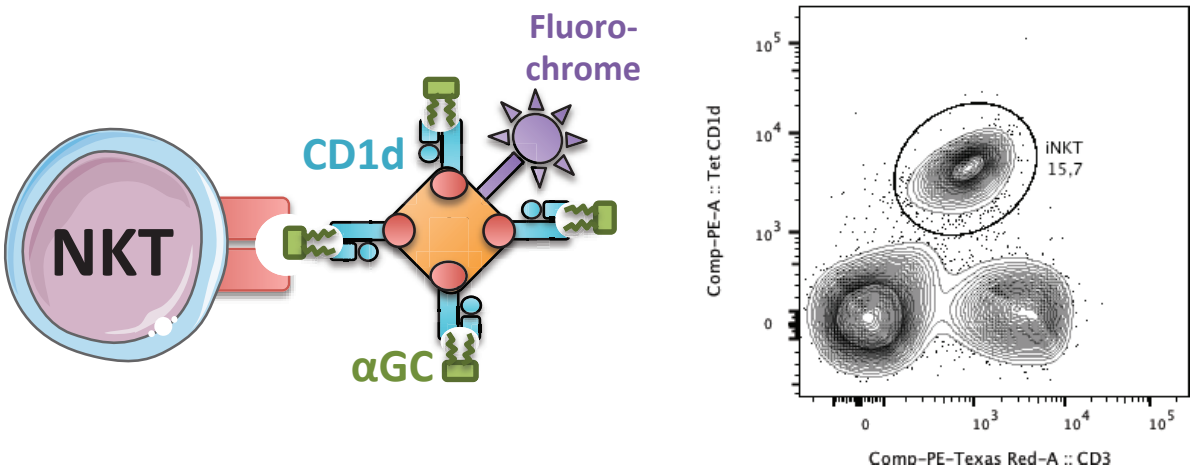


Figure 1 : Représentation d'un tétramère de CD1d chargé en alpha-galactosyl-ceramide (αGC) et exemple d'un marquage des iNKT hépatiques par cytométrie en flux

De nombreux lipides exogènes (pour la plupart bactériens) et endogènes ont depuis été identifiés, et souvent associés avec un rôle important des NKT dans les réponses aux infections bactériennes (voir partie 4).

1-2. Les sous-types de iNKT

Bien que les NKT de type I soient dit « invariant », il existe tout de même une certaine hétérogénéité fonctionnelle au sein même de cette population. A l'instar des lymphocytes T *helper* (T_H) catégorisés en fonction de leur panel cytokinique sécrété (T_H1, T_H2, T_H17…), il existe des sous-types de NKT aux propriétés bien distinctes, dont la dénomination s'est faite par analogie avec celle des T *helper*, soit NKT1, NKT2, NKT17, une dénomination de mieux en mieux admise[12,13]. Leur différenciation a principalement lieu au niveau thymique, contrairement aux T_H dont la différentiation à partir d'un T $CD4^+$ naïf puis d'un T_H0 se fait en périphérie au moment de leur activation. Ceci souligne le caractère « effecteur » des NKT, ainsi que leur capacité à être rapidement activés. Au delà des cytokines produites, les sous-types peuvent être caractérisés par un ensemble de marqueurs de surface (notamment de domiciliation), ainsi que des facteurs de transcription ayant des rôles clés dans leur différentiation (qui seront abordés plus en profondeur dans la partie 2 sur le développement NKT), comme T-bet, PLZF et RORγT, marqueurs respectifs des NKT1, 2 et 17. Cette classification étant encore relativement récente, il existe assez peu de données dans la littérature adressant le rôle spécifique de chaque sous-type, la plupart des études se concentrant pour le moment sur les facteurs influençant leur différenciation.

Les NKT1, principaux producteurs d'IFN-γ (et dans une moindre mesure d'IL-4) sont localisés dans la rate et le foie[14]. Les NKT2 sécrètent de l'IL-4 et IL-13 et sont principalement $CD4^+$. Cette population est parfois qualifiée d'immature puisque correspondant aux NKT de stade 2 (discuté dans la partie 2). Il semblerait qu'il y ait en réalité différents niveaux de maturité au sein des NKT2. On les retrouve en grande partie dans le thymus (où l'on trouve leur versant immatures), les ganglions mésentériques et les poumons. Les NKT17 eux sécrètent majoritairement de l'IL-17 ainsi que de l'IL-22, et ont donc un rôle pro-inflammatoire très important. Ces NKT sont préférentiellement DN et présents dans les poumons, la peau et les ganglions. (**Tableau 1**)

Chez l'homme, ces distinctions ne sont pas aussi claires. Les NKT produisant des cytokines type T_H1 sont plutôt DN, alors que les $CD4^+$ ont un profil mixte T_H1/T_H2[15]. Il existe également chez l'homme certains NKT $CD8^+$, population rare voire absente chez la souris.

A noter qu'il a été également décrit d'autres sous-types de NKT : des NKT « *follicular helper* » (Bcl-6^{+})[16] ou encore des NKT régulateurs producteurs d'IL-10[17].

Tableau 1 : Principales caractéristiques des 3 sous-types de NKT, identifiées par des facteurs de transcription, la production de cytokines, des marqueurs de surface et la localisation anatomique. D'après Lee *et al*., Nat Immunol 2013 et Engel *et al*., Nat Immunol 2016

Sous-type	PLZF	T-bet	RORγT	Cytokine principale	Marqueurs de surface	Localisations principales	Equivalence classification classique
NKT2	High	-	-	IL-4	CD4^{+} CD27^{+}, CD122^{-} ICOS^{+}	rate, poumons	Stade 1 et 2 (CD24^{-}, NK1.1^{-}, CD44^{-} ou CD24^{-}, NK1.1^{-}, CD44^{+})
NKT17	Intermediate	-	+	IL-17	CD4^{-} CD27^{-}, CD122^{-} ICOS^{+}, CD138^{+}, CCR6^{+}	ganglions, poumons, peau	Stade 2 (CD24^{-}, NK1.1^{-}, CD44^{+})
NKT1	Low	+	-	IFN-γ	CD4^{+} ou CD4^{-} CD27^{+}, CD122^{+} CD49a^{+}, CXCR3^{+}	foie, rate	Stade 3 (CD24^{-}, NK1.1^{+}, CD44^{+})

1-3. Les dNKT

Les NKT de type II, ou dNKT sont bien moins caractérisés que les iNKT de par l'absence d'outils permettant leur identification de manière simple comme les tétramères CD1d-αGC pour les iNKT. Ces cellules possèdent un répertoire Vα et Vβ du TCR plus varié comparé aux iNKT, leur conférant une spécificité antigénique diverse, d'où l'absence d'Ag prototypique liant l'ensemble des dNKT. Il est communément admis que les dNKT représentent la majorité des NKT chez l'homme, par opposition à la souris[18,19].

La première démonstration directe de l'existence de cette population fut réalisée dans le contexte de maladie auto-immune où Jahng *et al* ont montré la réactivité d'une population NKT particulière envers le sulfatide, un glycolipide endogène dérivé de la myéline[20]. Des tétramères CD1d-sufatides ont alors été produits. Bien qu'il soit délicat de s'exprimer sur une estimation précise, il est clair que seulement une partie des dNKT reconnaissent le sulfatide, une réactivité d'ailleurs partagée avec certains lymphocytes T γδ.

Leur étude a également reposé sur l'analyse comparée des souris *CD1d*$^{-/-}$ (déficientes en toutes cellules CD1d-restreintes)[21] et *Jα18*$^{-/-}$ (déficientes en iNKT seulement)[22]. Ce dernier modèle induit néanmoins, de par sa construction génique, un biais d'usage des Jα dans l'ensemble du repertoire T, remettant potentiellement en question les études sur les iNKT et les dNKT réalisées dans ces souris[23]. De nouveaux modèles *Jα18*$^{-/-}$ ne présentant pas un tel biais ont depuis été développés[24,25]. Cette parenthèse sur ces modèles montre à quel point une partie des études fonctionnelles des dNKT n'a été faites que de manière indirecte, reflet du manque d'outils à disposition, souvent cantonnés à des hybridomes sulfatide-réactifs.

Depuis le sulfatide, un certain nombre de lipides reconnus par les dNKT ont été identifiés, pour la plupart d'origine endogène : glycosphingolipides (βGalCer, βGlcCer[26,27]), phospholipides (Lysophosphatidylcholine[28])… A l'inverse, des lipides d'origine microbienne sont plus rarement décrits[29]. Il existe un certain recouvrement de reconnaissance par les dNKT entre ces différents ligands, montrant une réactivité croisée de leur TCR, permettant sans doute une reconnaissance antigénique finalement assez large, comme les iNKT.

1-4. NKT-*like*

Contrairement à tous les autres NKT, les lymphocytes dits « NKT-*like* », ne sont pas CD1d-restreints. Il s'agit en réalité de lymphocytes T « classiques » (principalement CD8+), mais exprimant un certain nombre de récepteurs NK (CD16, CD56, CD57, CD161, CD94, NKG2A) et n'exprimant pas la molécule de co-stimulation CD28[30]. Relativement rares chez l'homme à la naissance[31], leur nombre augmente avec l'âge[32]. Finalement, les NKT-*like* possèdent tous les aspects d'un lymphocyte T activé chroniquement, aspects très bien synthétisés dans la revue de Seyda *et al* : « T-cells going Innate »[33,34].
Il ne serait donc pas surprenant que ces NKT-*like* ne soient en réalité qu'une population de T « vieillissants », émergeant de stimuli antigéniques répétés, et qui finalement ne partagent que très peu de points communs avec les NKT (pas de restriction particulière, non-reconnaissance d'Ag lipidiques…).

2) Développement

Les lymphocytes NKT entament leur développement au niveau thymique à partir des mêmes précurseurs double positifs $CD4^+$ $CD8^+$ (DP) que les T conventionnels αβ. Cependant, contrairement à ces derniers, les NKT sont sélectionnés par CD1d[35,36]. Cette molécule est exprimée par la plupart des cellules présentatrices d'antigènes, et en particulier par les thymocytes DP eux-mêmes dans le cadre de la sélection thymique.

2-1. Le signal TCR, premier événement de la différenciation NKT

La différenciation des précurseurs DP vers la lignée iNKT semble alors avoir lieu à la suite des réarrangements VDJ (Variable, Diversity, Joining) et une fois l'acquisition (probablement aléatoire) du TCR semi-invariant leur étant propre. La réactivité alors acquise par les

précurseurs DP envers CD1d est le point de départ de tout le processus de différenciation NKT. Il se met alors en place une synapse DP-DP unique médiée par plusieurs interactions homotypiques (SLAM et Ly108)[37], coopérants ainsi avec un signal TCR fort. En effet, l'interaction TCR-CD1d (chargé en lipide endogène que nous détaillerons par la suite) a été montrée pour induire un signal TCR élevé, comparé à celui mesuré dans des lymphocytes T conventionnels[38]. Il existe cependant une fenêtre d'affinité optimale lors de cette étape puisqu'une interaction faible est insuffisante pour induire l'engagement dans la différenciation NKT, alors qu'une interaction trop forte engendre une sélection négative des précurseurs[39]. Ces mécanismes, surtout montrés chez les iNKT, sont également vrais pour les dNKT[40,41].

Par ailleurs, de plus en plus d'articles démontrent l'importance de certains facteurs épigénétiques dans le programme de différenciation NKT tels que Jarid2[42], Ezh2[43], Tet2/Tet3[44], ou encore UTX et JMJD3[45], montrant dans certains cas leur lien avec le signal TCR.

2-2. PLZF, le « *master regulator* » NKT

De la coopération des ces signaux résulte alors une expression élevée d'Egr-1 et Egr-2[46,47], qui vont réguler un ensemble de gènes impliqués dans le processus de développement NKT, et en particulier PLZF en agissant directement sur le promoteur de son gène, *Zbtb16*[48], le « *master regulator* » NKT. Egr-2 induit également l'expression d'autres gènes, moins spécifiques, mais tout aussi importants : *Il2rb* (chaine β du récepteur à l'IL-15)[49] ou encore *Ccnd2* (cycline D2).

La régulation de l'expression de PLZF est permise par des modifications épigénétiques de son promoteur, régulées principalement par des enzymes telles que les complexes methyltransferases Ezh2 ou Jarid2, deux répresseurs de PLZF qui vont intervenir à des stades plus tardifs de la différenciation[43]. Des modèles murins ont permis de montrer que la délétion des ces protéines clés spécifiquement dans le contingent lymphocytaire T induit par ailleurs une expansion *iv vivo* de iNKT au profil immature[42,50]. De même, les souris *PLZF*$^{-/-}$ possèdent un nombre très réduit de NKT, avec un profil immature aux productions cytokiniques abolies. A l'inverse, une surexpression de PLZF conditionnelle du promoteur de CD4 est suffisante pour induire dans le compartiment T un phénotype « innate-like » proche du profil NKT (CD44^{+}, CD62L^{-}, sécrétion non polarisée de cytokines…)[51], montrant encore une fois le caractère clé de PLZF dans l'acquisition des propriétés NKT. Tout ceci illustre la programmation fine de ces facteurs dans l'acquisition des fonctions effectrices NKT[52,53].

Bien que l'importance de ce facteur de transcription soit connue depuis plus d'une dizaine d'année, l'ensemble des gènes dont il va influencer la transcription n'ont pu être identifiés que récemment, notamment grâces aux progrès technologiques réalisés en ChiP-Seq[54]. PLZF régule l'expression de gènes de récepteurs à cytokines (*Il12rb1, Il18r1*), de domiciliation (*CCR4*) et d'adhésion (*CD44*, *CD62L*). Bien que les gènes des cytokines principalement sécrétées par les NKT (IL-4, IL-17, IFN-γ) ne soient pas directement régulés par PLZF, il favorise leur expression par la répression de *Bach2*, lui même répresseur clé du programme effecteur des T_H.

2-3. Les stades de différenciation NKT

Le processus de différenciation des lymphocytes NKT est encore sujet à de nombreuses incertitudes. A l'origine le modèle de différenciation était considéré comme linéaire, avec différents stades successifs définis par des phénotypes distincts: le stade 0 ($CD24^+$, $NK1.1^-$, $CD44^{low}$), le stade 1 ($CD24^-$, $NK1.1^-$, $CD44^{low}$), le stade 2 ($CD24^-$, $NK1.1^-$ $CD44^{hi}$), stade à partir duquel les NKT migrent en périphérie, hors du thymus où elle vont acquérir leur stade terminal de différenciation, le stade 3 ($CD24^-$, $NK1.1^+$, $CD44^{hi}$)[55]. (**Tableau 1**)

Il se trouve que les sous-types iNKT (NKT1/NKT2/NKT17) présentent des similitudes phénotypiques avec les différents stades décrits, et plusieurs études ont montré que le modèle de différenciation est plutôt branché et non pas linéaire, permettant le développement par différentes voies des sous-types NKT[56] (**Figure 2, Tableau 1**). Le processus de différenciation serait alors guidé par l'expression des différents facteurs de transcription clé, tels que T-bet, PLZF et RORγT. Les NKT2 sont alors parfois considérés comme immature, puisqu'ils correspondent principalement au stade 2. Il était au départ pensé que les NKT2 pouvaient se différencier en autres sous-types. En réalité il n'est pas certain qu'il existe des NKT2 « immatures » (stade 1) et le système branché montre plutôt que les NKT2 sont des cellules matures, et ne peuvent pas se différencier en autres sous-types. Cette classification est encore récente et de nouvelles publications viennent régulièrement préciser ce modèle de différenciation. Cependant, les éléments déterminant l'évolution vers tel ou tel sous-type NKT ne sont encore que très peu connus. Par exemple, l'activation de la voie SLAM/SAP favoriserait plutôt le développement vers la voie NKT2, ainsi que leur différenciation terminale[57]. Certains signaux répertoriés favorisant la différenciation vers tel ou tel sous-type sont abordés dans une revue de L.Gapin parue en 2016 dans *Current Opinion in Immunology*[58] et indiqués dans la figure 2.

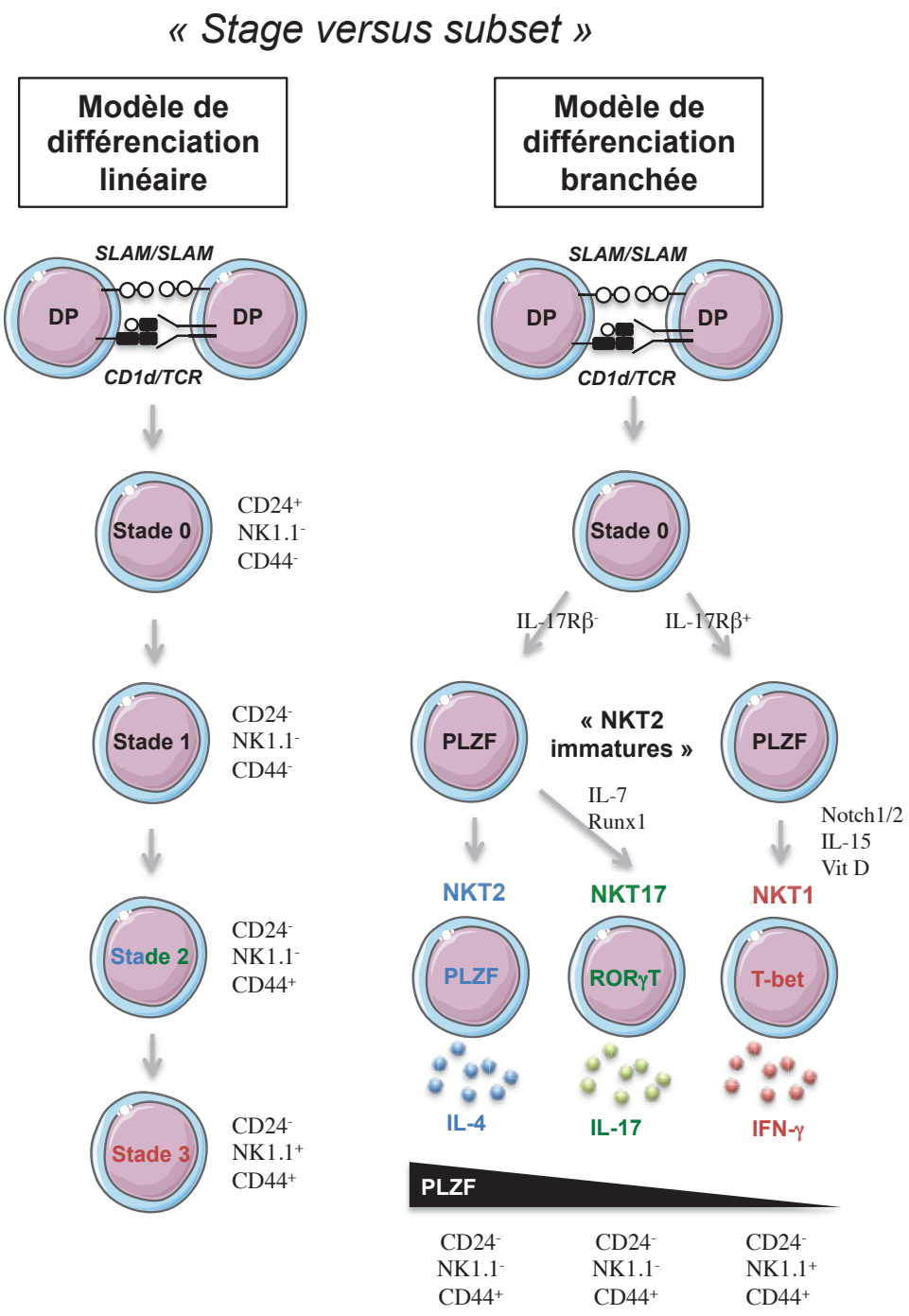


Figure 2 : Représentation des 2 modèles de différenciation NKT. Le modèle de différenciation classique (linéaire) est progressivement abandonné en faveur du modèle branché depuis la découverte des sous-types de NKT en 2013.
D'après Lee *et al*., Nat Immunol 2013, adapté selon la revue de Gapin, Curr Opin Immunol 2016

2-4. Rôle des lipides dans la sélection thymique

La sélection positive des précurseurs NKT est induite par des antigènes lipidiques assez mal connus il y a encore peu. Les premiers candidats étudiés furent des glycosphingolipides

(GSL), molécules présentant des similarités avec l'αGC. Ainsi il a été décrit un défaut d'activation NKT dans un modèle déficient en β-D-glucosylceramide synthase (et donc déficiente en β-D-glucosylceramide, un précurseur de nombreux GSL)[59], avec un potentiel rôle de l'isoglobotrihexosylceramide (iGb3)[60]. Cependant ces résultats ont été contredits par la démonstration du développement normal des iNKT dans des souris *iGb3*$^{-/-}$, et l'absence de cet antigène chez l'homme et la souris dans presque tous les organes analysés, notamment dans le thymus. Les résultats précédents peuvent alors s'expliquer par un défaut du métabolisme glycosphingolipidique plus global dans le modèle murin de Stanic[61,62]. D'autres lipides non-GSL ont par la suite été étudiés[63]. Quoi qu'il en soit, il n'existe à l'heure actuelle pas de réel consensus quand aux lipides endogènes impliqués dans la sélection thymique NKT. Il est probable qu'il existe une certaine redondance entre de nombreux antigènes impliqués dans ce mécanisme. Des travaux plus récents montrent néanmoins que contrairement à ce qui était admis, les cellules de mammifères sont capables de synthétiser des lipides d'anomérie α : α-monoglycosylceramides et même αGalCer[64]. L'anomérie α était à l'origine considérée comme une signature caractéristique d'une origine microbienne pour les NKT mais la démonstration de leur présence dans nos cellules et de leur importance dans la sélection positive des NKT remet en cause l'idée que l'on avait pu se faire du rôle des lipides endogènes β.

La reconnaissance de lipides endogènes par les NKT lors de leur sélection positive pose la question de la génération de cellules autoréactives, et donc de leur élimination via la sélection négative. Un défaut de développement est observé *in vivo* lorsque leur sélection se fait en présence de forts agonistes[65] et cette sélection négative semble être induite par les thymocytes DP, mais aussi par les cellules présentatrice d'antigènes (CPA) thymiques[66].

3) Mécanismes d'activation

L'activation des NKT, qu'ils soient de type I ou II, nécessite en général l'interaction de leur TCR avec une molécule de CD1d chargée par un lipide. Cette interaction dépend donc du TCR lui même mais aussi du type d'antigène présenté.

Contrairement aux autres molécules de CD1 restreintes aux cellules hématopoïétiques, CD1d est une molécule relativement ubiquitaire, exprimée par les thymocytes et les APC comme évoqué précédemment, mais également par les hépatocytes, les cellules épithéliales, les adipocytes, ou encore les lymphocytes B de la zone marginale. CD1d peut présenter une

grande variété d'antigènes : glycosphingolipides, diacylglycerols, phospholipides, lipopeptides, étherlipides, et même d'autres petites molécules non-lipidiques (**Figure 3**).

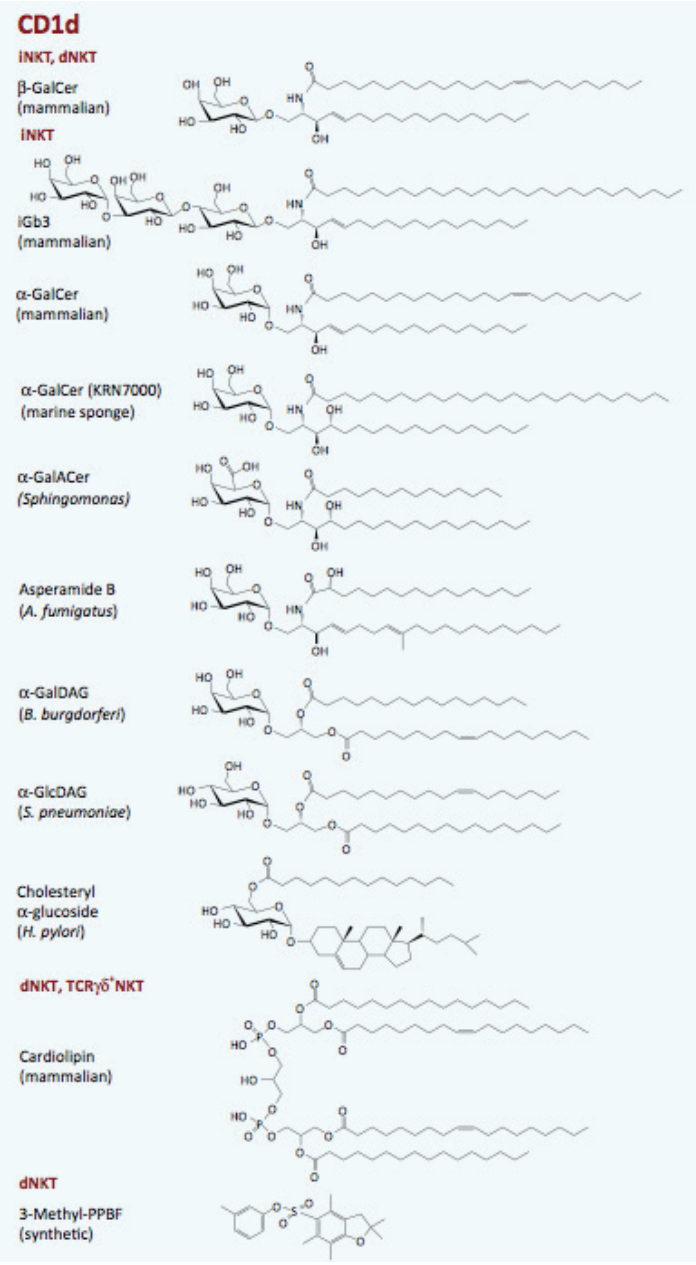


Figure 3 : Molécules lipidiques présentées par CD1d au différents types de NKT.
Extrait de Kael et al., Trends Immunol 2016.

3-1. Détection et prise en charge des lipides exogènes

Les APC telles que les cellules dendritiques sont à la base de l'initiation de l'activation NKT, notamment en leur présentant les antigènes lipidiques qu'elles sont capables de reconnaître. Les bactéries (ou autres micro-organismes) exprimant ce type de lipides activateurs des NKT sont principalement détectés par les APC via des mécanismes innés : phagocytose, récepteurs

scavenger, lectines… Des lipides « libres » associés à l'apolipoprotéine E (Apo-E) peuvent également être endocytés par le récepteur au LDL via un mécanisme clathrine-dépendant[67].
Les Ag glycolipidiques alors captés vont être pris en charge dans les endosomes tardifs et les lysosomes. C'est ici qu'ils entrent en contact avec CD1d, lui-même en constant cycle de renouvellement entre le RE, le golgi et la membrane plasmique, où ils est recyclé vers les lysosomes[68]. Des protéines de transfert lipidique telles que les saponines permettent alors le chargement des molécules de CD1d[69,70]. La présentation des lipides ainsi internalisés (exogènes) ou bien endogène est ensuite en grande partie contôlée par la régulation de la biosynthèse et du trafic de CD1d[71].

3-2. Présentation des antigènes glycolipidiques par CD1d

Les premières études cristallographiques de CD1d ont montré une structure similaire au CMH-I, avec un site de liaison aux antigènes particulièrement profond et hydrophobe et donc adapté à la présentation de lipides[72-74]. Ce site est composé de 2 poches principales, A' et F' dans lesquelles les queues lipidiques (hydrophobes) sont enfouies, présentant ainsi la tête lipidique (groupement carbohydrate hydrophile) au TCR NKT. Dans le cas de l'αGC par exemple, la chaine acyl gras est dans la poche A' et la chaine sphingosine dans la F'[73]. C'est également le cas pour un certain nombre d'autres antigènes NKT (β-GlyCer, sulfatide, iGb3, phosphoglycerolipides…). En ce qui concerne l'exposition de la tête hydrophile au TCR NKT, celle-ci est très dépendante de l'anomérie de l'antigène présenté : les groupements carbohydrates α (relativement plats) sont facilement accessibles par le TCR, alors que les groupements β (proéminents) sont « pliés » perpendiculairement à CD1d par l'interaction CD1d/TCR, adoptant une conformation proche des groupements α. Ce *fitness* explique pourquoi l'affinité du TCR iNKT pour des complexes CD1d/glycolipides β est considérablement plus faible que pour des glycolipides α[75,76].

3-3. Interaction CD1d/TCR

Comme déjà évoqué, l'appellation « iNKT » pour « invariant » est trompeuse puisque seulement la chaine α de leur TCR est invariante, la chaine β étant en réalité « semi-invariante » car représentée par un nombre limité de réarrangements des domaines VDJ. Au sein de chaque chaine, 3 régions CDR (pour C*omplementary Determining Region*) forment alors le site de reconnaissance antigénique, dont la diversité est amenée principalement par la boucle CDR3, car placée au site de jonction des réarrangements VDJ. En réalité, c'est

uniquement la CDR3β qui apporte cette diversité de séquence dans le cas des iNKT. Malgré cela, il était admis jusqu'à maintenant que la chaine β était peu impliquée dans la spécificité antigénique, mais plutôt affectait l'affinité envers certains auto-Ag lipidiques[75]. Or une étude récente montre que certains résidus de CDR3β humain (en particulier le 3ème acide aminé) influencent indirectement l'affinité, l'auto-réactivité et l'activation NKT via une modification de conformation de CDR3α[77]. La région CDR3α étant totalement invariable[78], elle n'en reste pas moins cruciale dans la reconnaissance antigénique iNKT, la zone de contact TCR/CD1d étant majoritairement à ce niveau. Ce mode d'ancrage impose ainsi une orientation parallèle entre CD1d et le TCR iNKT, contrairement à l'ancrage CMH/TCR « classique » qui lui est en diagonale[79] (**Figure 4**).

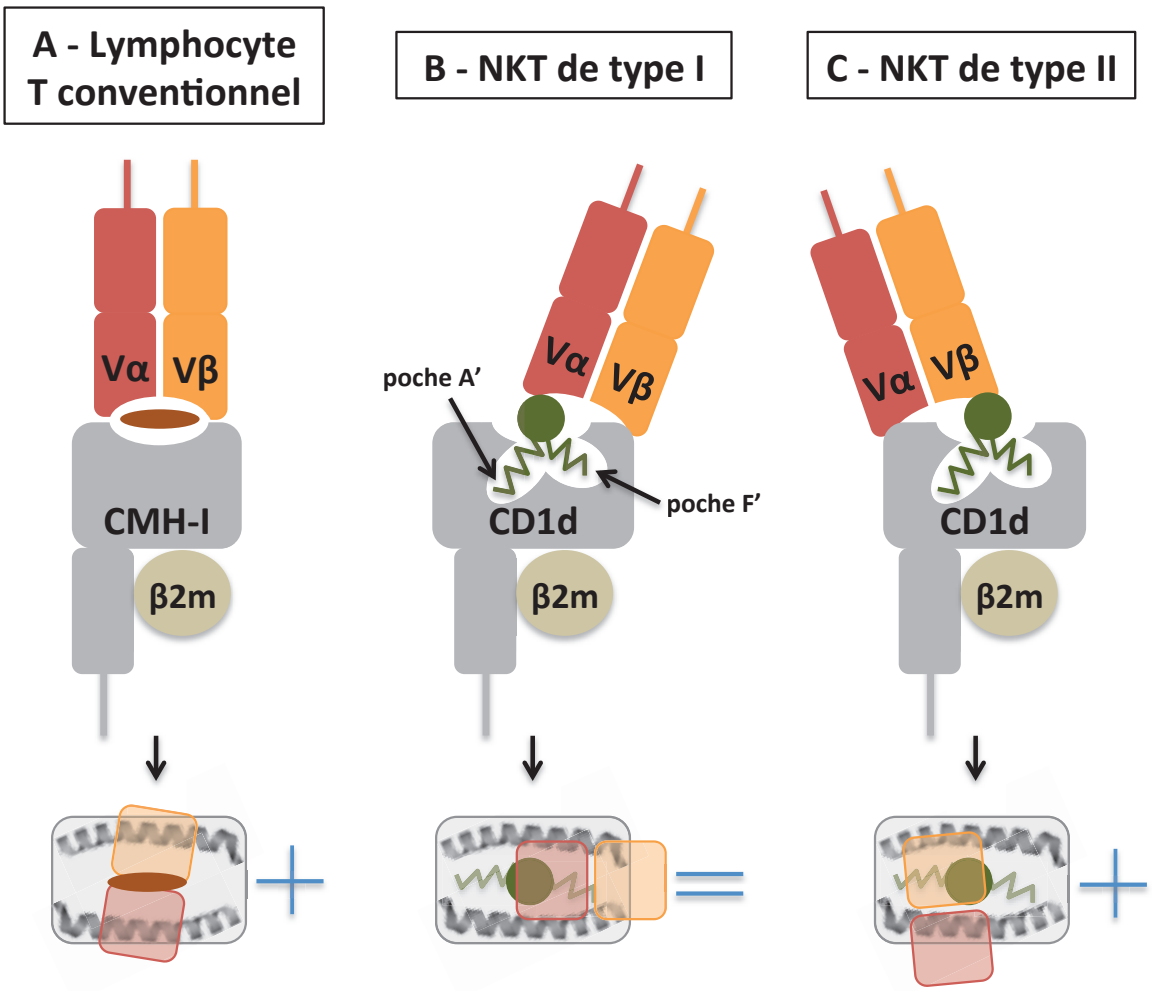


Figure 4 : Vue schématique des modes de reconnaissance des antigènes lipidiques présentés via CD1d par les NKT type I et type II, en comparaison à la reconnaissance de peptides présenté via CMH-I par les lymphocytes T conventionnels. La panel du bas représente une vue par-dessus le TCR. **A)** Les 2 chaines α et β du TCR interagissent avec le peptide présenté, de manière perpendiculaire aux chaines α du CMH. **B et C)** L'Ag lipidique est ancré dans les poches hydrophobes A' et F' via ses chaines acyls. La tête polaire lipidique à la surface de CD1d est présentée au TCR NKT. **B)** La chaine α des NKT de type I (iNKT) interagit avec l'Ag lipidique et la chaine β avec CD1d, imposant une orientation parallèle au CD1d. **C)** A l'inverse, c'est la chaine β du TCR des NKT de type II (dNKT) qui interagit avec l'Ag, imposant une conformation perpendiculaire au CD1d, proche de ce qui est observé pour les T conventionnels.
D'après Macho-Fernandez et al., Front Immunol 2015

L'interaction CD1d-sulfatide avec le TCR dNKT présente elle des caractéristiques mixtes entre iNKT et T conventionnel : les 2 chaines α et β entrent en contact avec CD1d, donnant une orientation en diagonale (qui ici n'est pas imposée par l'expression des co-récepteurs CD4 ou CD8[80]), et une seule chaine est impliquée dans la reconnaissance antigénique, mais cette fois via CDR3β[81] (**Figure 4**).

Le rôle des co-recepteurs CD4 (et CD8 dans une moindre mesure) n'est que peu connu. Le profil $CD4^+$ ou DN étant associé à un profil plutôt T_H2 ou T_H1 respectivement, CD4 aurait sans doute un rôle dans la potentialisation des réponses NKT type T_H2[82]. Etrangement, alors que chez la souris l'expression de CD8 sur les précurseurs NKT induit leur élimination[6], les NKT $CD8^+$ représentent une part importante des NKT chez l'homme, mais la fonction de CD8 n'a pas encore été adressée dans la littérature.

3-4. Le signal TCR

Comme tout lymphocyte T l'activation des NKT via leur TCR va nécessiter la mise en place d'un certain nombre de voies de signalisations. L'engagement de la chaine α enclenche l'activation de tyrosine kinases proximales LCK et ZAP70, induisant la phosphorylation de la phospholipase Cγ1 (PLCγ1), elle-même responsable de l'hydrolyse du phosphatidylinositol-bisphosphate (PIP_2) membranaire. Cette hydrolyse produit l'inositol-triphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DAG), deux seconds messagers essentiels du signal TCR. L'IP_3 provoque le relargage de calcium depuis le réticulum endoplasmique vers le cytoplasme, menant à l'activation de la calcineurin, Cette enzyme est responsable de la déphosphorylation de NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) et sa translocation nucléaire. NFAT va alors induire l'expression de plusieurs gènes propres à l'activation T, et notamment Egr1 et 2, dont nous avons déjà évoqué l'importance dans le développement NKT[83]. DAG va lui activer plusieurs voies, comme celle de RasGRP1 et Erk1/2[84,85], ou encore coopérer avec les signaux SLAM/SAP pour activer NF-κB (via la protéine kinase θ (PKC- θ) et IKK/IκB), facteur clé responsable de la transcription de nombreux gènes impliqués dans la survie et la prolifération[86 87]. NF-κB est particulièrement important pour le développement NKT en plus de leur activation.

3-5. Activation directe *vs* indirecte

Nous avons vu que les glycolipides endogènes et exogènes sont tout deux reconnus par le TCR NKT. Bien qu'une interaction TCR/CD1d soit à l'origine considérée comme une

condition *sine qua non* de l'activation NKT, cette dernière ne repose pas toujours uniquement sur une stimulation TCR, mais également sur le contexte immunologique, plus précisément cytokinique. En effet, il est à présent bien connu que 2 principaux modes d'activation NKT existent (**Figure 5**) :

- **Directe** ou TCR-médiée. Engagée via un fort signal TCR, ce qui est principalement le cas avec les Ag glycolipidiques microbiens.
- **Indirecte**, ou cytokine-induite. Cette seconde voie est possible en absence d'Ag lipidique exogène. Ici l'activation des APC (par un agent infectieux ou autre) va permettre d'une part, la génération et le chargement de lipides endogènes, et d'autre part la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-18[88,89]). La présentation des lipides endogènes par le CD1d des APC aux NKT va entrainer un faible signal TCR qui sera complété par les signaux fournis par les récepteurs de cytokines, entrainant l'activation des NKT.

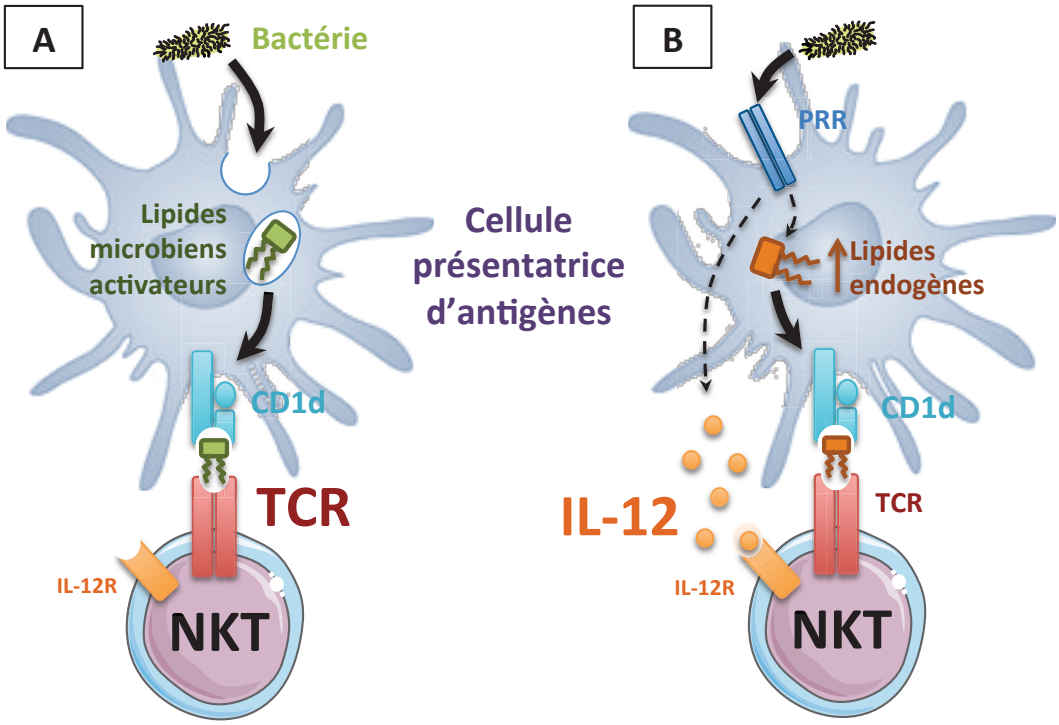


Figure 5 : Mécanismes d'activation NKT.
A) Activation directe, TCR-médiée : Les agents microbiens contenant des ligands NKT sont endocytés par les CPA, ce qui va permette la présentation de ces Ag directement au TCR NKT, conduisant à leur activation.
B) Activation indirecte, cytokine-médiée : Les agents microbiens ne contenant pas de tels ligands peuvent activer indirectement les NKT, par l'activation des CPA (via les PRR). Ces dernières produisent alors certaines cytokines inflammatoires (IL-12, IL-18), qui, associées à la présentation de lipides endogènes, va activer les NKT.
D'après Kaer et al., Front Immunol 2015

Le nombre de microorganismes identifiés comme possédants des glycolipides reconnus par les NKT étant assez restreint, il est apparu assez rapidement que la voie indirecte était d'une importance majeure dans les réponses NKT, ce qui fut montré par la suite dans de nombreux modèles d'infection[90,91]. C'est d'ailleurs une caractéristique importante de l'aspect « *innate-like* » des NKT : leur capacité à être activées en absence d'Ag pathogénique.

L'activation des APC est principalement permise par la reconnaissance des agents infectieux via les PRR, et en particulier les *Toll-Like Receptors* (TLR), qu'ils soient membranaires ou intracellulaires. La régulation de la présentation des antigènes endogènes dans un contexte infectieux a lieu grâce à un ensemble de processus transcriptionnels, métaboliques et de trafic intracellulaires chez les APC activées. Par exemple, l'activation des cellules dendritiques (DC) induit la surexpression de PPARγ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ*), un facteur de transcription lipide-dépendant pouvant être activé par les LDL. Cette activation engendre alors une forte présentation de CD1d à la surface des DC, orchestrant ainsi la présentation antigénique aux NKT[92,93]. Il a d'autre part été montré que l'infection par HBV induit une phospholipase particulière (sPLA2) dans les hépatocytes infectés, permettant ainsi la synthèse de lysophospholipides activateurs des NKT[94].

3-6. Mécanismes d'activation alternatifs

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* montrent que l'activation NKT, mesurée par leur capacité à produire de l'IFN-γ, peut dans certaines conditions se produire en absence de tout signal TCR[88,95,96].

De manière surprenante, il semblerait également que les NKT pré-activés soient capables d'exprimer des TLR (3, 5 et 9), ayant pour effet d'amplifier leur activation, leur production cytokinique ainsi que leur impact sur la maturation des DC[97]. Ce type d'observation n'a cependant jamais été mis en évidence dans des conditions non-inflammatoires.

Dans une moindre mesure, les NKT peuvent aussi être activées par l'expression de récepteurs à Fc de faible affinité (FcγRIII)[98], ou via leur récepteurs NK (NK1.1/CD161, NKG2D)[99].

4) Fonctions dans les réponses immunitaires

Selon le mode d'activation indirect que nous avons décrit plus haut, il est clair que les NKT n'ont pas pour seul rôle de répondre aux infections par les quelques bactéries décrites comme exprimant des glycolipides activateurs, mais ont bien d'autres fonctions immunitaires :

antivirales, antiparasitaires, antitumorales ou encore régulatrices. Grâce à leur phénotype effecteur « pré-activé » ($CD44^+$, $CD69^+$, $CD62L^-$), leur fonction principale est de produire rapidement (en l'espace de quelques heures après leur activation) de grandes quantités de cytokines variées, similaires aux réponses type T_H1 (IFN-γ, TNF), T_H2 (IL-4, IL-5, IL13) ou encore T_H17 (IL-17, IL-22). De part cette fonction effectrice, les NKT vont influencer le comportement du bras inné du système immunitaire, et favoriser l'initiation et la différentiation des réponses adaptatives, humorales comme cellulaires. Cette transactivation a donc un effet positif sur des cellules telles que les DC[100], les macrophages, les neutrophiles ou encore les cellules NK[101] et bien sûr les lymphocytes T et B. Pour agir si rapidement, les NKT expriment constitutivement de forts taux d'ARNm cytokiniques préformés[102]. A titre illustratif, le niveau de transcrits d'IFN-γ chez les iNKT est plus de 100 fois supérieur aux niveaux retrouvés dans des T conventionnels[103].

Cette caractéristique fait des NKT des cellules très intéressantes à cibler, en particulier en vaccinologie ou immunothérapies anti-tumorales. Bien que les iNKT ne représentent qu'une faible proportion des lymphocytes chez l'homme (environ 0,1% dans le sang), l'utilisation de ligands tel que l'αGC ou ses dérivés en guise d'adjuvants se révèle assez prometteuse pour booster des effets vaccinaux[104,105]. D'autres études ont pris parti des ligands NKT de faible affinité afin d'induire des réponses plutôt immunomodulatrices[106]. Le design de ce type de ligands NKT permet à présent d'orienter les réponses immunitaires vers le profil souhaité (T_H1 ou T_H2 par exemple) afin d'adapter leur utilisation clinique[107,108].
Contrairement aux observations faites après injection d'αGC, la plupart des infections microbiennes n'induisent généralement pas d'expansion NKT importante *in vivo*, même dans le cas de bactéries possédant des glycolipides capables d'activer les NKT. Ce comportement diffère complètement des processus d'expansion clonale observés chez les T conventionnels, illustrant la fonction unique des NKT dans le compartiment lymphocytaire T. Encore une fois, la plupart des études étant réalisées sur des modèles murins, il est parfois difficile d'évaluer l'implication des iNKT dans les pathologies infectieuses humaines. Nous illustrerons ici le rôle des NKT au travers de quelques exemples d'infections, mais nous ne décrirons pas leurs rôles dans les réponses anti-tumorales ou dans les maladies auto-immunues.

4-1. Réponses antibactériennes

Les premières bactéries identifiées comme possédant des ligands NKT appartiennent à la famille des *Sphingosomas*. Il s'agit de bactéries ubiquitaires, généralement non pathogènes, parfois impliquées dans des infections nosocomiales. Les glycoshingolipides de leur paroi sont semblables à l'αGC originellement isolé depuis une éponge marine, à tel point qu'il a été émis l'hypothèse que l'isolat initial d'αGC serait en réalité une contamination par des *Sphingosomas*. On imagine en effet assez difficilement l'intérêt évolutif pour les mammifères de la restriction de toute une population lymphocytaire pour un antigène d'origine marine, alors que cette reconnaissance prendrait tout son sens envers une bactérie ubiquitaire, potentiellement pathogène en absence de réponse immunitaire adaptée. Il a été montré que des souris *CD1d*$^{-/-}$ ou *Jα18*$^{-/-}$ sont plus susceptibles aux infections par *Sphingosomas*[109], mais également moins sensibles aux chocs sceptiques induit par de fortes charges infectieuses, montrant le fait que les NKT n'ont pas seulement des effets protecteurs, mais peuvent également participer à la pathogénie d'une infection par l'exacerbation des réponses immunitaires via une tempête cytokinique[110].

L'importance de la composante NKT a par la suite été découverte pour plusieurs pathogènes humains, la plupart exprimant des ligands NKT : *Streptococcus pneumoniae*[111,112], *Borrelia burgdorferi*[113,114], *Mycobacterium tuberculosis*[115], *Helicobacter pylori*[116], *Pseudomonas aeruginosa, Chlamydia*[117,118].

La plupart des études rapportant la découverte des glycolipides en question, ont été réalisées par des analyses biochimiques et structurelles, l'équipe de Mitchell Kronenberg ayant beaucoup contribué à ces avancées durant ces 2 dernières décennies.

4-1.a - *Borrelia burgdorferi*

Il s'agit là d'un des premiers pathogènes humains identifiés comme exprimant des glycolipides capables d'activer les NKT[114]. La première étude faite sur le rôle des NKT dans la maladie de Lyme montre la susceptibilité des souris *CD1d*$^{-/-}$ à l'infection par *Borrelia*, affichant des charges bactériennes tissulaires plus élevées ainsi qu'une arthrite augmentée comparée aux animaux WT[113]. Ces travaux pionniers ont été confirmés par la suite dans d'autres modèles murins[119,120] qui ont permis d'élucider en partie la dynamique de la réponse iNKT lors de l'infection. La détection des spirochètes circulantes par les cellules de Kupffer au niveau hépatique induit le recrutement des iNKT selon un mécanisme CXCR3-dépendant, suivit d'une présentation des glycolipides bactériens via CD1d[121] et enfin de l'activation

iNKT, se traduisant par une forte production d'IFN-γ. En revanche, il semblerait que les NKT présents au niveau des articulations soient également capables d'avoir des effets bactéricides directs via la sécrétion de granzymes. Cette surveillance péri-vasculaire limite la dissémination tissulaire des bactéries, notamment au niveau articulaire, lieu de persistance de Borrelia, où elle peut induire une arthrite prolongée, l'un des symptômes de la maladie de Lyme dite chronique. Chez l'homme, des iNKT au phénotype activé ($CD69^{hi}$) sont également retrouvés au niveau synovial[122] cependant dans des proportions bien plus faibles que chez la souris, expliquant peut être la susceptibilité de l'homme à développer la maladie. Les NKT sont d'ailleurs moins nombreux dans le liquide synovial de patients développant une arthrite liée à la borréliose que chez des patients sains. Cette diminution, au-delà de réduire la capacité bactéricide de la réponse immunitaire, participerait à la pathologie arthritique de par l'absence des propriétés immuno-modulatrices des NKT dans ce modèle[123].

4-1.b - *Streptococcus pneumoniae*

A l'instar de *Borrelia*, les souris *CD1d*$^{-/-}$ sont très susceptibles à l'infection par *S.pneumoniae (Spn)*, avec une charge bactérienne pulmonaire 1000 fois supérieure à celle mesurée dans des animaux WT et une mortalité presque 4 fois plus élevée[111,112]. Les lymphocytes iNKT se révèlent alors très importants dans les phases précoces de l'infection. En produisant IFN-γ et IL-17, ils favorisent le recrutement de neutrophiles et de monocytes au site d'infection. L'association d'antigènes capsulaires polysaccharidiques de *Spn* avec de l'αGalCer dans une perspective vaccinale donne d'ailleurs de bons effets protecteurs chez l'animal[124]. Cette bactérie, comme *Borrelia*, exprime des glycolipides capables d'activer les NKT[112].

4-2. Réponses antivirales

Bien que les lymphocytes NKT soient largement reconnus pour leur importance dans les réponses anti-bactériennes, il ne s'agit bien sûr pas de leur seule fonction. Un grand nombre d'infections virales font en effet intervenir la composante NKT, bien qu'à priori aucun virus ne possède de ligands lipidiques directs. Ainsi le rôle des NKT a été aussi bien montré pour des virus à ADN (Herpesvirus, HBV) que des virus à ARN (HIV, HCV, Influenza).

4-2.a - Herpesvirus

Dans la cas de l'Herpes Simplex 1 (HSV-1), il semblerait que les 2 types de NKT (invariant et divers) interviennent puisque les souris *CD1d*$^{-/-}$ et *Jα18*$^{-/-}$ ne présentent pas les même degrés

de susceptibilité à l'infection[125], avec cependant toutes les précautions qu'il convient de prendre concernant le modèle *Jα18*$^{-/-}$, chose que nous avons évoqué dans la partie sur les dNKT. De plus, le contrôle de l'infection par d'autres Herpesvirus étudiés dans ce cadre (HSV-2, MCMV) semble uniquement dépendre des NKT invariants[126,127]. Ce contrôle semble ici CD1d-indépendant, l'activation iNKT (sécrétion d'IFN-γ) étant principalement induite par l'IL-12 sécrétée par les DC activées par TLR9[127,128]. Chez l'homme, des dysfonctions iNKT ont également été liées à une susceptibilité aux infections herpétiques par EBV ou VZV[129-131]. Pour échapper à ce contrôle, les Herpesvirus sont des spécialistes dans l'inhibition de l'expression de CD1d à la surface des cellules infectées[132,133] ou l'altération de la présentation de lipides activateurs endogènes[134]. Un grand nombre de virus ont adopté ces mécanismes d'évasion : HIV[135], VV et VSV[136], HPV[137]… (**Figure 6**)

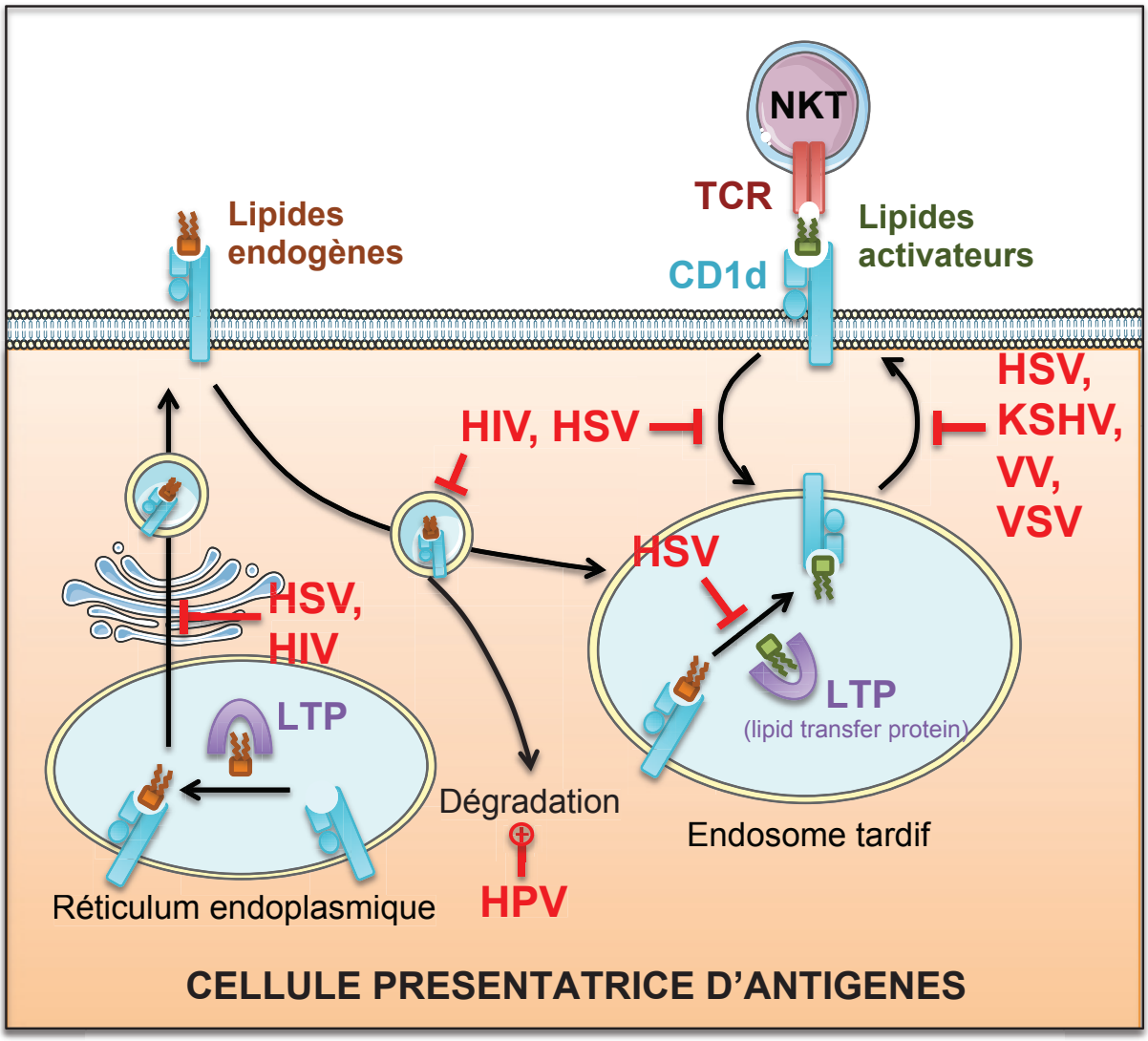


Figure 6 : Voies de trafic et de chargement lipidique des molécules de CD1d, montrant les mécanismes d'inhibition d'activation des NKT par certains virus.
D'après Kaer et al.,Nat Immunol 2006

4-2.b - HIV

Le rôle des NKT lors de l'infection HIV est à ce jour peu connu. Il est cependant intéressant de remarquer que la fraction iNKT-CD4$^+$ est très permissive au virus[138], et se retrouve donc déplétée avec les lymphocytes T CD4 conventionnels[139]. Sans que l'on sache réellement l'effet de cette déplétion sur le système immunitaire, elle doit sans aucun doute avoir impact sur l'évolution de la maladie. Un article évoque que la perte préférentielle des iNKT CD4$^+$ dans l'intestin perturberait la balance iNKT DN/CD4$^+$ (pro-inflammatoire/anti-inflammatoire) en faveur donc d'un environnement inflammatoire participant à l'épuisement du système immunitaire et l'évolution vers le stade SIDA[140].

4-3. Réponses antiparasitaires et antifongiques

Les infections parasitaires et fungiques sont également concernées par les réponses NKT. De manière non exhaustive : *Plasmodium*, où les NKT limitent la dissémination extra-hépatique, *Toxoplasma gondii*, où les NKT ont un effet délétère sur la physiopathologie par une production trop élevée d'IFN-γ[141], *Leishmania*, exprimant un glycosphingophospholipide capable d'activer les NKT[142], tout comme *Cryptococcus neoformans*[143] et *Aspergillus fumigatus*[144]. A l'exception de ces derniers, la plupart de ces parasites ne sont pas connus pour exprimer des ligands NKT et doivent donc les activer de manière indirecte.

4-4. NKT et microbiote

Il existe une relation mutuelle entre le microbiote et les NKT. Comme c'est le cas pour beaucoup de leucocytes, l'exposition bactérienne après la naissance va être un événement clé dans l'éducation des NKT. Les NKT générés dans des souris axéniques (*Germ-free*), et donc dépourvues de toutes flore, sont certes plus nombreux dans les muqueuses intestinales et pulmonaires[145], mais présentent des phénotypes immatures et hypo-répondeurs face à leurs ligands[146]. Privées du caractère immuno-modulateur des NKT, ces souris sont en conséquence plus sujettes aux maladies inflammatoires de l'intestin et à l'asthme. La réciprocité de ces effets microbiote/NKT fut montrée par l'observation d'un microbiote altéré dans les souris *CD1d*$^{-/-}$, favorisant l'inflammation intestinale[147]. Contrairement aux iNKT, le rôle précis des dNKT n'a encore jamais été clairement étudié.

Ces observations vont dans le sens de la théorie hygiéniste, selon laquelle l'exposition précoce dans la vie à certaines bactéries commensales aurait un effet protecteur contre le développement de certaines maladies inflammatoires ou auto-immunes.

Les mécanismes par lesquels le microbiote intestinal en particulier va modeler les cellules NKT sont encore assez peu connus. Néanmoins, une bactérie bien précise semble avoir un rôle clé. Parmi la famille des *Bacteroïdes*, commensaux représentant environ 50% de la flore intestinale, *Bacteroïdes fragilis* se démarque par l'expression de sphingolipides, dont l'αGC[148], qui seront rapidement identifiés comme ayant des propriétés immuno-mudulatrices[149], ouvrant potentiellement la voie pour l'utilisation de ce sphingolipide particulier dans le traitement de certaines maladies auto-immunes.

II – Les lymphocytes T Gamma-Delta

Parmi les lymphocytes T non conventionnels, les premiers identifiés furent les T gamma-delta (Tγδ). Il s'agit là aussi d'une famille assez hétérogène, aux fonctions variées. Contrairement aux lymphocytes T conventionnels, leur TCR est un hétérodimère composé d'une chaine gamma (γ) et d'une chaine delta (δ), et tout comme les iNKT, ils expriment un répertoire TCR très restreint. Moins fréquents que les T conventionnels dans le sang et les organes lymphoïdes, ces cellules peuvent être prédominantes dans certaines muqueuses (peau, intestin et tractus génital). Leur TCR leur confère des capacités de reconnaissance bien particulières puisqu'ils ne nécessitent pas de prise en charge et de présentation antigénique par les molécules de CMH pour être activés, ce qui leur permet d'enclencher leurs réponses très rapidement face aux Ags rencontrés. Les Ags reconnus par ces cellules sont de natures diverses et non peptidiques, les lipides étant pour l'instant les ligands les plus étudiés. Contrairement aux NKT cependant, ils sont facilement identifiables chez l'homme par marquage du TCR γδ en cytométrie. Malgré cela et le fait que leur découverte date d'il y a plus de 30 ans, de nombreux aspects de leur biologie restent très mal caractérisés.

1) Les sous-types

Il existe une forte hétérogénéité fonctionnelle au sein du compartiment lymphocytaire Tγδ, se traduisant par des différences de composition du TCR, de localisation, de production cytokinique… La plupart des précurseurs γδ acquiert des capacités effectrices avant de migrer hors du thymus, mais ils gardent tout de même une certaine plasticité en périphérie, relative

selon les sous-types[150,151]. Bien que cela soit très probable, il n'est pas vraiment clair si la différenciation vers tel ou tel sous type est lié à l'usage de telle ou telle chaine γ ou δ du TCR. La classification la plus utilisée pour le moment, se basant principalement sur l'expression Vγ, est néanmoins relativement bien reconnue et pratique. Dans une certaine mesure, il existe des similitudes phénotypiques avec les sous-types de T *helper*, de par l'expression de facteurs de transcription (RORγT, T-bet…) et la sécrétion de cytokines associées (IL-17, IFN-γ…), tout comme pour les NKT.

Tableau 2 : Fonctions effectrices et rôles des différents sous-types de Tγδ murins en fonction de leur usage Vγ et Vδ.. On été ajoutés les principaux sous-types selon la dénomination décrite précédemment.
Extrait de Bonneville *et al*., Nature Reviews Immunology, 2010

γδ T cell subset		Location	Effector functions (programmed in the thymus or inducible in the periphery)	Role in disease or injury
Vγ	Vδ			
Vγ1 **NKT-like γδ**	ND	Lymphoid tissue	Programmed: TNF and IFNγ	Resolves lung inflammation
			Inducible: T_H2-type cytokines and IL-17	Inhibits virus-induced myocarditis
				Promotes non-specific AHR
				Inhibits T_{Reg} cell development
				Promotes CGD
	Vδ5	Thymus and spleen	Programmed: cytokines are unknown but IL-4 and IL-13 are not produced	Promotes AHR
				Promotes IgE responses
	Vδ6.3 and Vδ6.4	Thymus, spleen and liver	Programmed: IFNγ, IL-4, IL-13 and cytotoxicity	iNKT cell-like properties
				Kills macrophages *in vitro*
Vγ4 **γδ17**	ND	Lymphoid tissue and lung	Programmed: IL-17	Promotes viral myocarditis and kills virus-infected myocytes
			Inducible: TNF, IFNγ and cytotoxicity	Promotes virus-induced lung inflammation
				Promotes virus-induced encephalitis
				Inhibits subcutaneous melanoma
				Inhibits AHR
				Promotes innate bacterial clearance
	Selected Vδ4	Lymph node	Inducible: IL-17	Exacerbates CIA
	Vδ5	Spleen	Inducible: IFNγ-dependent development	Suppresses IgE responses
Vγ5 **DETC**	Vδ1 invariant	Epidermis	Programmed: IL-22, IFNγ, TNF, KGF1, IGF1, CCL5, defensins, MIP1, XCL1 and cytotoxicity	Promotes tissue repair and wound healing
				Protects against skin carcinogenesis
				Suppresses GVHD
	Vδ4 and others	Mammary gland	ND	Tissue remodelling (lactating mammary gland)?
Vγ6 **γδ17**	Vδ1 invariant	Tongue, uterus, placenta, testes, lung and kidney	Programmed: IL-17, IL-22, IFNγ, TGFβ and cytotoxicity	Tissue remodelling (placenta)?
				Inhibits nephritis
				Prevents lung fibrosis
				Promotes innate bacterial clearance
Vγ7 **iEL**	Vδ4 and others	Intestinal mucosa	Programmed: TNF, IFNγ, KGF1 and cytotoxicity	Protects intestinal barrier function
				Promotes epithelial cell turnover
				Prevents colitis

Selon un modèle proposé par Prinz *et al*.[152], cinq principaux sous types ont été définis chez la souris. Ces sous-types se développent par vagues successives lors du développement, selon

l'usage de leur chaine γ, principalement dans l'ordre suivant : DETC (*Dendritic Epidermal γδ T-Cells*), γδ17, γδNKT-like, iEL (*intra-Epithelial Lymphocytes*) puis principalement des γδ naïfs « non-engagés » après la naissance, chaque sous-type allant coloniser des tissus différents. Cette classification ne se superpose cependant pas complètement avec la classification basée sur l'usage Vγ. Ceci laisse à penser que l'instruction des Tγδ ne dépend pas uniquement du Vγ exprimé et est sans doute plus complexe et encore en partie énigmatique. Il n'est pas non plus certain que l'usage d'un TCR particulier soit responsable de la migration tissulaire restreinte de chaque sous-type. Les rôles et les localisations des sous-types γδ sont résumés dans le tableau 2, extrait de la revue de Bonneville *et al.*[150].

La plupart de ces données ne sont pas extrapolables à l'homme, chez qui 2 principaux sous-types γδ ont été décrits : les T-Vδ1, retrouvés au niveau épithélial (intestin, peau…), semblant correspondre aux iEL murins[153], et les Vδ2, qui sont retrouvés dans de sang, possédant une forte hétérogénéité.

2) Développement

Les Tγδ sont les premiers lymphocytes T produits par le système immunitaire lors du développement embryonnaire, quelle que soit l'espèce. Il existe de nombreuses différences dans la biologie du développement γδ selon les sous-types. Le développement et la colonisation tissulaire par les DETC et les Tγδ17 par exemple ont lieu principalement durant les périodes précoces de la vie à partir de progéniteurs fœtaux à la suite de quoi ils s'auto-renouvellent dans les tissus périphériques, ce qui fut prouvé dans le derme, mais reste à démontrer dans les autres organes[154]. Le développement des Tγδ se fait selon un mécanisme sous contrôle majeur de l'IL-7[155]. Il semblerait que la décision d'orientation vers la lignée γδ ou αβ soit le premier élément de différenciation des précurseurs T. Les Tγδ émergent des mêmes précurseurs DN que les Tαβ[156]. La bifurcation vers l'une ou l'autre lignée reste le sujet d'investigations intenses. Selon un premier modèles, les précurseurs DN communs réarrangent tout d'abords 3 chaines du TCR : β, γ et δ. Dans le cas où le réarrangement β est productif, le précurseur exprime alors une chaine pré-α, prolifère et subit la β-sélection. Il devient DP CD4/CD8, et *down*-régule la chaine γ pour initier le réarrangement α, réarrangement qui va alors exciser les gènes de la chaine δ[156] et ainsi continuer sa différenciation vers la voie Tαβ. A l'inverse, si le premier réarrangement (β/γ/δ) donne un

TCR γδ productif, la différenciation va s'orienter vers la lignée γδ sans réarrangements supplémentaires. Certains travaux suggèrent un rôle de Sox13, un facteur de transcription clé du développement γδ[157]. Les thymocytes DP ayants divergés vers la voie αβ peuvent soutenir la différenciation γδ par un mécanisme appelé trans-conditionnement, principalement via la lymphotoxine[158-160].

Le rôle précis du signal TCR γδ dans cette différenciation n'est pas encore clair. Il est suggéré dans la littérature que certains précurseurs DN soient pré-engagés à devenir Tγδ, notamment via l'expression de Sox13 et de CD127 (IL-7R), et que le TCR n'intervient pas dans cette différenciation[161]. D'autres études semblent montrer qu'un signal TCR fort, en coopération avec un signal Notch, favoriserait la différenciation vers la voie Tγδ[162,163], ce qui fut renforcé par des expériences *in vitro*[164]. Deux modèles coexistent donc (pré-engagement *vs* instruction TCR-dépendante) sans pouvoir trancher en faveur de l'un ou de l'autre. Dans un cas comme dans l'autre, les ligands impliqués dans la sélection thymique ne sont pas connus.

De nombreux sous types vont se différencier au niveau thymique avant de migrer dans leurs organes périphériques respectifs. Par exemple, l'engagement thymique vers la voie DETC dépend fortement de l'engagement des précurseurs $V\gamma5^{+}V\delta1^{+}$ avec la molécule Skint-1 exprimée par les cellules épithéliales thymiques (engendrant une surexpression d'Egr3, réprimant Sox13 et RORγT, orientant les DETC vers un profil pro-IFN-γ)[165-167], mais toutes les tentatives de démonstration d'une interaction TCR/Skint-1 ont pour l'instant échouées, et le ligand de Skint-1 reste inconnu.

3) Ligands et restriction

Cet aspect de la biologie T-γδ est clairement le plus flou. Les Tγδ ne possèdent en effet pas de restriction aux CMH classiques, compliquant fortement l'identification de leurs ligands. Cette absence de restriction rappelle un type de reconnaissance semblable au BCR[168]. Etonnamment, de par la quantité de fragment de gène D inclus dans la chaine δ, le TCRγδ possède théoriquement une plus grande diversité que le TCRαβ[169,170], alors que leur reconnaissance antigénique semble très large et peu spécifique.

De nombreuses interactions avec des molécules CMH non classiques ont été décrites chez l'homme et la souris : T10/T22, I-$E^{k,b,s}$, MICA/B, le récepteur à protéine C endothéliale et

CD1. La plupart des ligands identifiés sont des molécules du soi, ou induites par le stress et le premier ligand identifié fût CD1c[171].

L'interaction la mieux caractérisée est finalement celles des Vδ1 (ainsi que des Vδ3[172]) avec CD1d[173], la même molécule de restriction CMH-*like* utilisée par les NKT. C'est d'ailleurs la seule molécule de restriction γδ identifiée étant commune à l'homme et la souris, suggérant un rôle important et conservé dans l'évolution. L'utilisation de tetramères-CD1d chargés en sulfatide (ligand dNKT) a permis de montrer que 80% des T marqués par ces tétramères sont des T-Vδ1[174]. Des études structurales ont permis de montrer une interaction TCR/sulfatide/CD1d similaire aux dNKT[175,176]. Ainsi, contrairement à la souris, les Vδ1 représentent la plus grande population réactive aux lipides chez l'homme, où ils sembleraient combler la faible proportion de NKT. Au delà du sulfatide, de l'αGC dans une moindre mesure (reconnu par des T hybrides αβ/δ1[177]), ou de lipides issus de pollens [173,178], peu de ligands γδ présentés par CD1d ont été décrits.

Les lymphocytes T-Vγ9Vδ2, qui représentent jusqu'à 10% des T circulants chez l'homme, sont eux connus pour reconnaître des phosphoantigènes (pAg)[179,180]. L'activation des T-Vγ9Vδ2 par les pAg implique BTN3A, un membre de la famille des butyrophilines exprimé par les APC autrement appelé CD277, via des mécanismes qui ne sont pas encore tout à fait élucidés[181,182]. En effet 2 modèles d'activation via BTN3A ont émergés : BTN3A jouerait directement un rôle de présentation des pAg au TCR[182], ou bien sa partie intracellulaire serait capable de détecter les pAg, entrainant un changement de conformation en surface des APC, responsable de l'activation T[183].

D'autres ligands ont été identifiés : l'annexine 2, induite par différents stress cellulaires, active les T Vγ8Vδ3[184], des pAg de *Mycobacterium tuberculosis* activant les Vδ1$^+$ via CD1c[26]…

4) Fonctions immunitaires

Lors de leur activation, la plupart du temps induite par des facteurs de stress, ces lymphocytes non conventionnels interviennent à différents niveaux de la réponse immunitaire : activité cytotoxique directe, activation d'autres acteurs de l'immunité par la sécrétion de cytokines, mais également réparation des tissus lésés. De plus, leur activation non restreinte par les molécules de CMH (via activation TCR CMH-indépendante, récepteurs NK ou directement

via les cytokines) associée à leur *pre-programming* leur permet d'exercer rapidement et pleinement leur activité pléiotropique.

4-1. Les sentinelles des épithéliums

De par leurs localisations et leurs mécanismes d'activation, les lymphocytes Tγδ jouent un rôle crucial dans l'initiation des réponses immunitaires au niveau des barrières épithéliales. De manière surprenante, ils sont d'ailleurs capables d'agir comme des cellules présentatrices d'Ag[185].

Au niveau de la peau (epiderme), les DETC murines présentent une morphologie similaire aux cellules dendritiques leur permettant d'exercer efficacement leurs fonctions de sentinelles. Bien que leurs ligands ne soient encore une fois pas identifiés, certaines études (utilisant notamment des tétramères de TCR-DETC) montrent la reconnaissance d'auto-Ag exprimés par les kératinocytes endommagés[186-188]. Associée à d'autres signaux de co-stimulation (CD100, JAML[189,190]), leur activation induit une sécrétion rapide de cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ), de chimiokines et de facteurs de croissances, favorisant le recrutement d'autres leucocytes et la mise en place d'une réponse efficace, mais également la cicatrisation en cas de rupture de l'épiderme[191,192].

Les Tγδ représentent environ 50% des cellules T de l'intestin grêle, où ils sont généralement appelés IEL, pour *intra-epithelial lymphocytes*. Malgré leur importance numéraire massive, leurs fonctions ne sont pas encore tout à fait élucidées, peut-être de par la présence de différentes populations, aux fonctions diverses voire antagonistes. Contrairement aux DETC, les IEL patrouilleraient à travers l'épithélium et la lamina propria, migration réduite en présence de cytokines pro-inflammatoire telles que le TNF-α, sans doute dans un but de concentrer les Tγδ au site d'infection ou de lésion[193]. Eux aussi jouent un rôle important dans la réparation des épithéliums lésés, notamment par la sécrétion de KGF-1 (Keratinocytes Growth Factor-1) mais également dans le maintient de la barrière épithéliale à l'homéostasie : prolifération épithéliale[194], modulation de la sécrétion de mucines par les cellules caliciformes[195].

L'épithélium pulmonaire murin semble être successivement colonisé par différentes populations de Tγδ au cours de la période prénatale, pour au final être principalement composé de lymphocytes producteurs d'IL-17 ($V\gamma4^+$ et/ou Vγ6Vδ1)[196,197]. Représentant environ 10% des cellules T pulmonaires, ils ont principalement des fonctions modulatrices, notamment des réponses allergiques associées à une réponse T_H2[198]. En cas de traumatisme,

ils prolifèrent et modulent l'infiltration Tαβ et des MDSC (Myeloïd-Derived Suppressor Cells)[199]. Les lymphocytes Tγδ ont également un rôle anti-tumoral important, en particulier les Tγδ humains pulmonaires producteurs d'IL-17, intervenant notamment via la production de TRAIL par ces cellules activées via NKG2D, mais certaines études récentes tendent à montrer que les Tγδ peuvent également avoir des fonctions pro-tumorales[200]. Certains décrivent une certaines dualité entre Tγδ producteurs d'IL-17 et d'IFNγ, respectivement pro et anti-tumoral. Leur fonctionnalité paraît également dépendre fortement du microbiote local[201,202].

Jusqu'à récemment, assez peu d'études s'étaient penché sur le rôle des Tγδ au niveau du tractus génital. Une étude princeps assez exhaustive chez la souris montre leur présence dans l'utérus, le vagin, voire même dans l'ovaire et l'épididyme, mais pas dans le testicule[203]. En lien avec ce qui a été dit plus haut, les infections vaginales bactériennes, et donc un déséquilibre de flore, affectent négativement la fonctionnalité des Vδ1$^+$ provoquant un susceptibilité à l'infection par le HIV chez la femme[204]. Les Vδ1$^+$ sont également retrouvé en grande quantité dans le sperme d'individus sains, sans qu'aucune étude n'ait cherché à explorer leur fonction[205].

4-2. Fonctions cytotoxiques

Après activation via le TCR ou des récepteurs NK (NKG2D), les Tγδ humains exercent principalement leurs fonctions cytotoxiques par la sécrétion de facteurs solubles tels que des perforines, granzymes ou encore de la granulysine (une protéine anti-microbienne)[206-209], mais également par l'expression de TRAIL et de CD95L, deux ligands engageant différents récepteurs de mort à la surface des cellules cibles[208,210]. De plus les Tγδ sont capables d'éliminer leurs cellules cible par ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps)[211].

4-3. Réponses antimicrobiennes

Les T Vδ2$^+$ humains sont capables de reconnaître des phosphoantigènes, des molécules produites par un grand nombre d'agents infectieux : bactéries, fungi, parasites. Leur fréquence dans le sang périphérique se trouve ainsi augmentée dans plusieurs cas d'infections bactériennes telles que la listériose, la tuberculose, la salmonellose, la tularémie, la légionellose ou la brucellose[212]. Plusieurs modèles murins de déplétion des γδ ont montré leur importance dans le contrôle de l'infection[213]. Dans le cadre d'infections bactériennes intracellulaires, comme la tuberculose par exemple, *Mycobacterium tuberculosis* induit

l'activation des T-Vδ2$^+$ via la production de métabolites activateurs au sein des cellules infectées et inhibent la croissance bactérienne par la sécrétion de granzyme A et de TNF-α [214-216]. A travers la sécrétion notamment d'IL-17 mais aussi d'IFN-γ, ils participent également à la protection des voies respiratoires, initient la mise en place de la réponse adaptative. Dans le cas de la tuberculose par exemple ils sont également essentiels à la formation du granulome, et donc au confinement de l'infection.

En dépit de la production de ligands spécifiques, les lymphocytes Tγδ sont également très importants dans le contrôle de certaines infections virales. Dans le cadre de l'infection par le cytomégalovirus (CMV) chez l'homme, une expansion clonale de T-Vδ2$^-$ est observable[217-219]. Ces lymphocytes reconnaissent les cellules infectées directement via leur TCR, se liant directement à des molécules de stress[220]. Grâce à l'expression de récepteur au Fc (CD16), ils peuvent également capter des particules virale opsonisées et donc être activés de manière TCR-indépendante[211]. De par le caractère inné de la réponse γδ, et donc non Ag-restreinte, il est surprenant de constater la clonalité de leur expansion. Les T-Vδ1$^+$ sont eux amplifiés dans plusieurs infections virales telle que le l'hépatite C, où ils infiltrent le foie, induisent des réponses type T_H1 (sécrétion d'IFN-γ) et participent ainsi à l'inflammation hépatique[221]. Fait remarquable, alors que la fréquence des Vδ1$^+$ est augmentée en réponse à l'infection par le HIV[222], ils sont capables (avec les Vδ2$^+$) de limiter la dissémination virale par la sécrétion massive de CCL4 et CCL5, ligands respectifs de CCR4 et CCR5, les co-récepteurs d'entrée du virus, qui se retrouvent alors saturés [223,224]. L'identification précise des ligands responsables de l'activation des lymphocytes Tγδ lors des infections virales offrirait la possibilité de développement de nouvelles molécules thérapeutiques boostant leurs réponses.

En conclusion, grâce a leur reconnaissance antigénique pléiotrope, leur sécrétion rapide de cytokines, de chimiokines et autres facteurs de croissance, ou encore leur faculté d'APC, les Tγδ permettent l'initiation et la modulation d'un ensemble large de mécanismes immunitaires : maturation des lymphocytes B, des Tαβ et des cellules dendritiques, réparation des épithéliums, lyse des cellules infectées ou cancéreuses…

III – Les Mucosal Associated Invariant T-cells (MAIT)

Dernière population de T non-conventionnels que nous aborderons dans ce chapitre sont les *Mucosal Associated Invariant T-cells*, ou MAIT. Avant que ce terme de MAIT leur soit attribué, l'équipe d'Olivier Lantz avait mis en évidence l'existence d'une population T exprimant un TCR invariant[225] : Vα7.2-Jα33 chez l'homme, et son homologue Vα19-Jα33 chez la souris. Dès lors il avait été montré que ces cellules n'étaient pas restreintes par les molécules de CMH classiques (comme tous les lymphocytes T non conventionnels finalement) puisque présents dans les souris CMH-I-KO, CMH-II-KO, mais absentes dans les β2-microglobuline-KO, montrant une restriction unique à une molécule CMH-I-*like* encore non identifiée. Ces lymphocytes T ont été nommés MAIT en 2003 suite à la découverte de leur abondance dans la lamina propria intestinale[226]. Cette même étude a également démontré que les MAIT sont restreints par MR1[227], une molécule qui avait été décrite plusieurs années auparavant sans que sa fonction ne soit connue[228,229], et que ces cellules sont absentes dans des souris axéniques, suggérant un rôle important dans les réponses anti-bactériennes. Il aura fallu presque une décennie pour identifier les Ags reconnus par les MAIT : ils ne reconnaissent pas des antigènes peptidiques ou lipidiques, mais des métabolites de vitamines B, comme la riboflavine ou les folates[230,231]. Comme pour les NKT une vingtaine d'années auparavant, la mise au point de tétramères reconnaissant spécifiquement les MAIT, ici des tétramères de MR1, a permis de nombreuses découvertes sur ces cellules[232]. MR1 est une molécule dont la séquence est très conservée chez l'ensemble des vertébrés, laissant supposer que l'axe MR1/MAIT joue un rôle ancestral et primordial dans l'immunité.

1) Généralités

1-1. Distribution *in vivo*

Les MAIT représentent la population de T non conventionnels la plus abondante chez l'homme, mais assez rare chez la souris. En dépit de leur nom, c'est dans le foie qu'ils sont le plus abondant, où ils représentent chez l'homme de 20 à 45% des lymphocytes hépatiques totaux, soit plus de 50% des cellules T[233], ce qui rappelle les iNKT chez la souris. Ils représentent 2 à 10% des lymphocytes de la lamina propria. En accord avec cette répartition les MAIT expriment CCR6 et CXCR6, des marqueurs de domiciliation propres au foie et à

l'intestin. Ils représentent également chez l'adulte environ 10% des T circulants, jusqu'à 2% des lymphocytes ganglionnaires et 2 à 7% de ceux de la peau. Voyant une telle abondance, il est surprenant que les MAIT aient été découverts si tardivement.

1-2. Caractéristiques phénotypiques

Tout comme les NKT, les MAIT possèdent un phénotype effecteur mémoire : $CD45RO^+$, $CCR7^-$, $CD62L^-$, $CD27^+$, et $CD28^+$, phénotype acquis après la naissance, puisque les MAIT fœtaux ou extraits de sang de cordon ont un phénotype encore plus ou moins naïfs selon leur localisation[234]. Ils expriment principalement un profil mixte T_H1/T_H17 (sécrétion d'IFN-γ et d'IL-17).

Au delà de leur TCR semi-invariant (chaine α invariante associée à un set limité de chaines β), les MAIT peuvent être identifiés par un ensemble d'autres marqueurs phénotypiques. A l'origine pensés comme étant $CD4^-CD8^-$, ces lymphocytes se sont révélés être principalement $CD8\alpha\alpha^+$ (rarement $CD8\alpha\beta^+$) chez l'homme et la souris, comme les IEL, bien que le rôle du CD8 ne soit là pas encore connu. Il existe une différence importante au niveau de l'expression de CD4 selon l'espèce, puisque les MAIT $CD4^+$ représentent 40-50% des MAIT totaux chez la souris, et seulement 2-10% chez l'homme[232]. Un marqueur couramment utilisé pour identifier les MAIT est CD161 (également exprimé plus faiblement par la majorité des NK et une partie des Tγδ). Cependant, à l'instar de NK1.1 chez les NKT murins, CD161 peut être perdu chez les MAIT lors de leur activation[235], mais son rôle fonctionnel demeure inconnu. Les MAIT sont également les cellules qui expriment le plus haut niveau de la chaine α du récepteur à l'IL-18 (IL-18Rα) et sont donc activées par l'IL-18 même en absence de stimulation du TCR, un mécanisme d'activation partagé avec les autres cellules $CD161^+$ [236]. Autre caractéristique intrigante : les MAIT expriment fortement ABCB1, un transporteur membranaire de multi-résistance aux xénobiotiques, conférant alors une résistance accrue à différentes chimiothérapies. Il pourrait s'agir d'un mécanisme leur permettant de résister aux molécules xénobiotiques retrouvées en grand nombre au niveau du foie et de l'intestin, apportées par les bactéries intestinales et l'alimentation[233]. Cela fait des MAIT des cellules particulièrement bien adaptées à leur environnement et à leurs fonctions anti-bactériennes.

Jusqu'à il y a peu, il ne semblait pas y avoir d'hétérogénéité majeure ou de sous-types observés chez les MAIT. Cependant, une étude immunoprotéomique très récente a permis de définir une sous-population de MAIT exprimant un ensemble particulier de marqueurs de type NK (notamment CD56, CD84, CD94) et des niveaux plus élevés de PLZF, Eomes et T-bet[237].

Cette sous-population est capable de produire plus d'IFN-γ en réponse à une stimulation IL-12/IL-18. Le répertoire TCR-Vβ semble lui aussi impacter la fonctionnalité MAIT, ce qui sera plus développé dans la partie 2 sur la présentation antigénique.

1-3. Développement

Bien qu'ayant lieu dans le thymus, le développement des cellules MAIT diffère de celui des T conventionnels et présente quelques similitudes avec celui des NKT. Leur sélection chez la souris se fait par MR1 exprimé à la surface des thymocytes DP[238]. A l'inverse des NKT, ils ne dépendent pas de signal SAP et n'expriment PLZF qu'à un stade tardif de différenciation, lors de leur sortie du thymus[239,240].

Une étude récente chez la souris et l'homme propose un modèle de développement en 3 étapes basé sur l'expression de quelques marqueurs phénotypiques : stade 1 ($CD24^{+}CD44^{-}$), correspondant à des MAIT immatures DP, le stade 2 ($CD24^{-}CD44^{-}$) et le stade 3 ($CD24^{-}CD44^{+}$) ressemblant déjà au phénotype MAIT mature retrouvé en périphérie, mais étant cependant CD8αβ, suggérant l'intervention d'autres mécanismes de maturation en périphérie afin d'acquérir le CD8αα. Les MAIT ne semblent alors acquérir leurs fonctions effectrices qu'après le stade 2 via l'expression de facteurs de transcription déjà évoqués (PLZF, T-bet, RORγT), mais ne sont finalement pleinement fonctionnelles qu'en périphérie, après le stade 3[240].

La diminution de MAIT dans les souris axéniques est une observation déjà assez ancienne[226]. En réalité ces souris présentes des fréquences plus élevées de MAIT immatures. Le mécanisme impliqué n'est pas encore tout à fait compris, mais il semblerait être dépendant de l'IL-18[240]. Le développement terminal des MAIT ainsi que leur migration intestinale semblent dépendre des lymphocytes B, sans doute via leur fonction présentatrice d'Ag[226,241].

2) Présentation antigénique

2-1. Les ligands MAIT

Les lymphocytes MAIT reconnaissent des métabolites des vitamines B. L'identification de ces Ags commença par l'observation que les Ags activateurs de MAIT sont résistants au traitement à la protéase et ne sont pas co-purifié avec les lipides, révélant une nature d'Ag toute autre[242]. Les premiers ligands identifiés furent le 6-formyl-pterin (6-FP), un métabolite

des acides foliques (vit B9), puis plusieurs métabolites de la riboflavine (vit B12) tels que le 5-OP-RU (5-(2-oxopropylideneamino)-6-d-ribitylaminouracil). Cependant le 6-FP n'est pas capable d'activer les MAIT. Il fut également montré que tous les micro-organismes capables d'activer les MAIT possèdent une voie de biosynthèse de la riboflavine fonctionnelle. Cependant la nature ubiquitaires de ces molécules (synthétisées par certains commensaux) et leur capacité à diffuser librement à travers les épithéliums soulève la question de la régulation de l'activation MAIT. Bien que l'usage d'analogues activateurs ou inhibiteurs de ces métabolites puisse paraître séduisant d'un point de vue thérapeutique[243], aucune étude ne s'est encore penchée sur la question.

2-2. Mécanismes de présentation par MR1

Le TCR des MAIT possède une structure particulière lui permettant la reconnaissance des métabolites présentés via MR1. Les études cristallographiques semblent monter une structure relativement rigide des boucles de CDR, par opposition à la flexibilité observée dans un TCR conventionnel[244], suggérant un TCR « prédisposé » à interagir avec MR1 qui, rappelons-le, est non-polymorphique[245]. Bien que l'interaction clé du TCR MAIT avec son ligand ne se fasse qu'au niveau d'un résidu précis de la boucle CDR3α (Y95), la chaine β complémente cette interaction et influence son affinité[246,247].

A l'instar de CD1d, MR1 possède 2 poches : A' et F'. La poche A' permet d'accueillir des résidus aromatiques et polaires des Ags, positionnant la queue ribityl (dans le cas d'un métabolite de la riboflavine) vers le site de reconnaissance du TCR MAIT. Certains résidus de cette poche A' forment des liaisons covalentes avec l'Ag, permettant leur séquestration et stabilisation[230]. En revanche, le rôle structurel et fonctionnel de la poche F' n'est à ce jour pas connu.

2-3. Trafic intracellulaire de MR1

Le trafic intracellulaire de MR1 diffère des autres molécules CMH conventionnelles. En absence de ligand, la plupart des molécules de MR1 restent séquestrées dans le réticulum endoplasmique. Une fois en présence de son ligand, MR1 s'associe à β2m et est exporté à la surface cellulaire via le golgi. Après présentation, MR1 est rapidement internalisé et dégradé, bien qu'une faible proportion puisse être recyclée à la surface[248,249]. Les mécanismes impliqués dans la prise en charge des Ags et de leur fixation dans MR1 sont encore inconnus, bien que

l'on sache qu'ils sont indépendants de TAP (*Transporter Associated with Ag Processing*) et du protéasome[249].

3) Fonctions immunitaires

Tout comme les NKT, les MAIT possèdent des caractéristiques *innate-like*. Lors de leur activation, ils sont capables de produire rapidement différentes molécules : cytokines (IFN-γ, IL-17, TNF-α), perforines/granzymes et granulysine. Cependant certaines études suggèrent que les MAIT en périphérie sont moins répondeurs aux stimulations via leur TCR (production réduite d'IFN-γ, prolifération réduite), mais plus aux autres signaux cytokiniques (IL-12, IL-18)[239], un mécanisme finalement assez proche de l'activation NKT indirecte. Après stimulation, les MAIT produisent de fortes quantités de cytokines (pro-inflammatoires principalement), augmentent l'expression de CD25, CD69, et expriment le marqueur de dégranulation CD107a.

Bien que la fréquence des MAIT circulants chez l'homme soit altérée dans de nombreuses maladies infectieuses[250,251], dans la plupart des cas il n'est pas encore clair quels rôles précis jouent cette population lymphocytaire, ni a quoi est due cette déplétion (migration, activation, exhaustion, apoptose ?).

3-1. Réponses antibactériennes

La première implication des MAIT dans les réponses anti-infectieuses fut montrée dans des modèles d'infections bactériennes *in vitro* basés sur des APC infectées par différentes bactéries : *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa, Lactobacillus acidophilus…* toutes capables d'activer les MAIT via un mécanisme MR1 dépendant[252,253]. En effet de nombreux pathogènes et commensaux sont capables, lors de leur synthèse de riboflavine, de produire des molécules pouvant activer les MAIT. Plusieurs modèles murins d'infection ont par la suite montré l'importance *in vivo* des MAIT dans le contrôle de certaines infections (*Mycobacterium bovis, Francisella tularensis, Escherichia coli*)[254-256].

Les MAIT ont été étudiés plus amplement chez les patients infectés par *Mycobacterium tuberculosis*. La déplétion en MAIT circulants observée semblerait être due à une infiltration au niveau des lésions pulmonaires[257,258]. Ils auraient ici une fonction plutôt T_H1-*like*, avec

sécrétion d'IFN-γ et de TNF-α, et également une fonction cytotoxique, par la lyse des cellules épithéliales infectées[259].

3-2. Réponses antivirales

Bien qu'assez peu d'études n'aient documenté le rôle des MAIT dans les infections virales, plusieurs données montrent leur activation dans ce cadre. C'est le cas pour les infections par le virus de la dengue (DENV), l'HCV et le virus de la grippe, où les MAIT sont activés (sécrétion de cytokines et granzyme B) via un mécanisme TCR-indépendant, plutôt sous contrôle des IL-12, 18 et 15. Cependant, l'activation MAIT n'est pas nécessairement le marqueur d'une bonne réponse immunitaire et de contrôle viral. Par exemple le niveau d'activation des MAIT est corrélé à la sévérité de l'infection par le DENV[260]. L'infection HCV induit une diminution des MAIT circulants, probablement due à une infiltration des MAIT au niveau hépatique, où ils exercent un rôle protecteur contre la fibrose[261]. Cette relocalisation vers le foie est sans doute un facteur favorisant la bactériémie souvent observée chez les patients cirrhotiques[262].

Dans le cas de l'infection par le HIV, le nombre de MAIT circulants chute rapidement, la population restante exprimant des marqueurs d'anergie[235,263,264]. Les MAIT n'étant pas particulièrement permissifs à l'infection, mais sensibles à l'anergie, cette chute serait le résultat d'une réponse exacerbée entrainant leur exhaustion et apoptose, chute favorisant l'apparition d'infections opportunistes au niveau des muqueuses. Les MAIT n'ont donc à priori pas de rôle direct contre le HIV, mais leur perte favorise la progression de la maladie.

3-3. Autres fonctions dans les maladies non infectieuses

Les MAIT sont primordiaux dans la réponse à certaines maladies non infectieuses, montrant une nouvelle fois que leur mécanisme de recrutement et d'activation ne se limite pas à la détection de métabolites de riboflavine. Leur nombre est par exemple diminué chez les patients souffrants de maladies inflammatoires de l'intestin (IBD)[265]. A l'inverse, les MAIT sont recrutés au niveau des sites inflammés dans le cas des maladies telles que le psoriasis[266], l'arthrite rhumatoïde[267], la sclérose en plaque[268] ou l'encéphalomyélite autoimmune[269].

De part ces derniers exemples, on peut voir toute l'étendue des fonctions des MAIT. Il est néanmoins surprenant d'observer que dans plusieurs cas la relocalisation des MAIT de la circulation vers un site inflammatoire semble laisser place au infections bactériennes,

montrant le rôle crucial des MAIT dans le contrôle de l'homéostasie (notamment intestinale), peut-être encore plus que dans la résolution de certaines maladies infectieuses.

CHAPITRE B – LES LYMPHOMES T

Les lymphomes sont des pathologies tumorales émergeant de la prolifération anormale de lymphocytes, qu'ils soient de nature B, T ou NK. Aux côtés des leucémies et des néoplasies myéloïdes, ils font partie d'un grand ensemble très hétérogène d'hémopathies malignes.
Ce second chapitre introductif se concentrera sur les lymphomes T, axe de recherche principal de ce travail de thèse. Dans une première partie nous aborderons la classification, les aspects cliniques et l'épidémiologie des lymphomes T. Nous aborderons ensuite les différents mécanismes impliqués dans la lymphomagenèse.

I – Classification, clinique et épidémiologie

De par leur hétérogénéité et les progrès diagnostics constants, la classification des lymphomes est complexe et régulièrement sujette à modifications. La dernière version de la classification des néoplasmes lymphoïdes de l'OMS a été publiée l'année dernière dans *Blood*, fait notamment part de nouvelles entités, et met à jour de nombreuse informations concernant le diagnostic, le pronostic, de nouvelles signatures moléculaires ainsi que de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées[270].

1) Classification

Les lymphomes sont historiquement séparés en 2 catégories :

- Les lymphomes de Hodgkin, une entité particulière de lymphome décrite pour la première fois en 1832 par Thomas Hodgkin[271], caractérisée notamment par la présence de cellules lymphomateuse multinucléées typiques appelées cellules de Reed-Sternberg. Il s'agit en réalité d'un type particulier de lymphome B[272], représentant environ 10% de l'ensemble des lymphomes humains.
- Les lymphomes non-Hodgkiniens (NHL), qui par défaut regroupent l'ensemble de tous les autres lymphomes, dont les lymphomes T/NK et B.

1-1. Complexité du compartiment lymphocytaire T normal

De la même manière que les lymphomes B dérivent de lymphocytes B à différents stade de différenciation, les lymphomes T peuvent émerger de l'expansion clonale de lymphocytes T plus ou moins différenciés. Il en découle donc des hémopathies T immatures et matures, aspect important de leur classification.

On peut schématiquement considérer qu'un lymphome garde en partie les caractéristiques du type cellulaire dont il émerge, sa contrepartie « normale », bien qu'il soit largement influencé par les mécanismes de lymphomagenèse sous-jacents. Dans le cas des lymphomes T, cela se révèle particulièrement délicat. En effet, le compartiment lymphocytaire T normal est de nature complexe et il existe de très nombreux types et sous-types : T naïfs, T $CD8^+$ cytotoxiques, T_H (1, 2, 17 mais aussi 9 et 22…), T_{REG} (regulateurs), T_{FH} (*follicular helper*), T_{MEM} (mémoire), T non-conventionnels tels que les Tγδ, les NKT (comprenant tout deux de nombreux sous-types, développés dans le chapitre précédent), les MAIT…

S'ajoute à cela la plasticité des différentes populations T normales, puisque certaines ont la possibilité de se trans-différencier, ainsi qu'un processus de développement et de différenciation localisé dans plusieurs organes lymphoïdes, successivement dans la moelle osseuse, le thymus et les organes lymphoïdes secondaires. Tous ces éléments font des lymphomes T des pathologies de nature et de classification complexes.

1-2. Les types de lymphomes T

L'ensemble des hémopathies malignes dérivants de la transformation de précurseurs T constitue les leucémies aiguës ou lymphomes lymphoblastiques T, qui ne seront pas abordés dans ce chapitre.

Habituellement regroupés avec les hémopathies NK, les lymphomes T matures sont extrêmement hétérogènes, notamment pour les raisons expliquées ci-dessus, avec une trentaine d'entités décrites à ce jour[270]. Leur classification est également compliquée par la rareté de ces pathologies. Ces hémopathies T matures peuvent potentiellement être séparées en 2 parties : les lymphomes T périphériques (PTCL) et les lymphomes T cutanés (CTCL). Cependant, selon cette classification de l'OMS et l'ensemble de la littérature, il n'est pas tout à fait clair que l'on puisse considérer PTCL et CTCL comme 2 ensembles bien distincts. Dans le reste de ce manuscrit, nous emploierons le terme PTCL pour désigner l'ensemble des lymphomes T matures, considérant les CTCL comme des entités de PTCL extra-nodaux. Les PTCL représentent à eux seuls un groupe de lymphomes matures comprenant plus de 20

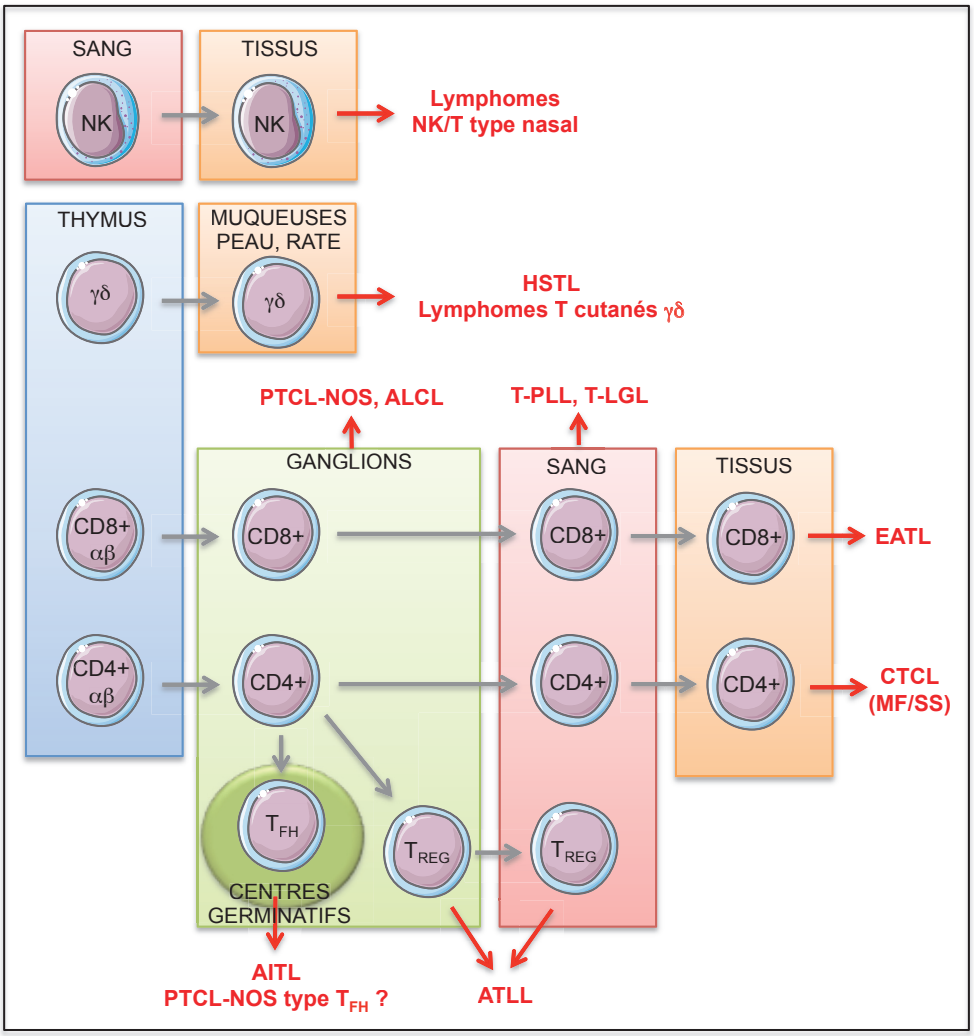
entités différentes (**Tableau3**), comptant pour 10 à 15% de l'ensemble de lymphomes non-Hodgkiniens[273].

Tableau 3 : Classification OMS des hémopathies T matures selon la révision de 2016. D'après Swerdlow et al., Blood 2016

Entités	Acronymes
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma	AITL
Peripheral T-cell lymphoma, NOS	PTCL-NOS
Anaplastic large-cell lymphoma, ALK+ or ALK-	ALCL
Breast implant–associated anaplastic large-cell lymphoma	BIA-ALCL
Adult T-cell leukemia/lymphoma (HTLV-1+)	ATLL
Extranodal NK-/T-cell lymphoma, nasal type	NK/T-L
T-cell prolymphocytic leukemia	T-PLL
T-cell large granular lymphocytic leukemia	T-LGL
Chronic lymphoproliferative disorder of NK cells	Chronic NK-LPD
Aggressive NK-cell leukemia	ANKL
Enteropathy-associated T-cell lymphoma (ex-EATL type I)	EATL
Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma (ex-EATL type II)	MEITCL
Indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract	Indolent T-LPD
Hepatosplenic T-cell lymphoma	HSTL
Mycosis fungoides	MF
Sézary syndrome	SS
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma	SPTCL
Primary cutaneous CD30+ T-cell lymphoproliferative disorders	PCLPD
Primary cutaneous γδ T-cell lymphoma	PCGD-TCL
Primary cutaneous CD8+ aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma	CD8+ AECTCL
Primary cutaneous acral CD8+ T-cell lymphoma	acral CD8+ TCL
Primary cutaneous CD4+ small/medium T-cell lymphoproliferative disorder	PCSM-TCLPD
Follicular T-cell lymphoma	FTCL
Nodal peripheral T-cell lymphoma with T_{FH} phenotype	Nodal PTCL-TFH
Systemic EBV+ T-cell lymphoma of childhood	S-EBV-TCL
Hydroa vacciniforme–like lymphoma	HVLL

Basée sur un ensemble de critères cliniques (localisation nodale ou extra-nodale en premier lieu), morphologiques, immunophénotypiques (dont la recherche de la contrepartie cellulaire normale), génétiques, la classification permet de différencier toutes ces entités, du moins partiellement. En effet, la catégorie des PTCL-NOS (pour *Non-Otherwise Specified*) de par son nom reflète bien les difficultés rencontrées quand à la classification de certains lymphomes T. Ceci est d'autant plus vrai que cette catégorie, sorte de groupe d'exclusion, représente 26% de l'ensemble des PTCL, soit l'entité la plus fréquente[274]. La deuxième entité la plus fréquente (18% des PTCL) est le lymphome angioimmunoblastique (AITL), bien que

2 études françaises semblent montrer qu'ils représentent en fait 36% des PTCL, faisant des AITL l'entité la plus fréquente en France, une observation sans doute due aux progrès diagnostics[275]. Les AITL sont le parfait exemple de néoplasme ayant gardé des caractéristiques propres à sa cellule d'origine. Il est en effet maintenant clair que ces lymphomes émergent à partir de T_{FH}, un sous-type de lymphocytes T $CD4^+$ participant à la maturation fonctionnelle des lymphocytes B au niveau des centres germinatifs[276]. Parmi les marqueurs phénotypiques T_{FH} considérés pour le diagnostic de ce type de lymphome figurent PD-1, CD10, BCL6, CXCL13, ICOS, SAP et CCR5. Selon la classification OMS de 2016, au moins 2 à 3 de ces marqueurs doivent être exprimés afin de pouvoir classifier un lymphome comme type T_{FH}. Cela à conduit au regroupement des AITL avec d'autres entités au phénotype T_{FH} telles que le lymphome T folliculaire (FTCL) ou certains PTCL nodaux, bien que ces derniers puissent différer des AITL d'un point de vu purement clinique. Il ne s'agit pas de la seule entité pour laquelle la cellule d'origine est connue (**Figure 7**).



Revue des principaux types de PTCL dont l'origine cellulaire est connue.
D'après De Leval Histopathology 2011 et Gaulard et al., Semin Hematol 2014

Au delà de l'intérêt diagnostic qu'apporte une classification précise et détaillée, elle permet la mise en place d'un pronostic et éventuellement de thérapies ciblées pour la prise en charge de ces lymphomes T, qui sont pour la plupart agressifs. La recherche de la contrepartie lymphocytaire normale peut, elle, permettre de comprendre certains mécanismes de lymphomagenèse, et donc de potentiellement élucider l'étiologie et la physiopathologie de la maladie (inconnue pour la plupart des PTCL) ainsi que de développer de nouvelles thérapies ciblant ces processus de transformation ainsi que les mécanismes physiologiques essentiels à la cellule tumorale.

2) Clinique

L'hétérogénéité des hémopathies T a évidemment des conséquences en terme clinique, que ce soit au niveau diagnostic, pronostic ou thérapeutique.

2-1. Découverte de la maladie

Dans la plupart des cas, l'existence d'un lymphome est découverte par la manifestation du syndrome tumoral, c'est à dire généralement une adénopathie ou d'organomégalies telles qu'une splénomégalie (le plus fréquent) parfois associées à une hépatomégalie. Ces adénopathies sont le plus souvent fermes, indolores, non-inflammatoires, et mobiles. Tous les sites anatomiques extra-ganglionnaires peuvent aussi être envahis : moelle osseuse, peau, système digestif, poumons, reins, système nerveux central, seins…

Des signes généraux peuvent également être à l'origine de la découverte de la maladie, comme l'apparition de symptômes B (fièvre vespérale, sueurs nocturnes, perte de poids >10% en 6 mois ou 5% en 1 mois), une altération de l'état général, un syndrome cave supérieur (dyspnée, céphalées, oedème facial) lié à une adénopathie compressive, ou encore un prurit isolé.

2-2. Diagnostic

La présence d'un lymphome est confirmée par la réalisation d'une biopsie tissulaire (exérèse ou ponction de l'adénopathie, myélogramme) à partir de laquelle vont être faits un ensemble d'analyses histologiques, cytologiques, immunophénotypiques (cytométrie en flux, immunohistochimie) et de biologie moléculaire (caryotype, recherche de clonalité et/ou de transcrits de fusion).

Les progrès rapides réalisés en biologie moléculaire tel que le NGS (*Next Generation Sequencing*), en parallèle d'une meilleure compréhension des mécanismes de lymphomagenèse, permettent des diagnostics de plus en plus fiables et rapides.

2-3. Pronostic

De manière générale, les lymphomes T sont des pathologies de pronostic défavorable, avec en moyenne 30% de survie à 5 ans. Ceci est bien sûr très variable d'une entité à une autre (exemple : un ALCL cutané présente 90% de survie à 5 ans contre 7% dans les HSTL[274]). Hormis le type de lymphome, sont pris en compte l'âge du patient, son état général, ainsi que le stade de la maladie (classification de Ann Arbor Costwolds), ou encore certains paramètres biologiques tels que le niveau de LDH (reflet indirect de la masse tumorale) et le taux d'hémoglobine.

De la même manière que la remarque faite pour le diagnostic, les progrès faits dans la compréhension des lymphomes, notamment des profils mutationnels, peuvent être des marqueurs importants de bon ou de mauvais pronostics, propres à chaque entité.

2-4. Complications

Les causes de la mort sont variables, directement ou indirectement liées au lymphome. L'envahissement tumoral peut directement impacter des organes adjacents à la tumeur (par compression mécanique) ou bien détruire la fonction des organes infiltrés (poumons, foie, système digestif, reins, système nerveux…). Les complications infectieuses résultant d'un effondrement du système immunitaire, ainsi que les hémorragies par thrombopénie induites suite aux chimiothérapies sont possibles. Un syndrome de lyse tumoral, spontané ou suite à chimiothérapie, est également parfois observable. Enfin, la progression lymphomateuse, engendrant cachexie, anorexie et altération de l'état général, peut finir par causer la mort des patients.

2-5. Traitements

Il n'y a actuellement aucun consensus concernant la prise en charge thérapeutique des lymphomes T. Contrairement aux hémopathies B [277], peu d'avancées ont été réalisée pour le traitement des lymphomes T. Les polychimiothérapies reposant sur l'utilisation d'anthracyclines de type CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) sont le traitement classique par défaut, en dépit de leur relative inefficacité, à l'exception des

ALCL-ALK$^+$, bien que leur effet ait été légèrement amélioré par l'ajout d'etoposide, au prix d'une toxicité majorée[278,279]. Plusieurs nouvelles molécules inhibant les histones deacéthylases telle que la romidepsine sont actuellement testées et approuvées en cas de rechute ou de non-réponse aux traitements habituels et pourraient bien à terme améliorer la survie des patients[280,281].

3) Epidémiologie

Les lymphomes non-Hodgkiniens représentent la 7ème cause de cancer aux Etats-Unis (4,3%), avec un nombre de nouveaux cas estimé à 72240, et environ 20000 décès pour 2017, un chiffre en baisse depuis 1997 (données du NIH). Bien que l'incidence globale des NHL ait augmentée au cours des 40 dernières années, celle-ci semble s'être stabilisée depuis les fin 90/ début 2000, du moins en Europe et aux Etats Unis[282] (données NIH).

3-1. Evolution et répartition

L'incidence des PTCL, qui rappelons-le représentent 10 à 15% des NHL à travers le monde, semble elle avoir drastiquement augmenté. D'après une étude américaine basée sur un ensemble des diagnostics de PTCL entre 1992 et 2005, l'incidence serait passée de 0,2 à 0,9 cas pour 100000 personnes[283], soit une augmentation de 450% ! Bien que l'on ne puisse pas exclure une augmentation de certains facteurs pouvant être impliqués dans la lymphomagenèse (agents infectieux, polluants… qui seront développés plus tard), il est clair qu'une telle augmentation est avant tout le reflet de progrès majeurs dans le diagnostic de cette pathologie rare et hétérogène.

Il existe dans l'épidémiologie des lymphomes T de nombreuses disparités sexuelles, géographiques et ethniques. Les hommes sont globalement plus touchés que les femmes. La médiane d'âge au diagnostic est de 65 ans faisant des lymphomes T une pathologie du sujet âgé dans la plupart des entités, bien que certains lymphomes T soient prédominants chez l'enfant et/ou l'adulte jeune (ALL, ALCL, HSTL). L'incidence des PTCL est plus basse dans les pays développés que dans les pays en voie de développement (9,3% contre 13,4% des NHL)[284]. Aux Etats-Unis, des différences en terme d'incidence, d'entité de PTCL et de survie ont également été identifiées selon les ethnies (blancs, hispaniques, noirs, asiatique et natifs-américains), sans pour autant y apporter une explication[285].

3-2. Une hétérogénéité dans l'incidence des différents sous-types de lymphomes T

Les PTCL-NOS restent les cas les plus fréquents en Europe et aux Etats-Unis (excepté en France comme déjà évoqué[275]). Les AITL et les EATL sont plus fréquents en Europe (lien possible entre EATL et intolérance au gluten), et les ALCL-ALK$^+$ sont plus fréquent en Amérique du Nord que dans le reste du monde. Les lymphome NK/T nasaux et les ATLL sont eux plus fréquents en Asie, une donnée semblant confirmer l'implication de certains virus (EBV et HTLV-1, dont la prévalence est élevée en Asie) dans la lymphomagenèse de ces entités[274]. Cependant, l'étiologie de la plupart des lymphomes reste inconnue et est sans doute multifactorielle. Il est donc difficile d'expliquer de telles différences géographiques : Prédispositions génétiques ? Mode de vie ? Alimentation ? Agents infectieux ? …

3-3. Facteurs de risque

Bien que l'étiologie soit inconnue pour la plupart des lymphomes T, plusieurs facteurs de risque associés ont été décrits, notamment grâce aux études menées dans le cadre du projet InterLymph : antécédents familiaux d'hémopathies malignes, eczema/psoriasis, consommation de tabac (pendant plus de 40 ans), exposition à certaines teintures textiles, ainsi que certaines pathologies auto-immunes (maladie céliaque). A l'inverse certains facteurs sont associés avec un risque plus faible de développer certains lymphomes T : antécédents d'allergies, consommation d'alcool, exposition aux UV, vivre ou travailler dans une ferme[286,287].

Le rôle de certains pathogènes et de maladies auto-immunes sera abordé plus amplement dans la partie suivante développant la physiopathologie des lymphomes T.

II – Physiopathologie des lymphomes T

Les mécanismes impliqués dans la lymphomagenèse sont complexes, multifactoriels et par conséquents encore mal compris. Ceci est d'autant plus vrai dans les hémopathies T, notamment à cause de leur faible fréquence et forte hétérogénéité, compliquant la collection de cohortes de patients homogènes et représentatives de chaque entité. Cependant, de nombreuses pistes de recherche ont pu être découvertes en particulier grâce aux progrès

considérables réalisés en séquençage (NGS *whole-genome* ou *whole-exome*…) et en analyse de profils d'expression génique (RNA-Seq, ATAC-Seq…).
Les proportions des lymphocytes B et T chez l'homme étant assez comparables (environ 50/50 selon les organes), il peut paraître surprenant que seulement 10-15% des lymphomes soient d'origine T. Ce déséquilibre, en faveur des hémopathies B, peut en grande partie s'expliquer par les différents processus de l'ontogénie B, comme les réarrangements du BCR, la commutation isotypique, ou les hypermutations somatiques. Tous ces mécanismes interviennent directement par cassures et modifications de la séquence d'ADN, exposant grandement les lymphocytes B à des événements mutagènes potentiellement transformants. Nous nous intéresserons ici tout particulièrement au concept d'activation lymphocytaire comme moteur du processus de lymphomagenèse T, soit comme élément initiateur, soit comme facteur de survie tumorale. Nous développerons également les mutations des facteurs épigénétiques récemment décrits dans de nombreuses entités de lymphomes T.

1) L'activation lymphocytaire T comme mécanisme de lymphomagenèse

Le concept selon lequel l'activation des lymphocytes peut engendrer leur transformation est assez ancien, cependant la démonstration de ce mécanisme n'est encore que partiellement adressée, notamment de par l'aspect complexe du processus ainsi que des progrès récents en immunologie. Certaines associations activation/lymphome ont aujourd'hui été très clairement établies et ont permis d'ouvrir la voie à de très nombreuses investigations sur le sujet dans le domaine des hémopathies T. Nous développerons ici les sources potentielles pouvant être à l'origine d'une telle activation en les séparant en 2 catégories : les stimulations d'origine exogène (stimulation antigénique chronique, inflammation), et les stimulations que nous nommerons endogènes, résultant principalement d'éléments mutationnels activateurs ou de dérégulation de voies de signalisation.

1-1. Stimulations exogène

Considérant que presque 20% des cancers chez l'homme sont liés à une inflammation chronique causée par des infections, des maladies autoimmunes ou à l'exposition à certaines molécules irritantes[288], il n'est pas surprenant que cette étiologie puisse être retrouvée dans les

hémopathies, d'autant plus que les lymphocytes sont eux-mêmes la source de cette inflammation et qu'ils sont la cible directe de stimulations antigéniques.

1-1.a - Biologie de l'activation des lymphocytes T normaux

L'activation d'un lymphocyte T naïf (conventionnel) nécessite obligatoirement une stimulation de son récepteur antigénique, le TCR, par un complexe CMH/Ag. Mais le TCR n'est que le premier élément d'une voie de signalisation complexe, composée de molécules adaptatrices (CD3, LAT, SLP-76), de corécepteurs (CD28), de kinases (LCK, ITK, ZAP-70, PLC-γ1, PI3K) et de phosphatases, de seconds messagers (DAG, IP3) et enfin de facteurs de transcription tels que NF-κB, NFAT et AP-1 (**Figure 8**). L'activation lymphocytaire T va permettre la différenciation, la production de cytokines (notamment IL-2 de manière autocrine et paracrine), mais aussi et surtout la prolifération et la survie… des processus certes physiologiques et finement régulés, mais qu'il convient aisément de considérer comme potentiellement pro-oncogéniques.

L'activation T ne repose pas seulement sur la signalisation TCR, bien au contraire : la stimulation du TCR seul induit l'anergie des lymphocytes T. Elle nécessite au minimum l'apport de signaux de costimulations, principalement au travers de CD28. Ce processus d'activation est donc grandement dépendant du contexte immunitaire exogène, qu'il soit cytokinique ou cellulaire, observation d'autant plus vraie dans le cas des lymphocytes T non-conventionnels pour les raisons déjà évoquées dans le 1er chapitre de ce manuscrit (activation indirecte, TCR-indépendante).

Ainsi, face à un signal de stress, infectieux ou non, l'activation complète d'un lymphocyte T nécessite la mise en marche du système immunitaire inné (polynucléaires, macrophages…), permettant entre autre l'activation, la maturation et la migration des cellules dendritiques (ou d'autres cellules présentatrices d'Ag), acteurs clés fournissant aux lymphocytes T l'ensemble des signaux nécessaires à leur activation : présentation antigéniques au TCR, costimulation de CD28 via l'expression B7 (CD80/86) et production de cytokines.

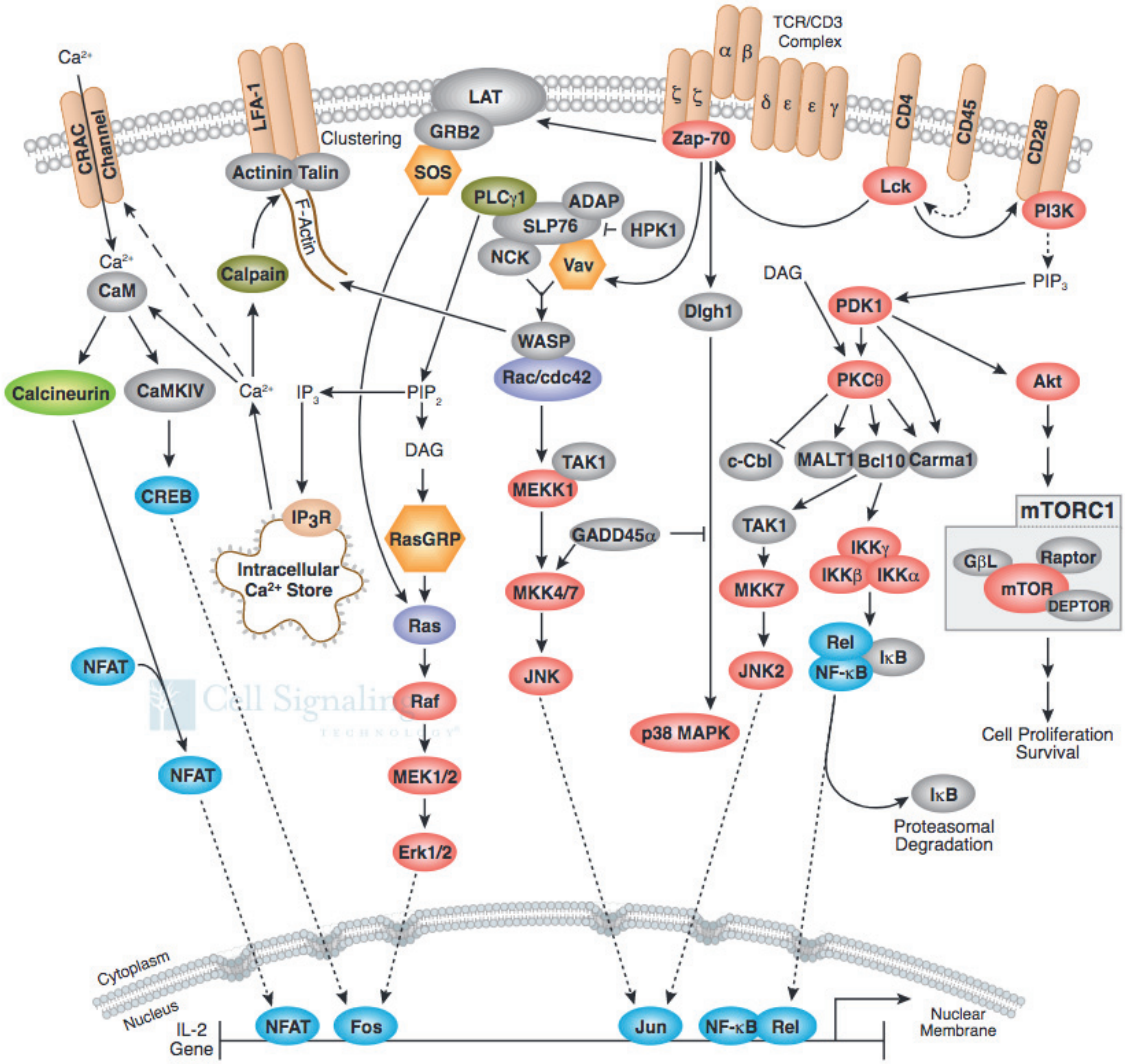


Figure 8 : Voies de signalisation du recepteur antigénique T (TCR)
Extrait de Cell Signaling Technologies

Il est primordial de bien distinguer l'ensemble des implications que peuvent avoir ces signaux exogènes dans la physiopathologie des lymphomes T :

- Soit comme élément initiateur (ou *driver*), c'est à dire à l'origine des mécanismes oncogéniques.
- Soit comme élément nécessaire à la survie et à la prolifération des clones tumoraux ou pré-tumoraux, ayant déjà subit des processus transformants.

Ces fonctions ne sont bien sûr pas exclusives, puisqu'elles interviennent à différentes étapes de la lymphomagenèse T, respectivement initiatrice ou pro-survie. Au contraire, nous pensons même qu'elles sont liées, et qu'une dépendance des clones tumoraux aux signaux exogènes peut être révélatrice de leur génération par activation chronique. En effet, il convient de relever ici une caractéristique clé des lymphocytes T générés dans un contexte de stimulation antigénique chronique : l'exhaustion.

Lors d'une infection aiguë (ou d'une vaccination par exemple) les lymphocytes T sont activés et se différencient en lymphocytes T effecteurs (T_{EFF}) après 1 à 2 semaines, différenciation accompagnée d'une forte prolifération et de reprogrammations transcriptionnelles, épigénétiques et métaboliques. Après résolution de l'infection et élimination de la source antigénique, la plupart des T_{EFF} est éliminée par contraction clonale, alors qu'une faible proportion persiste et entre dans un processus de différenciation lymphocytaire T mémoire. Bien que leur programme « effecteur » soit *down*-régulé, ces lymphocytes T à mémoire (T_{MEM}) conservent la capacité de réactiver leurs fonctions effectrices en cas de restimulation antigénique. Les T_{MEM} ont la capacité de s'auto-renouveler selon une prolifération lente (type cellule souche, comme les T naïfs), sous contrôle de l'IL-7 et de l'IL-15, mais de manière totalement Ag-indépendante[289,290].

A l'inverse, dans un contexte d'exposition antigénique et/ou d'inflammation persistantes, (comme une infection chronique ou d'une maladie auto-immune), le programme de différenciation des T_{MEM} se trouvé altéré, pour engendrer le processus d'exhaustion des lymphocytes T : perte progressive des fonctions effectrices, surexpression de marqueurs d'inhibition (PD-1, CTLA4, LAG3, CD160), expression altérée de certains facteurs de transcription clés, échec de transition vers la quiescence et absence de prolifération homéostatique Ag-indépendante[291-293]. Bien que non totalement inertes, ces lymphocytes T *exhausted* (T_{EX}) sont généralement incapables d'éliminer la source de stimulation antigénique[294] (**Figure 8**) . Ce phénomène d'exhaustion a été décrit dans un grand nombre de modèles animaux, ainsi que chez l'homme dans le cadre d'infections virales, bactériennes, parasitaire ou encore de cancers. Il a également été montré que dans différents modèles d'infections virales chroniques (HIV principalement), la maintenance des T_{EX} est dépendante de l'Ag à l'origine de leur exhaustion[295,296], bien qu'une étude publiée cette année semble montrer que dans le cadre de l'infection chronique HCV, des T_{EX} $CD8^+$ spécifiques du virus peuvent persister *in vivo* malgré son éradication, mais il s'agit là de lymphocytes T bien particuliers possédants un phénotype mixte T_{EX}/T_{MEM}[297].

Ainsi, les T_{EX} semblent « addicts » à leur Ag et à la stimulation continue du TCR. C'est ce point particulier qui nous pousse à penser que les lymphomes T dépendants du signal TCR pourraient avoir été initiés à l'origine par stimulation antigénique chronique, d'autant plus que les T_{EX} sembleraient avoir des capacité proliférative supérieures aux T_{MEM}[295].

Les rôles de ce type de facteurs exogènes pro-prolifératif et/ou pro-survie, qu'ils soient initiateurs de la transformation ou impliqués dans la progression du lymphome, semblent donc à nos yeux intrinsèquement liés. Malgré cela, et en raison des données parfois encore parcellaires dans ce domaine, nous tenterons d'aborder séparément ces 2 aspects (initiation *vs* progression/survie) dans les parties suivantes.

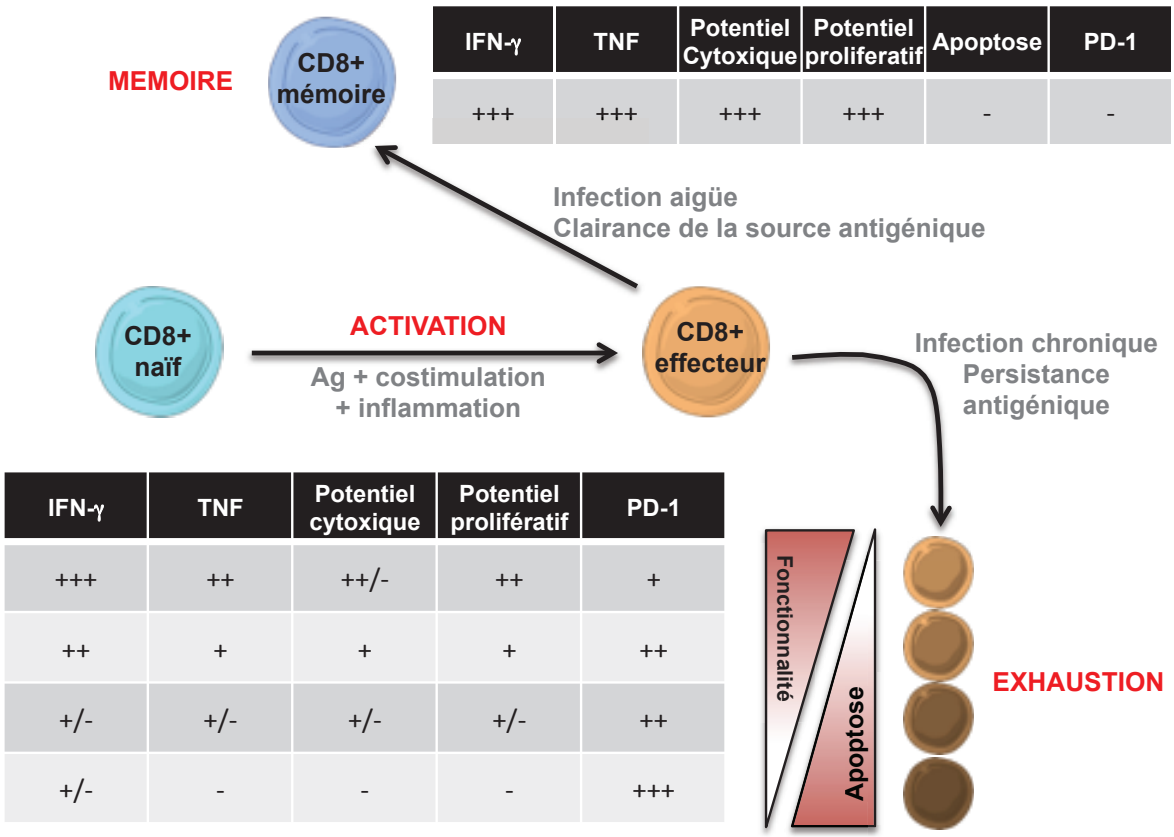


Figure 9 : Principe de l'exhaustion. Schéma représentant les différentes caractéristiques acquises et perdues lors de l'exhaustion des lymphocytes T par rapport à des lymphocytes T mémoire classiques. D'après Wherry et la., Nat Immunol 2011.

1-1.b - Les stimulations exogènes comme éléments initiateurs de la transformation T

Bien que l'association entre stimulation exogène (Ag, inflammation…) et lymphomagenèse soit soupçonné depuis longtemps, il existe finalement relativement peu de preuves du fonctionnement de ce mécanisme dans les PTCL comparé à d'autres mécanismes de transformation tumorale.

1-1.b-i) Cas de l'EATL et de la maladie coeliaque (MC)

L'EATL, ou *Enteropathy Associated T-cell Lymphoma*, représente selon nous, ne serait-ce que par son nom évocateur, un exemple frappant d'association entre inflammation chronique/stimulation antigénique et lymphomagenèse T.

Il s'agit d'une entité rare, représentant seulement 5-8% des lymphomes T (soit l'équivalent de 0,5 à 1,2% de l'ensemble des lymphomes non-hodgkiniens), et 10 à 25% des lymphomes primitifs intestinaux[298]. Pathologie du sujet âgé (60-70 ans), très agressive, les EATL présentent une moyenne de survie à 5 ans inférieure à 20%[299], voire moins selon les populations, puisqu'une étude américaine récente a décrit une médiane de survie de seulement 10 mois chez la population asiatique, une différence avec le reste de la population pouvant entre autre s'expliquer par le type d'EATL touchant différentiellement certaines ethnies[300].

Les EATL émergent de lymphocytes intra-épithéliaux (IEL), $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$.

Jusqu'à récemment, 2 types d'EATL étaient décrits :

- EATL de type I, représentant 80-90% de l'ensemble des EATL, plus fréquents dans les pays à forte prévalence de maladie cœliaque (MC) (Europe du Nord, Pays-Bas) et donc à priori plus associé à cette maladie. Ils sont majoritairement $\alpha\beta$.
- EATL de type II, récemment reclassifiés à part des EATL sous une entité distincte nommée MEITCL (*Monomorphic Epitheliotropic Intestinal T-Cell Lymphoma*) de part l'ensemble des caractéristiques cliniques, morphologiques et génétiques[270], mais aussi de par l'absence d'association avec la MC[301]. Principalement d'origine T$\gamma\delta$, il s'agit d'une entité plus fréquente en Asie, ce qui pourrait expliquer les différences de survies observées selon les ethnies[300,302,303].

Nous ne développerons donc ici que le cas des EATL type I, qui d'après la nouvelle classification sont finalement considérés comme l'unique « vraie » entité d'EATL.

La description initiale rapportant un lymphome intestinal chez un patient atteint de syndrome de malabsorption remonte à 1937[304]. Il aura néanmoins fallut attendre 1978 pour que Isaacson et Wright décrivent ce lymphome comme étant associé à la maladie cœliaque[305], et 1985 pour montrer son origine T[306].

La maladie cœliaque, également appelée intolérance au gluten (plus précisément à la gliadine, composant du gluten) est une pathologie digestive relativement fréquente, en particulier en Europe et en Amérique du Nord, où on estime qu'environ 1 personnes sur 100 peut être atteinte, la majorité des cas n'étant finalement jamais diagnostiquée. Elle se déclare le plus

souvent chez l'enfant, mais également chez l'adulte, où les symptômes peuvent être variés, allant de la diarrhée à la perte de poids. Le diagnostic se fait par la recherche d'Ac spécifiques (anti-transglutaminase), et est confirmé par endoscopie et biopsie au niveau de l'intestin grêle le plus souvent, particulièrement au niveau du jéjunum, la zone la plus fréquemment touchée. De cette intolérance résulte une inflammation associée à une perte de certaines fonctions intestinales, et donc un syndrome de malabsorption engendrant des carences alimentaires. Il n'existe à ce jour aucun traitement, la seule alternative étant l'adoption d'un régime sans gluten strict, à vie, bien que certaines approches soient actuellement testées en cliniques comme des Ac monoclonaux anti-IL-15, cytokine dont nous détaillerons le rôle dans la physiopathologie de la MC et de l'EATL plus bas. Il existe une très forte association entre la MC et l'expression des molécules HLA-DQ2 ou DQ8 (présents chez 100% des patients cœliaques), molécules de CMH permettant la présentation par les cellules dendritiques de peptides du gluten aux lymphocytes T, responsables notamment d'effets cytotoxiques sur l'épithélium intestinal. Des lymphocytes T $CD4^+$ gluten-réactifs favorisent la génération de lymphocytes B spécifiques (sécrétant IgG et IgA anti-gluten), sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires, causant plus d'apoptose des entérocytes, une perméabilité intestinale, et par conséquent une inflammation systémique. Dans ce contexte, l'IL-15 permet la survie des IEL, et donc l'émergences potentielle de clones T tumoraux. Des polymorphismes dans les gènes de l'IL-15 et de l'IL-15Rα ont d'ailleurs été identifiés comme étant associés à des niveaux plus élevé d'IL-15 et donc un risque plus élevé de développer une MC[307]. Il y a donc une prédisposition génétique à la MC.

L'association entre EATL et MC est aujourd'hui très clairement documentée d'un point de vue épidémiologique et biologique. Par exemple, l'adoption d'un régime sans gluten (RSG) semble avoir un effet protecteur contre le développement de lymphomes intestinaux. Une étude sur une large cohorte italienne de patients cœliaques a montré une diminution du risque de développer un EATL, le ratio de morbidité étant de 6,42 chez les patients ne suivant pas de régime particulier, contre seulement 0,22 chez les patients suivant un RSG[308]. Cet effet protecteur n'a cependant jamais été montré chez des personnes non cœliaques[309].
Comparé à d'autres hémopathies T et considérant la rareté des EATL, leur physiopathologie, en particulier le continuum de leur évolution à partir de la MC, est assez bien décrite (**Figure 10**). Le développement d'un EATL semble lié à la sévérité de la MC sous-jacente. En effet, la présence d'altérations histologiques persistantes telles que l'atrophie villositaire ou une

hypertrophie des cryptes intestinales, ainsi qu'une lymphocytose intra-épithéliale chez les patients cœliaques sont des facteurs aggravants[310]. De même un retard de diagnostic de MC et donc potentiellement permettant l'évolution de la pathologie, semble être un facteur risque de lymphomes intestinaux[311]. Bien que l'adoption d'un régime sans gluten améliore la condition des patients cœliaques dans environ 98% des cas (jusqu'à être totalement exempts de symptômes), certaines personnes développent une MC réfractaire (MCR), c'est à dire évoluant malgré le RSG et donc totalement gliadine-indépendant, s'accompagnant d'ulcérations ou de cavitations mésentériques. Dans certains cas (MCR type I) la pathologie reste similaire à une MC classique, avec des IEL au phénotype normal. Dans les autres cas (MCR type II) la pathologie s'aggrave. Il s'agit d'un stade considéré comme pré-néoplasique, puisque près de 50% des personnes atteignant ce stade de MCR développeront un EATL[312]. Les clones tumoraux d'EATL ont d'ailleurs pu être identifiés en rétrospective dans des biopsies de patients coeliaques au stade de MCR[313]. Les IEL abordent alors un phénotype anormal (généralement $sCD3^-$, $CD4^-/CD8^-$ $CD7^+$ et $CD103^+$) avec la marque d'un réarrangement TCRγ. La lymphocytose intra-épithéliale devient alors progressivement clonale[314], pouvant coloniser des sites extra-intestinaux (poumons, sang, peau…). Ces IEL dépendent de l'IL-15 pour leur survie (activation de la voie STAT5/JAK3 et induction de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL[315]), et pour leur capacité cytotoxique notamment envers les cellules épithéliales (activation de granzyme B, expression de NKG2D[316,317]). Le niveau élevé d'IL-15, produite principalement par les cellules épithéliales, a également pour conséquence de perturber toute immunomodulation, en inhibant principalement l'induction de TGF-β via Smad3[318] ou encore en réduisant la capacité régulatrice des T_{REG}[319,320].

Une étude récente semble montrer que les IEL lymphomateux, bien que effectivement clonaux, ne sont pas gluten-spécifiques, contrairement aux T-$CD4^+$ et aux B retrouvés dans la maladie cœliaque[321]. Leur transformation est donc indirectement dépendante du gluten, cet Ag pouvant être considéré comme l'initiateur de réponses T et B à l'origine de tout le contexte immunologique responsable de la prolifération, de la survie et de l'activation des capacités cytotoxiques des IEL qui vont maintenir le contexte inflammatoire pathologique, et finir par mener à leur transformation et au développement du lymphome. Une étude récente montre en effet que dans le cadre d'une MC ou d'une MCR, l'expansion et la survie d'IEL tumoraux ou non tumoraux (lignées et cellules primaires) est induite par des T-$CD4^+$ gluten-spécifiques via la production de cytokines (TNF, IL-2, IL-21) ayant des effets similaire à l'IL-15 : activation

de la voie STAT5, induction de Bcl-xL…[322]. Il n'est pour l'instant pas clair quels événements mènent à l'indépendantisation de la pathologie vis-à-vis du gluten.

Comme nous l'avons montré, l'IL-15 est un élément clé de la pathogénèse de la maladie coeliaque et de son évolution vers l'EATL. Avant d'aller plus loin dans la lymphomagenèse associée à l'IL-15, il est nécessaire de décrire plus en détail le rôle de cette cytokine et son fonctionnement physiologique. Comme précédemment évoqué, il s'agit d'une interleukine clé dans le développement, l'activation, la prolifération et la survie de plusieurs lignées lymphoïdes via différents récepteurs et plusieurs voies de signalisation. Elle signalise via IL-15Rα associé à l'IL-2Rβγ, lui conférant ainsi des effets redondants avec l'IL-2. Le signal passe par l'activation de kinases de la voie JAK/STAT, plus précisément par JAK1 puis STAT3 via la chaine β du récepteur et JAK3/STAT5 via la chaine γ. STAT3 et STAT5 phosphorylés forment alors un hétérodimère importé dans le noyau, où il va activer la transcription de gènes anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL), de pro-oncogènes (c-Myc, c-Fos, c-Jun). Une autre voie passant par Shc et Grb2 induit l'activation d'Akt (via PI3K) et de la voie Ras/MAPK, 2 voies clés de la survie et de la prolifération cellulaire agissants au travers de l'induction des même anti-apoptotiques et pro-oncogènes que STAT3/STAT5, de facteurs cytotoxiques (perforine/granzymes) et de NF-κB, mais aussi via la répression de facteurs pro-apoptotiques (Bim, PUMA). L'IL-15 est également un puissant chemo-attracteur des lymphocytes T[323]. Nous verrons par la suite que cette cytokine est également impliquée dans d'autres PTCL.

Au delà du contexte immunologique, les EATL sont caractérisés par un certain nombre d'anomalies cytogénétiques et de mutations ponctuelles que nous n'aborderons pas dans cette introduction. Néanmoins, nous pensons que ce contexte inflammatoire, source de prolifération et de survie, et donc d'induction d'un stress réplicatif associé à un échappement à l'apoptose pourrait permettre l'émergence des ces mutations pro-oncogéniques, une remarque pouvant s'appliquer à tous les modèles de lymphomagenèse par stimulation chronique que nous développerons. Il n'est cependant pas exclu que certaines mutations *driver* en amont puissent favoriser la lymphomagenèse associée à l'IL-15 par exemple.

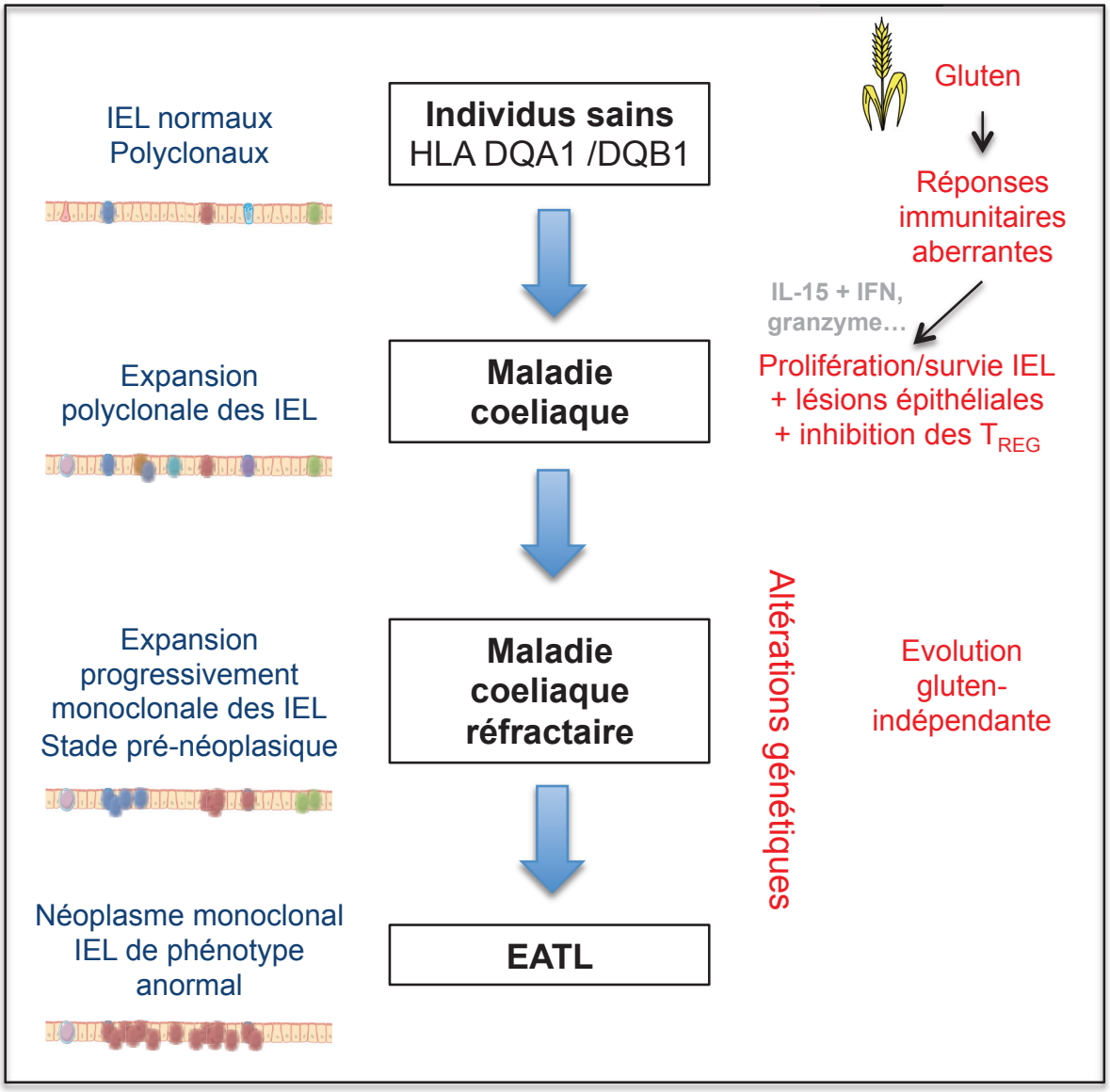


Figure 10 : Evolution de la maladie coeliaque vers l'EATL. Le panel de gauche (bleu) décrit le statut des IEL, le panel de droite (rouge) décrit les ménacimes physiopathologiques impliqués.
D'après Isaacson et al., J Pathol 2005

1-1.b-ii) Cas des lymphomes T cutanés

Certains PTCL extra-nodaux ont un tropisme cutané. Ils sont regroupés sous le nom de lymphomes T cutanés, ou CTCL, qui sont parfois classés à part des PTCL comme nous l'avons déjà évoqué. Le *Mycosis fongoïdes* (MF) représente environ 50% des cas de lymphome T cutané primitifs. Cette pathologie fut décrite pour la première fois en 1806 par Alibert, mais il aura fallu plus d'un siècle et demi avant que le terme CTCL soit associé au MF, ainsi qu'à son équivalent leucémique, le syndrome de Sézary (SS). Au delà du MF et du SS, une autre catégorie est appelée *primary cutaneous* PTCL-NOS (PCTCL- NOS), montrant

encore une fois les parts d'ombre restantes dans la classification des PTCL. Les CTCL sont un ensemble d'entités hétérogènes dont l'incidence est d'environ 0,5/100000 et touchant préférentiellement les hommes (ratio H:F de 2:1) avec une moyenne d'âge de 55 à 60 ans. Les symptômes peuvent être variés, les manifestations cutanées pouvant apparaître comme des taches ou des plaques, souvent accompagnées de démangeaisons, et donc parfois confondues avec de l'eczéma, du psoriasis et une dermatite, compliquant son diagnostic aux stades précoces. Ces manifestations sont révélatrices d'une lymphoprolifération locale de lymphocytes T_{MEM} $CD4^+$ au profil T_H2 parfois associée à une dissémination extra-cutanée (ganglions, et principalement sang dans le SS) en fonction du stade de la maladie. Les MF sont des pathologies pour la plupart indolentes, avec une évolution lente. Le pronostic des CTCL reste mauvais, malgré l'introduction de nouvelles options thérapeutiques. Les SS et les PCTCL-NOS sont plus agressifs, avec moins de 20% de survie à 5 ans[324]. Les patients avec un MF meurent pour la plupart de maladies non liées au lymphome, très probablement à cause de leur âge au diagnostic et de l'évolution lente de la maladie (parfois plusieurs décennies). Cependant, environ 25% meurent des conséquences du lymphome, le plus souvent par immunosuppression et infections opportunistes. Il n'existe à l'heure actuelle pas de traitements curatifs efficaces contre les CTCL, mais plusieurs options thérapeutiques topiques ou systémiques sont tout de même disponibles, avec des efficacités variables, dépendantes fortement de l'entité et du stade d'évolution de la maladie : corticostéroïdes, rétinoïdes, inhibiteurs d'histone deacétylases tels que la romidepsine ou le vorinostat (HDACI), cytokines (IFN-α, IL-12), psoralène en combinaison avec des UV (PUVA), radiothérapie et chimiothérapie…[325].

De récentes analyses pan-génomiques de CTCL ont permis de décrire leur profil mutationnel, que nous détaillerons dans d'autres parties. Le rôle de stimulations chroniques a également été documenté. Nous ne développerons pas ici l'implication de certains agents infectieux, qui fait l'objet d'une autre partie, mais plutôt le rôle de l'inflammation, en particulier de l'IL-15, puisqu'il s'agit de l'hémopathie T pour laquelle le rôle de cette cytokine est sans doute le mieux décrit après l'EATL.

De nombreuses cytokines peuvent affecter la prolifération T au cours des différents stades de CTCL (IL-4, 7, 13, 15, 16, 17, 31…)[326-331], mais ont surtout été décrites comme facteurs pro-survie des cellules lymphomateuses, ce qui n'est pas le sujet ici. L'IL-15 en revanche, première cytokine étudiée et révélée comme essentielle à la croissance tumorale *in vitro*, semble maintenant clairement impliquée dans l'initiation des CTCL, en particulier les

MF/SS. La preuve la plus directe provient probablement d'un article de 2016 publié dans *Cancer Discovery*, montrant que des souris transgéniques surexprimant l'IL-15 de manière constitutive développent dans 70% des cas une hémopathie T à tropisme cutané présentant un ensemble de caractéristiques permettant d'affirmer qu'il s'agit de CTCL : plaques d'érythèmes, dermatite, prurit, infiltrat cutané clonal de lymphocytes T de morphologie atypique, dont l'aspect tumoral est démontré par transfert et prise dans des souris receveuses. Les 30 autres % développent une pathologie type T-LGL, point sur lequel nous reviendrons. Deux types de CTCL ont même été observés dans ce modèle, l'un semblant correspondre au MF (développement principalement cutané), l'autre au SS (forme leucémique, plus agressive)[332]. Bien que des niveaux anormalement élevés d'IL-15 soient retrouvés chez l'homme au niveau des lésions cutanées, et que les cellules lymphomateuses soient capables d'en produire pour maintenir leur croissance de manière autocrine[329,332], il n'est pas encore clair quel(s) événement(s) et quels acteurs cellulaires sont responsables de la production anormale d'IL-15 dans un premier lieu. Il semblerait cependant que la dérégulation de cette production puisse être due à des altérations épigénétiques, en particulier une hyperméthylation du promoteur de l'IL-15 au site de fixation du répresseur ZEB1 (également répresseur de l'IL-2). Ceci a pour effet d'empêcher ZEB1 de réguler la transcription de l'IL-15 et induit sa surexpression[332]. D'autre part *ZEB1* fait partie des gènes les plus altérés (muté, délété ou transloqué) dans les CTCL (45-65%, avec mutations bialléliques dans une proportion non négligeable)[333-335]. Cela suggère que la perte de ZEB1 ou l'hyperméthylation du promoteur de l'IL-15 par certaines altérations épigénétiques antérieures (que nous développerons plus bas) seraient des événements précoces de la lymphomagenèse des CTCL menant à la production aberrante d'IL-15.

Il n'y a, à notre connaissance aucune étude montrant l'influence de polymorphismes des gènes de l'IL-15 et de l'IL-15R sur le risque de CTCL, comme cela a pu être fait pour l'EATL ou l'ALL[336,337]. En revanche, une étude sur une cohorte polonaise de 43 patients CTCL semble montrer que certains SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) des gènes de l'IL-2 et 13 seraient des facteurs de risque, et qu'à l'inverse des SNP du TNF-α et de l'IL-10 auraient un effet protecteur[338], ce qui n'a cependant jamais été remontré expérimentalement ou sur d'autres cohortes.

Au delà des rôles directs des cytokines sur la survie et la prolifération des cellules pré-néoplasiques, un certain nombre de voie de signalisation ont également une fonction régulatrice sur l'expression de micro-ARN (miR) clés. L'expression de ces miR a d'ailleurs

un intérêt diagnostic afin de différencier les CTCL de dermatoses bénignes[339]. Par exemple, miR-155 et miR-21, dont l'expression est induite par STAT5 et STAT3 respectivement, ont des effets prolifératifs, et inhibent STAT4. Ils sont retrouvés surexprimés dans les CTCL et participent ainsi à la progression de la maladie, notamment au switch des cellules tumorales d'un profil T_H1 vers T_H2 et la sécrétion de cytokines aux effets autocrines[340,341]. On parle alors d'oncomiR. A l'inverse, les voies Jak3/STAT3 et STAT5 inhibent l'expression du miR-22, un miR ayant des effets suppresseur de tumeur (notamment via PTEN, un suppresseur de tumeur important dans la différenciation T, dont la délétion dans un modèle murin provoque des pathologie type T-ALL[342]) est retrouvé *down*-régulé dans un certain nombre de cancers, dont les CTCL[343]. Autre marque d'une potentielle stimulation chronique, les CTCL expriment certains récepteurs NK, notamment CD158 (KIR3DL2) un marqueur utilisé pour le diagnostic et le suivit des SS[344] ainsi qu'une cible thérapeutique donnant des résultats encourageants[345]. Un Ac cytotoxique (IPH4102) est actuellement en essais cliniques de phase I.

1-1.b-iii) Cas des T-LGL

La leucémie T à grands lymphocytes granuleux (T-LGL) constitue une entité de PTCL généralement classés en 2 catégories : celle émergeant de lymphocytes T ($CD3^+$) à tendance indolente et plus fréquente (85% des cas) et celle émergeant de NK ($CD3^-$), ces dernières représentant les formes les plus agressives et plus fréquentes en Asie (puisqu'associées à EBV). La délimitation exacte de cette hémopathie est délicate dans la mesure où il existe un certain nombre de pathologies proliférative de grands lymphocytes granuleux (LGL), chroniques ou transitoires, poly- ou oligoclonales, réactionnelles à des maladies dysimmunitaires, infectieuses ou tumorales, l'ensemble définissant un continuum clinique avec la T-LGL, qui semble souvent résulter de l'évolution des proliférations à LGL bénignes vers un stade néoplasique dont la clonalité doit être confirmée pour le diagnostic, généralement par PCR. Les leucémies LGL sont pour la plupart des pathologies du sujet âgé et représentent 2 à 5% de l'ensemble des hémopathies lymphoïdes en Europe et Amérique du Sud, légèrement plus en Asie. Elles sont fréquemment associées à une neutropénie, et donc souvent à des épisodes infectieux aggravant la maladie, ainsi qu'a des désordres auto-immuns tels que la présence de facteur rhumatoïde et d'Ac anti-nucléaires (60% et 40% des patients respectivement). Ces éléments sont très probablement impliqués dans la lymphomagenèse. D'un point de vue phénotypique, les T-LGL sont généralement $CD3^+$, $\alpha\beta$, $CD4^-/CD8^+$ (bien que des cas $\gamma\delta$ existent) et présentent des caractéristiques de T activés ($CD16^+$, $CD27^-$,

CD45R0^{-} et CD57^{+}) mémoire (CD45RA^{+}, CD62L^{-}). De manière très intéressante, ces lymphomes sont généralement CD28^{-} et expriment certains marqueurs NK déjà évoqués (CD16 et CD57) mais également CD94 et d'autres KIR comme CD158[346], caractéristiques que nous avons évoqué dans le chapitre précédent et qui correspondent à des lymphocytes T activés chroniquement. Les cellules lymphomateuses expriment également CD122 (IL2Rβ/IL15Rβ) mais pas CD25 (IL2Rα) semblant encore une fois montrer le caractère important de l'IL-15 dans la lymphomagenèse T.

Au delà de ce phénotype T activé, un grand nombre d'arguments vont dans le sens d'une lymphomagenèse provoquée par une stimulation antigénique chronique. La comorbidité avec un grand nombre de pathologies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé ou la thyroïdite d'Hashimoto ont été reportés et suggèrent une implication d'auto-Ag dans l'initiation de la leucémie LGL. La coexistence la plus fréquente est avec le pseudosyndrome de Felty (polyarthrite rhumatoïde + neutropénie + splénomégalie + prolifération LGL), rencontré dans 25% des patients T-LGL[347]. Ne serons pas abordés ici l'implication de certains virus comme le HTLV. De nombreuse études se sont penchées sur l'usage Vβ des cellules de T-LGL afin de mettre en évidence un éventuel biais d'usage ainsi qu'une redondance dans les séquences de CDR3, ceci dans le but de prouver que le lymphome pourrait émerger à partir de la stimulation par un Ag commun. Cependant, les résultats sont contradictoires. Certaines études tendent vers un biais de répertoire en faveur de Vβ2 et 3[348] ou Vβ13.1[349], ou encore Vβ6 uniquement dans un contexte de polyarthrite rhumatoïde[350], alors que d'autres n'ont pas retrouvé de tels biais[351,352]. Deux études plus récentes du répertoire CDR3β par NGS ont montré i) que les clones majoritaires de T-LGL sont uniques et ne semblent par émerger d'un clonotype naturellement surreprésenté dans le répertoire T sain, suggérant un processus de transformation non stochastique et soumis à une forte sélection, probablement via un mécanisme Ag-spécifique[353] ; ii) que très peu de biais de CDR3α et β sont observés pour les T-LGL CD8^{+}, suggérant que diverses sources antigéniques pourraient être à l'origine de la stimulation chronique, alors qu'à l'inverse il existe un biais fort chez les CD4^{+}, entité plus rare qui semble donc avoir une étiopathologie différente[354].

Tout comme pour les CTCL, des niveaux élevés d'IL-15 sont retrouvés chez les patients T-LGL. Or, bien que cette cytokine soit primordiale pour la survie des cellules tumorales, cela ne permet pas d'en conclure son importance dans l'initiation de la pathologie. Nous avons déjà évoqué le modèle murin IL-15 transgénique développant 70% de CTCL de Mishra *et al.*

Il se trouve que les 30% de souris restantes sont atteintes d'une hémopathie type T-LGL[332]. Ce type de pathologie LGL avait déjà été décrit 15 ans auparavant dans un même modèle surexprimant l'IL-15[355]. Les mécanismes de transformation associés ont été élucidés en 2012, de nouveau par Mishra *et al*[356]. Ils montrent dans cet article que l'exposition prolongée *in vitro* à l'IL-15 sur des LGL « normaux » (non tumoraux) induit l'expression de l'oncogène c-Myc (via NF-κB) provoquant la surexpression de la methytransférase DNMT3B (via la répression de miR-29b, un régulateur négatif de DNMT3B), pour finalement engendrer des instabilités chromosomiques. Le transfert dans des souris SCID de ces LGL « normaux » cultivés en présence d'IL-15 induit même le développement d'un lymphome type T-LGL, semblant montrer que l'IL-15 seule est capable de transformer des cellules « saines » (bien que l'article ne précise pas si le transfert de LGL normaux cultivés sans IL-15 induit ou non un T-LGL *in vivo*…).

La pérennisation de l'inflammation passe principalement par les facteurs sécrétés par les LGL eux-mêmes. L'hypersécrétion de FasL, de perforine, de TNF-α et d'IFN-γ sont à l'origine de l'élimination des cellules environnantes et donc des cytopénies fréquemment observées[347,357]. La production majeure d'IL-4 est également la cause de l'activation T_H2 aberrante, génératrice de désordres auto-immuns[358]. Les cellules lymphomateuses échappent à l'apoptose par l'effet de l'IL-15 (ou via des mutations de STAT3 principalement, que nous évoquerons plus tard), ainsi que la sécrétion de Fas soluble permettant ainsi d'éviter l'apoptose induite par Fas[359].

1-1.b-iv) Cas des ALCL associés aux prothèses mammaires

Les ALCL (*Anaplasic Large Cell Lymphoma*) sont une entité rare d'hémopathie T. Certains de ces lymphomes touchent préférentiellement l'enfant et le jeune adulte, et surexpriment pour la plupart la protéine de fusion NPM-ALK (résultat d'une translocation t(2;5)[360] engendrant une activation constitutive de STAT3), alors que d'autres, prédominants chez le sujet âgé sont généralement ALK^- et de moins bon pronostic[361]. Alors que la plupart des lymphomes mammaires sont d'origine B, plusieurs études ont fait part d'une surincidence des ALCL (principalement ALK^-) en cas de port de prothèses mammaires, en particulier quand ces derniers sont en silicone. Depuis le premier cas décrit en 1997 par Keech *et al* de nombreuses études épidémiologiques ont permis d'établir un lien assez clair, publiquement reconnu depuis 2011[362,363] (données FDA), une étude ayant évalué un risque relatif associé aux implants de 18,2[364]. Il semblerait que ces BIA-ALCL (*Breast Implant-Associated* ALCL),

maintenant considérés comme une entité à part entière, soient plus fréquents en cas d'implant à la surface texturées par rapport aux lisses[365]. Il s'agit d'une pathologie souvent indolente, se développant au niveau de la capsule fibreuse entourant l'implant, avec parfois la présence d'une masse, annonciatrice d'un lymphome plus agressif et de pronostic défavorable[366,367].

Bien que l'association soit incontestable, l'étiologie des BIA-ALCL reste encore à démontrer. Les cellules lymphomateuses sont principalement dans la capsule fibreuse ou dans le serome (accumulation tissulaire de sérum) associés à l'implant, sources d'inflammation due au recrutement de macrophage, de fibroblastes et de lymphocytes T, dont la stimulation chronique semblerait à l'origine du lymphome, lui-même exprimant certains marqueurs d'activation ($CD30^+$). La meilleure démonstration du rôle de l'activation T dans la lymphomagenèse des BIA-ALCL repose sans doute sur la régression du lymphome lors du retrait de l'implant, montrant que cette entité semble dépendre de stimuli antigéniques et/ou de l'inflammation générés par l'implant. Cependant dans certains cas le retrait de l'implant n'empêche pas l'évolution de la maladie, suggérant une autonomisation du lymphome[366].

Le rôle du silicone dans la pathogenèse des BIA-ALCL reste débattue. Il s'agit à l'origine d'un matériau considéré comme biologiquement inerte et est utilisé dans un grand nombre de prothèses. Malgré cela, plusieurs cas de maladies auto-immunes, d'adénopathie au silicone et même de cancers ont été rapportés chez des patients équipés de dispositifs en silicone[368-370]. Il existe 2 explications quand à la toxicité du silicone :

- Le silicone serait directement toxique. Des expériences dans un modèle murin ont montré que l'injection sous-cutanée de silicone pouvait induire un plasmocytome[371]. Sachant que du silicone a été retrouvé au niveau des ganglions axillaires dans 90% des femmes ayant des implants[372], il pourrait certainement s'agir d'un mécanisme de maintenance de l'inflammation. En effet, une fois dans les tissus, le silicone favorise la formation de granulome[373] et augmente la production locale d'IFN et de TNF-α, possiblement par son effet adjuvant[374].
- Les produits de dégradation du silicone, comme le siloxane (inducteur de dénaturation protéique), le platine ou des silicates (irritants et inducteurs de fibrose), ont des effets toxiques et sont retrouvés au niveau de la capsule fibreuse [368].

Comme déjà évoqué, la surface de l'implant a également une importance dans la réaction immunitaire engendrée. Une analyse des lymphocytes T intra-capsulaires montre une prédominance de T-$CD4^+$ avec un profil cytokinique pro-inflammatoire T_H1/T_H17[375]. D'autre part, des expériences *in vitro* sur des cellules souches mésenchymateuses de patients BIA-

ALCL mettent en évidence une forte sécrétion de cytokines pro-inflammatoires[376]. Une étude de 2014 sur un modèle porcin montre également que l'infiltrat lymphocytaire T est plus important avec les implants texturés. Cette même étude a de plus mis en évidence chez la femme la formation de biofilms à la surface des implants, la quantité de bactéries étant proportionnel à l'infiltrat lymphocytaire T et B. Il semblerait alors que les implants texturés soient plus propices à la formation de biofilms. La présence de bactéries augmente la réponse inflammatoire, la fibrose et les contractures autours de l'implant[377], ce qui a été confirmé chez les patientes[378]. Le lien de cause à effet entre les biofilm et les contractures capsulaires a été montré dans plusieurs études par la réduction de la fréquence de cette complication lorsqu'un traitement antibiotique est appliqué[379]. Cette notion selon laquelle la présence d'une contamination bactérienne au niveau de l'implant serait responsable de la lymphomagenèse des BIA-ALCL a été principalement étudiée pour *Staphylococcus aureus* et *Rasltonia,* cette dernière bactérie étant retrouvée en plus forte proportion chez les patientes BIA-ALCL comparé à des biopsies de capsules non tumorales, suggérant une possible implication de cette bactérie dans la maladie[380]. Il s'agit d'une protéobactérie Gram négatif parfois impliquée dans des infections nosocomiales[381].

Le lien entre infection, inflammation et contractures paraît à présent assez clair dans les complications de prothèses mammaires. En revanche il n'est pas encore bien démontré quel impact cela a t'il dans l'induction d'ALCL et quel rôle joue le silicone. L'hypothèse la plus probable est que les infections et le silicone (ou ses produits de dégradation) génèrent tout deux une inflammation chronique et donc un terrain favorable à la prolifération puis la transformation des infiltrats lymphocytaires T.

1-1.b-v) Cas des infections chroniques (transformation indirecte)

Nous nous sommes jusque là intéressés principalement aux causes non infectieuses pouvant initier la lymphomagenèse T : Ag non pathogéniques, auto-immunité, inflammation (IL-15)… Etant l'un des postulats de départ de ce travail de thèse, la lymphomagenèse T associée aux infections persistantes sera développée plus en détail ici. Les études épidémiologiques de ces dernières décennies établissant une association entre lymphomes et pathogènes sont nombreuses. Néanmoins les mécanismes biologiques sous-jacents sont encore aujourd'hui mal compris. Avant toute chose, il convient de différencier 2 types de lymphomagenèse infectieuse bien distincts :

- Le premier, de loin le mieux décrypté, est qualifié de « direct » et est généralement associé aux infections virales (EBV, HTLV) qui vont mener à la transformation des

cellules infectées grâce à l'expression intracellulaire d'oncogènes viraux. Étant donné que ce mécanisme ne fait à priori pas intervenir de stimulation exogène mais plutôt des processus oncogéniques intrinsèques propres au virus mis en place chez les cellules infectées, il ne sera pas développé dans cette introduction.

- Le second, décrit plus récemment et beaucoup moins bien caractérisé, est appelé « indirect ». Ce mécanisme est principalement associé aux infections chroniques bactériennes (plus rarement parasitaires ou virales) et fait intervenir plusieurs processus d'inflammation et de stimulation antigénique chronique favorisant la prolifération et finalement l'émergence d'un clone tumoral. L'exemple le plus connu de lymphomagenèse indirecte reste sans conteste le lymphome B du MALT gastrique associé à *Helicobacter pylori*. C'est de ce mécanisme dont il sera question ici.

Il convient donc de s'arrêter sur le cas de *H.pylori* et du lymphome B gastrique tant il représente à présent l'archétype de la lymphomagenèse indirecte. Premièrement, les évidences épidémiologiques de cette association sont nombreuses. Deuxièmement, le lien de causalité est bien démontré depuis 1993, où les premiers travaux ont montré une régression du lymphome par simple traitement antibiotique éradiquant *H.pylori* dans près de 75% des cas[382] (plus faible dans les stades avancés où la tumeur semble s'autonomiser), montrant en plus la dépendance du clone tumoral à la bactérie. D'un point de vue physiopathologique, la composante lymphocytaire T-CD4$^+$ semble primordiale puisqu'elle est spécifique d'Ag de *H.pylori* et apporte une fonction *helper* permettant la prolifération des clones B[383], qui eux ne semblent pas spécifiquement réactifs aux Ag bactériens, mais plutôt polyréactifs, réactivité qui reste encore débattue aujourd'hui[384]. Certains facteurs de virulence bactériens tels que CagA ont également un rôle pro-transformant en favorisant l'inflammation, activant des voies intracellulaires (STAT3, MAPK)[385] ou en diminuant l'adhésion cellulaire[386].

Bien qu'il s'agisse d'une hémopathie B, ce lymphome illustre plusieurs aspects qu'il est intéressant de garder à l'esprit et pourraient dans une certaine mesure être étendus aux PTCL : i) un lymphome initié par une infection chronique peut engendrer sa dépendance vis-à-vis du signal antigénique, nous l'avons déjà évoqué ; ii) cette dépendance peut disparaître à des stades avancés, ce que nous nommons autonomisation (activation devenant constitutive par l'apparition de mutations activatrices *passenger* ?) ; iii) les Ag pathogéniques n'induisent pas obligatoirement la lymphomagenèse directement, mais parfois indirectement via l'activation

d'autres populations cellulaires, pouvant donc rendre caduque la recherche d'un biais de TCR pour prouver l'origine antigénique de la transformation.

Les cas de lymphomes T associés à des infections chroniques sont bien moins documentés que pour les pathologies B et surtout manquent de preuves directes comme pour le lymphome du MALT gastrique, parfois soutenues uniquement par des associations révélées dans des études épidémiologiques ou quelques cas cliniques.

Lymphomes T gastriques

Afin de faire le lien avec le lymphome B du MALT gastrique, il est intéressant de relever un cas de lymphome T gastrique primitif associé à *H.pylori* décrit dans la littérature[387]. Bien que cette association n'aie jamais été retrouvée d'un point de vu épidémiologique[388], la régression du lymphome après éradication de *H.pylori* par antibiotique semble démontrer son implication dans la pathogenèse, d'autant plus que nous avons vu l'importance de la composante lymphocytaire T spécifique dans le lymphome B gastrique.

Lymphomes T cutanés

Il s'agit probablement des lymphomes T pour lesquels le plus grand nombre de pathogènes est soupçonné, sans que pour l'instant aucune étude ne puisse réellement confirmer ou non leur implication. De plus certains résultats restent controversés, et il convient de garder à l'esprit que la présence de certains pathogènes aux niveau de CTCL peut être simplement une conséquence de la dysfonction physique et immunitaire engendrée par le CTCL lui-même. En clair, et cela vaut pour toute question, association ne signifie pas causalité.

De par les manifestations cutanées et systémiques chroniques dont elle est responsable et de sa possible implication dans certains lymphome B cutanés[389,390], *Borrelia burgdoferi*, l'agent responsable de la maladie de Lyme (zoonose émergente transmise par les piqures de tiques), a été étudié afin de tenter d'élucider son implication dans les CTCL. Une étude de 2006 sur une cohorte italienne, basée sur l'amplification par PCR du gène de la flagelline de *Borrelia* sur des biopsies cutanées de *Mycosis Fongoïde*, a reporté la présence de la bactérie dans 18% (15/83) des patients, contre 0% (0/83) chez des personnes saines appariées[391]. Une décennie plus tard, ces résultats ont été confirmés par une seule autre étude, de la même équipe[392]. Une autre étude, italienne encore, (notamment sur 30 MF) semble pourtant les contredire, ne mettant en évidence aucune positivité par PCR dans l'ensemble des biopsies testées[393]. Ces

discordances pourraient s'expliquer par des différences purement techniques (sensibilité des PCR utilisées…). Une étude sérologique récente menée au laboratoire (non publiée) sur un ensemble de patients PTCL ne nous a d'ailleurs pas permis de montrer un historique d'infection à *Borrelia* plus élevé chez les patients (9+/108) que dans notre groupe contrôle (11+/108), bien que le faible nombre d'échantillons de CTCL (12 MF + 5 SS) ne nous permettent pas de conclure de manière définitive. Il existe néanmoins un certain nombre de données biologiques qui nous amènent à soupçonner *Borrelia* d'être capable d'induire des lymphomes T cutanés. L'infection par *Borrelia* est capable d'induire des infections chroniques et une lymphocytose locale. Bien que plus souvent d'origine B, un certain nombre de cas de lymphocytomes T associés à l'*erythema migrans* (manifestation cutanée classique de la borréliose) ont été décrits[394]. Un cas de CTCL particulier (*$CD4^+$ primary cutaneous small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma*) a également été détecté chez un patient souffrant d'un *erythema migrans* chronique[395].

Bien d'autres pathogènes ont été étudiés. C'est le cas notamment de plusieurs virus, principalement HTLV-1, EBV, CMV, polyomavirus, mais l'inconsistance des résultats (sérologie, PCR) ne va pas dans le sens d'un lien clair avec l'étiologie des CTCL.

D'autre bactéries telles que *Chlamydia pneumoniae* ont également été suspectées, mais le rôle de cette dernière n'a une nouvelle fois pas pu être confirmé de par l'existence de publications contradictoires[396,397]. Toutefois, un argument en faveur de son implication est que cette bactérie est capable de synthétiser une protéine mitogène (SAF = *Sézary Activating Factor*), un facteur permettant la prolifération T[397,398], mais depuis, plus aucune étude ne s'est penché sur le rôle de ce SAF…

Bien que le terme n'aie jamais été utilisé pour SAF, il doit sans doute s'agir d'un super-Ag, autrement dit une toxine bactérienne capable d'activer de manière non Ag-spécifique les lymphocytes T en se liant simultanément à la chaine β du TCR et au CMH-II, créant ainsi une interaction forcée entre APC et lymphocytes T. Parmi les bactéries décrites pour sécréter des super-Ag, c'est probablement *Staphylococcus aureus* la mieux caractérisée. En l'occurrence, il s'agit également de la bactérie pour laquelle l'implication dans la physiopathologie des CTCL est la plus reconnue. Au delà d'être une source majeure de morbidité dans les CTCL de par les infections cutanées et systémique qu'elle provoque, *S.aureus* est retrouvée en forte proportion chez les patients CTCL[399]. De plus cette bactérie sécrète des super-Ag (entérotoxines staphylococciques, ou SE), dont l'effet sur les CTCL est indéniable, mais dont le mécanisme d'action n'est pas encore tout à fait clair. SE pourrait soit i) activer directement

les cellules tumorales (ou pré-tumorales dans le cas où l'on considère que SE est l'initiatrice de la transformation) et favoriser leur émergence/expansion[400], soit ii) activer indirectement les cellules tumorales via la liaison de leur CMH-II avec le TCR de cellules T non tumorales qui produisent alors des signaux de prolifération tels que l'IL-2[401].

Dans un cas comme dans l'autre, le rôle étiologique de ces super-Ag n'a toujours pas été démontré. Il s'agit peut-être simplement d'un mécanisme aggravant la pathologie et favorisant l'émergence de certains clones tumoraux déjà installés[402]. Un argument fort en faveur de l'importance physiopathologique des SE est l'existence d'un biais de répertoire Vβ2 chez les patients CTCL porteurs d'un *S.aureus* TSST-1^{+}, un super-Ag provoquant une expansion T-Vβ2^{+}[399]. De plus, la mise en place d'un traitement antibiotique chez des patients CTCL *S.aureus*$^{+}$ résulte en une amélioration des symptômes dans 90% des cas[403]. L'hypothèse de l'existence d'un Ag spécifique à l'origine de CTCL a été écarté de par l'absence d'homologie des régions CDR3 des TCR tumoraux[404], avec bien sûr toutes les précautions qu'il convient de prendre avec ce type de conclusion, chose que nous avons déjà argumenté en se basant sur le modèle lymphome B gastrique/*H.pylori*.

Lymphome T hépatosplénique (HSTL)

L'HSTL est une entité très rare de mauvais pronostic (médiane de survie d'un an), émergeant principalement de lymphocytes Tγδ, survenant principalement chez le jeune adulte, et ayant un tropisme hépatique et splénique concordant avec leur contrepartie lymphocytaire T normale (T-Vδ1^{+}). L'hypothèse du rôle d'une stimulation antigénique chronique *driver* de ce type d'hémopathie repose en partie sur son association épidémiologique avec un contexte d'immunosuppression, souvent associé à des greffes d'organes, pouvant favoriser l'émergence et la persistance de pathogènes. Ainsi, parmi les lymphomes T des patients transplantés (T-PTLD), l'incidence des HSTL peut aller jusqu'à 20%, alors qu'ils représentent moins de 2% des PTCL dans l'ensemble de la population[405,406]. Il a également été rapporté au total 4 cas d'HSTL associés à une splénomégalie palustre hyperactive (SPH), une forme grave d'infection plasmodiale chronique[407-409]. Ce type de complication palustre est principalement caractérisée par une lymphoprolifération B, mais également une prolifération Tγδ périphérique[410,411], et une infiltration T au niveau des sinusoïdes hépatiques, caractéristique commune avec les HSTL, laissant supposer une évolution logique de la SPH vers l'HSTL. Un autre cas intéressant provient de l'émergence d'un HSTL-Vδ2^{+} (chaine utilisée principalement par les Tγδ de la peau et des muqueuses) chez un patient souffrant d'un lupus

érythémateux, montrant une nouvelle fois une concordance entre le sous-type T activé et l'HSTL, et suggérant donc un lien de causalité[407]. Notre équipe se penche actuellement sur le lien qu'il pourrait exister entre l'émergence de CMV chez les patients greffés rénaux et le développement d'HSTL. En effet, il est à présent bien documenté que l'infection par CMV induit une expansion T-V$\delta 2^-$ (principalement V$\delta 1^+$)[217].

Des analyses transcriptomiques récentes réalisées sur des cellules primaires et des lignées d'HSTL ont mis en évidence une surexpression de nombreux gènes de la voie du TCR, laissant supposer l'importance de cette voie, et donc des stimulations antigéniques chroniques dans leur physiopathologie[412]. Cependant, de par la nature de la reconnaissance antigénique des T$\gamma\delta$ que nous avons décrit dans le premier chapitre (non CMH-restreinte, polyréactive), il serait plutôt surprenant de retrouver une homologie de CDR3 même si la pathologie était induite par un Ag bien précis.

Nous avons développé dans notre équipe un modèle de lymphomagenèse initié par stimulation bactérienne chronique. Les injections répétées de bactéries inactivées (*Streptococcus pneumoniae*) dans des souris *p53*$^{-/-}$ montre une incidence accrue de PTCL d'origine NKT (comparé au groupe contrôle) possédant un certain nombre de caractéristiques communes avec les HSTL : tropisme hépatosplénique (avec infiltrats intra-sinusoïdaux), restriction par CD1d, et dérégulation de nombreux gènes de la voie du TCR[413]. En revanche nous avons observé ici une *down*-régulation de la voie TCR, résultat opposé à ceux observés par Travert *et al* dans les HSTL.

En conclusion, mise à part quelques cas cliniques et des arguments biologiques rationnels, il est à l'heure actuelle impossible d'affirmer quelconque rôle étiologique d'infections chronique sur les HSTL.

1-1.c - Les stimulations exogènes comme facteurs de croissance et de survie tumorale

Jusqu'à récemment le rôle du signal antigénique dans la survie tumorale était surtout reconnu dans les hémopathies B. Il est maintenant admis que le BCR est un important facteur de croissance et de survie pour les cellules lymphomateuses, ce qui a mené au développement d'inhibiteurs tels que l'ibrutinib, un inhibiteur de BTK (équivalent d'ITK dans le signal BCR) dont l'efficacité en clinique est déjà très bien établie[414,415]. De plus en plus d'évidences vont dans ce sens pour les lymphomes T.

Bien qu'il puisse y avoir une certaine redondance entre les mécanismes *driver* et ceux permettant la croissance tumorale (notamment de par le mécanisme d'addiction antigénique que nous avons discuté au début de cette partie), nous tenterons ici d'adresser les quelques cas de PTCL dans lesquels ces voies de survie/croissance semblent être une perspective thérapeutique envisageable. De par le continuum physiopathologique (initiation → maintenance) de certains PTCL, nous n'aborderons pas (ou peu) ici les cas d'infections chroniques ainsi que de dépendance à l'IL-15 par exemple. Nous nous baserons pour cela sur le modèle proposé par Wilcox dans sa revue de 2015 parue dans *The American Journal of Hemathology*, qui catégorise alors la lymphomagenèse T selon 3 signaux : le récepteur antigénique (le TCR, signal 1), les molécules de costimulation (signal 2) et les récepteurs cytokiniques (signal 3) avec toutes les voies intracellulaires associées[416].

1-1.c-i) Signal 1 : le TCR

Un grande partie des PTCL maintient une expression du TCR et des sous-unités de CD3, suggérant un rôle fonctionnel maintenu dans les cellules tumorales (à l'exception par exemple des ALCL[417] ou des EATL[418] ou d'autres lymphomes T CD30$^+$ dont l'expression semble mutuellement exclusive du TCR), et qu'elles exploitent ce signal pour leur survie et leur croissance. A titre illustratif, l'expression du complexe TCR/CD3 ainsi que de kinases de la voie TCR (LCK, Zap-70, LAT, ITK) étudiée dans une cohorte de PTCL-NOS et d'AITL montre leur maintenance dans plus de 85% des cas[419]. L'existence d'un signal TCR tonique dans les PTCL n'a pour l'instant pas été montré. Cela implique qu'une source exogène continuerait d'activer le TCR. Or il a été montré que plusieurs cellules du microenvironnement tumoral, principalement les APC, soutiennent la croissance et la survie des cellules lymphomateuses de CTCL via une interaction TCR/CMH[420,421].

Il existe plusieurs modèles murins dans lesquels la dépendance des cellules tumorales au signal a été montrée. Le premier provient d'une étude publiée en 2011, montrant qu'une délétion de Snf5 (un facteur de régulation épigénétique retrouvé muté dans certaines entités de lymphomes T) spécifiquement dans le compartiment T mature induit l'émergence de PTCL CD8$^+$ au phénotype mémoire. Cette étude montre que les cellules tumorales dépendent du signal TCR pour leur survie et prolifération, que ce soit i) *ex vivo* dans des expériences de co-culture avec des splénocytes irradiés et mise en présence d'Ac anti-CD8 ou de cyclosporine A inhibant leur prolifération, ou bien ii) *in vivo* en observant l'absence totale de prise tumorale après transfert dans des souris CMH-I déficientes[422]. Cependant, des données récentes de notre équipe nous poussent à croire que ce type de résultat, obtenu après transfert dans des

souris CMH-KO, est à considérer avec prudence, puisque les molécules CMH-I interagissent avec d'autres récepteurs que le TCR comme les récepteurs NK. En effet nos expériences montrent que des PTCL générés dans un modèle d'activation chronique *p53*$^{-/-}$ ne se développent pas dans des souris receveuses CMH-I ou CMH-II déficientes, indépendamment de leur profil CD4/CD8. L'influence des récepteurs activateurs et inhibiteurs NK est une piste actuellement explorée au laboratoire. Le deuxième modèle montrant cette dépendance TCR/CMH est le modèle de PTCL-NKT *p53*$^{-/-}$ utilisé dans notre équipe[413]. Nous avons montré que leur survie *in vitro* est dépendante du signal TCR par l'utilisation de cyclosporine A, mais également montré l'absence de prise tumorale *in vivo* après transfert dans des souris *CD1d*$^{-/-}$ et un retard de prise tumorale dans les groupes injectés avec de la cyclosporine A ou d'un Ac bloquant anti-CD1d. Un autre modèle murin de lymphome NKT basé sur la délétion de facteurs épigénétiques (TET2/TET3) a été publié très récemment[44]. Bien que le terme de lymphome n'ait pas été utilisé dans cette étude pour une raison qui nous échappe, le caractère tumoral des proliférations NKT observées dans ce modèle est incontestable, puisque transférable dans des souris WT receveuses. De la même manière que nos PTCL-NKT *p53*$^{-/-}$, ces lymphomes ne se développent pas dans des souris receveuses *CD1d*$^{-/-}$, montrant une dépendance au signal TCR pour leur survie.

Hormis cela, la plupart des études concernant la dépendance des PTCL vis-à-vis du signal TCR montrent que celle-ci provient d'événement mutationnels dans la voie. Ceci est également vrai pour les signaux de costimulation (signal 2) et cytokiniques (signal 3), qui feront donc l'objet de la partie 1-2 sur les stimulation endogènes.

1-1.c-ii) Signal 2 : les molécules de costimulation

Très peu de choses sont connues sur le rôle des molécules de costimulation dans la survie tumorale. Une seule étude rapporte que la prolifération *in vitro* de cellules primaires de 3 patients Sézary sur 6 nécessite, en plus d'une activation avec de la PHA, une activation de CD28[423]. ICOS (*Inducible T-Cell Costimulator*) est une autre molécule de costimulation induite après l'engagement du TCR, passant principalement par la voie PI3K/AKT, et dont l'activation est permise par son engagement avec ICOSL à la surface des APC. ICOS est fortement exprimé par les T_{FH} et est nécessaire à leur différenciation et maintenance, notamment via l'induction de Bcl-6. Il est donc retrouvé fortement exprimé dans les AITL[424], mais également dans les CTCL et 50% des PTCL-NOS CD30^{-} [425,426], mais son rôle dans la croissance de ces lymphomes n'a pas encore été exploré. Le seul exemple d'induction de prolifération tumorale par engagement d'ICOS dont nous avons connaissance provient d'un

article montrant son expression dans des lignées d'ALCL-ALK^{+} [426]. Il en est de même pour CD134, un autre facteur de costimulation de la famille des récepteurs au TNF, qui est exprimé par plus de 95% des AITL, mais dont la fonction dans la croissance tumorale reste inconnue[427].

1-1.c-iii) Signal 3 : Les cytokines

Nous avons déjà évoqué l'importance des cytokines dans la lymphomagenèse T, et nous avons plus particulièrement insisté sur le rôle de l'IL-15 dans l'initiation des EATL, des CTCL et des T-LGL. En l'occurrence cette cytokine est également primordiale pour le maintient des cellules tumorales dans ces 3 pathologies, de la même manière qu'elle est indispensable au maintient des T_{MEM}. Le ciblage de l'IL-15 semble prometteur pour le traitement de ces hémopathies. Cependant les premiers tests cliniques sur le T-LGL montrent pour l'instant une efficacité décevante[428].

Au delà de l'IL-15, l'IL-13 (et ses récepteurs) s'est révélée surexprimée dans des biopsies de CTCL et semble être produite par les cellules tumorales. D'après des observations *in vitro*, elle exercerait de manière auto/paracrine un effet pro-survie synergique avec d'autres cytokines T_H2 comme l'IL-4 qui pourrait alors être ciblé d'un point de vue thérapeutique, puisque son inhibition avec des Ac bloquants inhibe la prolifération des cellules tumorales[326,328]. L'IL-32 a également des effets dose-dépendant similaires[429]. D'autres cytokines produites par les cellules de CTCL favorisant la croissance tumorale ont été décrites mais ne seront pas développées ici car faisant intervenir des mécanismes indirects (IL-7, IL-16, IL-17, IL-31…).

En résumé de cette partie sur les stimulations exogènes, il semblerait qu'il y ait régulièrement une redondance entre les voies impliquées dans l'initiation de la pathologie et celles impliquées dans son maintien. Dans le cadre d'une lymphomagenèse associée à une activation chronique, cela va bien dans le sens de la conservation d'une certaine dépendance aux stimuli antigéniques *driver*, comme c'est le cas des lymphocytes T_{MEM} générés par activation chronique. Le second point (dépendance) est évidemment plus simple à mettre en évidence puisque visible dans un PTCL déjà installé, et peut dans une certaine mesure permettre de déchiffrer les mécanismes responsables de l'initiation, qui sont bien plus compliqués à démontrer de par leur caractère rétrospectif, d'où la nécessité de développer des modèles animaux.

Nous avons décrit ici de manière plus ou moins détaillée plusieurs facteurs importants dans la lymphomagenèse associée aux stimulations chroniques. Or il serait réducteur de considérer chaque élément séparément, et il est important de garder à l'esprit que l'émergence d'un lymphome résulte d'un ensemble de mécanismes immunologiques mais également mutationnels que nous allons maintenant adresser.

1-2. Stimulations endogènes

Nous entendons par stimulations endogènes l'ensemble des évènements oncogéniques menant à un dérèglement des voies d'activation T que nous avons déjà évoqué précédemment (signaux 1, 2 et 3). Or, de par les progrès considérables du NGS, un grand nombre de mutations de ces voies ont été récemment découvertes en plus de celles déjà identifiées. La récurrence de ces anomalies génétiques, potentiellement dans un contexte de stimulation chronique, est à notre avis la démonstration d'une certaine sélection d'évènements mutationnels qui, a l'origine, apparaissent de manière stochastique, mais qui confèrent à la cellule pré-tumorale ou tumorale un avantage de survie et/ou proliférative et au final la capacité de s'autonomiser face aux stimuli exogènes.

1-2.a - Signal 1 : le TCR

1-2.a-i) Fusion ITK-SYK

Une des premières translocations récurrentes observées dans les PTCL fut décrite en 2006 par Streubel *et al*[430]. Il s'agit d'une translocation t(5;9)(q33;q22) fusionnant deux protéines : ITK-SYK. SYK est principalement exprimée dans les lymphocytes B présentant une forte homologie avec ZAP70. Elle possède 2 domaines SH2 qui permettent son recrutement au niveau du BCR après liaison de l'antigène, et un domaine kinase permettant la phosphorylation de molécules proximales et la transduction du signal en aval du BCR. ITK est une kinase fortement exprimé dans les lymphocytes T, phosphorylant un ensemble de protéines impliquées dans la voie du TCR (PLCγ) notamment de par à sa co-localisation avec les protéines adaptatrices LAT et SLP76. Cette fusion fut à l'origine identifiée dans 17% (5/30) des PTCL-NOS, pour la plupart possédant un certain nombre de marqueurs T_{FH}, correspondant soit à des AITL encore mal caractérisés à l'époque, ou bien des PTCL « *follicular variant* ». Cependant cette fusion n'est retrouvée que dans de très rares cas d'AITL[431]. Une expression aberrante de SYK dans les PTCL fut confirmée en

immunohistochimie sur une plus grande cohorte, montrant la présence de SYK dans 94% des cas (133/141) avec cependant une absence de fusion ITK-SYK dans la majorité des cas, suggérant une implication de SYK dans la lymphomagenèse T par d'autres mécanismes que sa fusion avec SYK[432]. Cela peut aussi être simplement le résultat d'un manque de spécificité de l'Ac anti-SYK utilisé, étant donné les problèmes de réactivité croisée entre SYK et ZAP70. L'implication de la fusion ITK-SYK dans la lymphomagenèse T fut démontrée en 2010 par 2 modèles murins d'expression d'ITK-SYK distincts qui ont permit de mieux comprendre les mécanismes de transformation mis à l'œuvre[433,434]. Ces 2 modèles montrent que l'expression du transgène ITK-SYK, soit dans le compartiment hématopoïétique, soit dans le compartiment T mature, reproduit la pathologie humaine. Le premier démontre également *in vitro* et *in vivo* la possibilité d'utiliser des inhibiteurs de SYK (curcumine) pour traiter ces PTCL. D'un point de vue mécanistique moléculaire, cette fusion provoque le recrutement de SYK par ITK au niveau des radeaux lipidiques membranaires et ainsi une proximité de SYK avec LAT et SLP76 et donc une activation constitutive de la voie du TCR[435]. L'activation continue qui en résulte est d'ailleurs plus intense qu'une réponse à une activation CD3/CD28. Ce modèle montre par conséquent qu'un signal antigénique fort et continu est capable d'engendrer la transformation des lymphocytes T.

Une fusion ITK-FER, probablement assez similaire à ITK-SYK, été récemment identifiée dans un cas de PTCL-NOS. Fonctionnellement, elle semble elle aussi conférer à la cellule des capacités proliférative augmentées, ce qui fut montré *in vitro* par son expression dans la lignée 293T[436]. Enfin, cette même étude a mis en évidence une fusion IKZF2-ERBB4 dans un autre patient PTCL-NOS. Bien que la fonction de cette fusion n'aie pas été montrée, elle conserve le domaine kinase de ERBB4, protéine qui a récemment été décrite comme surexprimée dans 24% d'ALCL-ALK$^-$ et participant probablement à la lymphomagenèse. En effet, son inhibition *in vivo* (Neratinib) après transfert de cellules de patients dans des souris NSG (*Patient-Derived Xenograft*, PDX) montre un retard partiel de croissance tumorale[437].

1-2.a-ii) GTPases (Ras, Rho…) et molécules associées

Les petites GTPases telles que celles de la famille des Ras et des Rho jouent un rôle clé dans le développement, la sélection et l'activation des lymphocytes T. Ces protéines de 21kDa fixent le GTP, ce qui correspond à leur forme activée, alors capable d'interagir avec d'autres protéines effectrices des voies de signalisation dans lesquelles elles sont impliquées. L'hydrolyse du GTP en GDP confère à la GTPase sa forme inactive. La régulation du passage

de la forme inactive vers la forme active ou inversement est régulées par des GAP (*GTPase activationg proteins*) et des GEF (*GTP exchange proteins*).

L'activation de Ras est indirectement induite par l'activation TCR via PLCγ-1 et va activer plusieurs effecteurs en aval dont les voies PI3K et MAPK. La familles des Rho GTPases est composée de 22 membres, dont les mieux caractérisés sont RhoA, Rac1 et Cdc42. Elles sont principalement impliquées dans le remodelage du cytosquelette en réponse à l'activation TCR/CD28. Parmi les activateurs de Rac se trouve la GEF VAV1, elle même activée par LCK après activation du TCR. VAV1 a également d'autres fonctions GEF-indépendantes, notamment adaptatrice dans la voie du TCR en plus d'être un proto-oncogène.

Des fusions récurrentes de *VAV1* ont été récemment identifiées dans 7% des PTCL (10/148), en particulier dans 11% des PTCL-NOS et des ALCL, mais absentes dans les autres sous-types[436]. Le point de cassure de l'ensemble de ces fusions se trouve au résidu 777, correspondant à un site d'auto-inhibition de VAV1[438]. Il en résulte son activation constitutive favorisant *in vitro* la prolifération et la migration cellulaire par une activation de RAC1, qu'il est possible d'inhiber avec l'azathioprine, un inhibiteur de RAC1[436]. Des mutations somatiques activatrices de *VAV1* ont également été identifiées dans 18% des ATLL[439], rarement dans les AITL[440], et semblent se concentrer en un *hotspot* spécifique de la région SH3 en C-terminal de VAV1, le même domaine perdu lors des fusions décrites dans les PTCL-NOS. Une étude publiée en début d'année rapporte d'autres fusions *de cette protéine* (*VAV1-THAP4*, *VAV1-MYO1F*, et *VAV1-S100A7*) induisant toutes un signal VAV1 (ainsi que de plusieurs facteurs en aval tels que AP1 et NFAT) augmenté une fois transférées dans des Jurkat, de manière indépendante de stimulation TCR (Abate PNAS 2017). Fait surprenant, à l'opposé de toutes ces mutations activatrices de VAV1, les souris *Vav1*$^{-/-}$ âgées développent elles aussi des hémopathies type ATLL[441].

Une mutation très récurrente de *RHOA*, G17V, a été reportée par plusieurs groupes la même année, faisant l'objet de 3 articles parus simultanément dans *Nature Genetics*. Les AITL sont le sous-groupe dans lequel cette mutation est le plus fréquemment rencontrée, allant de 53% à 68% des cas selon les études[442-444], ce qui fut confirmé dans une autre étude plus récente[440]. Cette mutation est également retrouvée dans certains PTCL-NOS, en particulier ceux présentant des caractéristiques T_{FH}. *RHOA* G17V exerce une fonction dominante négative qui semblerait agir par séquestration des GEF, dont les effets biologiques sembleraient être une surexpression de RAC1 et d'autres voies telles que NF-κB[445]. De la même manière que pour les mutations de *VAV1*, le ciblage de RAC1 pourrait être une perspective thérapeutique

intéressante. Une étude plus récente encore menée dans la lignée Jurkat a caractérisé fonctionnellement cette mutation *RHOA* G17V, montrant qu'elle favorise finalement l'interaction de Rhoa avec VAV1, la phosphorylant (ce qui fut confirmé dans les AITL G17V^{+}) améliorant la fonction adaptatrice de cette dernière et donc le signal TCR en aval[446]. Cette même étude a par ailleurs confirmé l'existence d'autres mutations de la voie TCR dans les AITL et les PTCL-NOS (*VAV1*, *PLCG1, CD28, FYN*), et identifié une nouvelle fusion *VAV1-STAP2* dans un AITL mutuellement exclusive avec les mutations de *RHOA*, en faveur d'une redondance d'effet. Cette fusion a pour effet d'augmenter la phosphorylation de VAV1 et de PLCγ1, même sans stimulation du TCR, suggérant qu'elle pourrait autonomiser la cellule tumorale face aux stimulations antigéniques externes. L'ensemble de ces mutations aurait pour effet, tout du moins dans ce modèle Jurkat *in vitro*, d'augmenter l'activation de la voie NFAT, la production d'IL-2 ainsi qu'un enrichissement transcriptomique des voies associées au cytokines et chimiokines.

D'autres mutations de GTPases telles que *PLCG1* ou *KRAS* ont également été identifiées. *PLCG1* est retrouvé le plus fréquemment muté dans les ATLL, les CTCL (21%), les AITL (14-54%) et les PTCL-NOS (46%)[447,448]. L'activation seule de PLCγ1 n'étant pas suffisante pour induire un signal TCR, ce type de mutation confère sans doute un avantage prolifératif dans un contexte de stimulation antigénique. L'oncogène KRAS est muté dans de nombreux PTCL : AITL (27%), MEITCL (50%), HSTL (rare)[440,449,450]. Bien qu'il s'agisse d'un oncogène bien décrit dans d'autres types de cancers, son rôle dans la lymphomagenèse n'est pas connu.

LCK et FYN sont 2 kinases jouant un rôle crucial dans les étapes précoces du signal TCR, incluant la phosphorylation de ZAP70 et de la chaine TCRζ. Elles sont nécessaires à la phosphorylation de VAV1 après engagement du CD28. Une mutation activatrice de *FYN* a été identifiée dans de faible proportion dans les PTCL-NOS, les AITL et les ATLL (3-4%)[444], ainsi que de *LCK* dans un cas d'AITL[440].

1-2.b - Signal 2 : les molécules de costimulation

Plusieurs études récentes ont récemment identifié des mutations activatrices de CD28 dans 9-11% des AITL[440,451,452] et moins fréquemment dans des ATLL et PTCL-NOS. L'étude *in vitro* de 2 de ces mutations les plus fréquentes (D124V et T195P) a montré une activation du signal TCR. D124V confère à CD28 une plus forte affinité pour son ligand, CD86, et T195P (située entre les domaines SH2 et SH3) confère à CD28 une meilleure affinité pour ses molécules adaptatrices intracellulaires et ainsi une activité NF-κB accrue. D'autres mutations de CD28

ont été identifiées dans les CTCL, elles confèrent à CD28 une affinité plus grande pour B7 et ainsi une capacité d'activation des cellules tumorales augmentée[334] et donc sans doute un avantage prolifératif, cependant toujours sous dépendance de signaux exogènes.
Des fusions de CD28 sont également décrites : *CTCL4-CD28*[453,454] et *ICOS-CD28*, rapportées dans plusieurs types de PTCL. *CTCL4-CD28* est présente dans 58% des AITL, 29% des NK/T extranodaux, et 23% des PTCL-NOS, étant donc plus fréquente que les mutations somatiques de CD28, ce qui n'a cependant pas été confirmé dans d'autres études. Bien que le rôle fonctionnel des cette fusion ne soit pas établit, cette étude propose le ciblage de CTLA4 pour le traitement de PTCL porteurs de ce types d'anomalies. La fusion *ICOS-CD28* n'a été rapportée que dans 1 cas d'AITL[451].
Malgré la diversité de ces anomalies, elles semblent toutes converger vers un point : l'activation facilitée voire constitutive de la voie du TCR.

1-2.c - Signal 3 : Les cytokines et voies de signalisation associées

La plupart des cytokines signalisent via la voie JAK/STAT et vont réguler un ensemble de processus cellulaires (différenciation, survie, prolifération…), autant de processus que les cellules tumorales peuvent utiliser à leur avantage. Au delà du rôle des cytokines dans l'initiation et le maintien tumoral que nous avons déjà largement développé, un grand nombre de mutations (principalement activatrices) dans ces voies sont à présent décrites et continues d'être identifiées. Elles permettent aux cellules tumorales de tirer les bénéfices des effets biologiques des cytokines sans nécessiter d'apport exogène des dites cytokines, et ainsi de s'en indépendantiser. Bien que cela soit le sujet d'intenses investigations, il n'est pas encore clair si ces mutations sont des événements initiateurs ou secondaires de la lymphomagenèse.
Sans prendre en compte le caractère exogène (cytokines) ou endogène (mutation activatrices) de sa stimulation, la voie JAK/STAT est activée dans de rares cas ou jusqu'à 86% des PTCL selon les entités. Celle ci est monitorée principalement par l'expression de STAT3 et 5 sous leur forme active phosphorylée (pSTAT) et par tests de l'effet d'inhibiteurs de JAK. En particulier, l'activation des cytokines γc (IL-2, 4, 7, 9, 15, 21), de JAK1/3 et de STAT3/5 ont été retrouvées dans un grand nombre d'entités dont les lymphomes NK/T[455-457], les ALCL-ALK$^+$ et ALK$^-$ [458,459], les T-LGL[460,461] les T-PLL[462-464], les CTCL (SS et MF)[334,465,466], les ATLL[439,467-470], les EATL[471,472], les HSTL[450,473] ou encore d'autres lymphomes γδ [474]…
La plupart de ces surexpressions sont dues à des mutations activatrices, bien qu'elles puissent être retrouvées chez des patients non porteurs de ce type de mutation. Dans le cas de STAT3

ou 5B, une majorité des mutations intervient dans le domaine SH2, domaine régulant la dimérisation et donc l'activation de STAT suivie de sa translocation nucléaire. Ces mutations confèrent alors une phosphorylation augmentée et donc une activité augmentée, c'est à dire une transcription augmentée des gènes cibles. Dans certains cas la mutation seule n'est pas suffisante pour induire la prolifération, mais donne un avantage proliératif aux cellules lymphomateuses dans des conditions d'activation, ce qui fut montré *ex vivo* sur des cellules de patients mais également dans des modèles de lignées cellulaires transgéniques. D'autre part, certaines études rapportent une amplification génique importante de STAT5, par exemple dans 63% des CTCL[334], ce qui n'a cependant pas été détecté dans une autre étude[475]. D'autres mutations, cette fois inactivatrices, ont été détectées dans certains régulateurs négatifs de la voie JAK/STAT tels que PTPN2, muté dans 6% des ALL-T[476,477]. Les SOCS sont d'autres répresseurs de JAK/STAT, retrouvés fréquemment inhibés dans de nombreuses tumeurs. Cependant, son expression semble plutôt inhibée indirectement, par hyperméthylation de son promoteur[474], révélant que la dérégulation de voies clés dans la lymphomagenèse telles que JAK/STAT ne provient pas toujours directement de mutations de cette voie, mais peut être la résultantes de mutations de facteurs épigénétiques que nous développerons dans la partie 2.

Au delà des mutations ponctuelles et des amplifications, la fusion *NMP-ALK* (nucléophosmine-anaplastic lymphoma kinase) est l'un des mécanismes oncogéniques le mieux caractérisé dans les lymphomes T, à tel point qu'il a permis de différencier 2 sous-catégories d'ALCL, les ALK^- et les ALK^+ (ces derniers étant porteurs de la fusion). Cette fusion résulte d'une translocation t(2 ;5). Elle nous intéresse particulièrement ici puisque elle est responsable de dérèglement de la voie JAK/STAT, en particulier une augmentation de pSTAT3. A l'inverse 20% des ALK^- sont porteurs de mutations activatrices de JAK1 et/ou STAT3 aux effets synergiques[458]. Il semble donc exister au sein des ALCL des mécanismes physiopathologiques distincts, mais ayant au final une résultante commune : l'activation de STAT3.

Le fait que des mutations JAK/STAT soient retrouvées largement dans une grande variété de lymphomes T, mais également dans d'autres hémopathies (mutations de JAK2 et hémopathies myéloïdes) et des tumeurs solides, montre à quel point la dérégulation de cette voie semble être un mécanisme pro-oncogénique majeur. Considérant l'ensemble de ces données, le ciblage de ces voies JAK/STAT offre une perspective thérapeutique prometteuse, avec cependant pour réserve des effets indésirables importants.

2) Modifications épigénétiques

Les analyses *whole-genome* ou *whole-exome* de ces dernières années ont permis de révéler de nombreuses altérations de facteurs épigénétiques. Ces facteurs sont cruciaux et permettent la régulation de l'expression génique par modification de la structure de la chromatine, notamment par sa méthylation.

2-1. TET2, DNMT3A et lymphomes T_{FH}

Les protéines TET (TET1, TET2, TET3) sont des methylcytosine dioxygenases responsables de la production d'hydroxymethylcytosine, un élément important des processus de démethylation et donc de régulation épigénétique. TET2 est impliqué dans la régulation négative de l'hématopoïèse[478]. Des mutations de TET2 sont fréquemment observées dans les hémopathies myéloïdes, mais également dans certains PTCL[479], en particulier les AITL (47%) et certains PTCL-NOS (38%), particulièrement ceux au profil T_{FH} (58%)[480]. Ces travaux ont été confirmés par la suite, avec des fréquences encore plus élevées de ces mutations (76-83% des AITL)[443,481]. DNMT3A est une methytransférase également impliquée dans de nombreux mécanisme de régulation épigénétique. Le gène DNMT3A est retrouvé mutée dans environ un tiers des AITL, presque uniquement dans des lymphomes TET2 mutés[443,481]. Des mutations d'*IDH2*, qui n'est pas un facteur épigénétique à proprement parler, mais un régulateur de TET2, sont particulièrement confinées aux AITL et toujours associées aux mutations de TET2. Un *hotspot* particulier (*R172*) a été décrit et semble particulièrement important dans la biologie des AITL, puisque ceux porteurs de cette mutation (IDH2/TET2 double mutant) possèdent un profil unique d'hyperméthylation (sur H3K27me en particulier), responsable de la répression de la voie du TCR notamment. Leur profil transcriptomique est bien distinct des AITL TET2 simple mutant[482].

L'article de Sakata *et al* dans *Nature Genetics* montre également que tous les AITL *RHOA*-G17V^{+} (mutation que nous avons déjà décrite) présentent une mutation de TET2, qui est également présente dans le compartiment hématopoïétique non tumoral[483], suggérant que la perte de TET2 est un événement *driver* très précoce, probablement au niveau des CSH (Cellules Souches Hématopoïétiques), coopérant avec la perte ultérieure, tardive (puisque présente uniquement dans les cellules T tumorales) de RHOA[443]. Ceci fut notamment confirmé expérimentalement dans un modèle murin *Tet2*$^{-/-}$ x *Rhoa*^{G17V}, montrant l'avantage proliferatif conféré aux lymphocytes T-CD4^{+} mutés, après leurs transfert dans des souris

receveuses déplétées en cellules T, ainsi que le développement de lymphomes (à partir de quelques semaines seulement) uniquement dans la condition double-KO[484].

Un bon nombre d'arguments vont dans le sens que ces pertes de TET2 ou de DNMT3A interviennent précocement dans le compartiment CSH. En effet, ces mutations font partie des mutations les plus retrouvées dans le sang de patients souffrant d'hématopoïèse clonale, une pathologie dont la fréquence augmente avec l'âge (jusqu'à devenir inévitable) et associée à un risque plus élevée d'hémopathies malignes. Ce type de mutation est d'ailleurs plus fréquent chez les sujets âgés[485,486], mais peuvent tout de même être détectés très tôt, de manière ubiquitaire, chez des patients sains. De plus, les CSH porteuses de mutations TET2 ou DNMT3A possèdent des capacités d'auto-renouvellement plus élevées[478,487,488]. Cependant la présence de ces mutations n'est pas synonyme de lymphome comme le suggère une étude ayant suivit des personnes porteuses (à bas bruit, mais retrouvée dans l'ensemble du compartiment hématopoïétique) et n'ayant pas développé d'hémopathie particulière[489]. L'hypothèse ayant émergée de ces travaux est que ces mutations, qui semblent s'accumuler avec l'âge, confèrent aux CSH mutées un avantage sélectif face aux CSH natives, engendrant donc parfois une hématopoïèse clonale. Ces clones déjà porteurs de capacités prolifératives supérieures, mais n'étant pas néoplasique pour autant, doivent ensuite acquérir d'autres mutations secondaires (telles que RHOA-G17V), afin de mener au développement d'un lymphome. Ceci pourrait expliquer également pourquoi certains PTCL sont majoritairement des pathologies du sujet âgé.

Plusieurs modèles murins ont permis d'étayer le rôle de TET2 et DNMT3A dans la lymphomagenèse T_{FH}. Le premier modèle *Tet2*-muté (au niveau du domaine catalytique) montre que cette protéine est impliqué dans la régulation de l'hématopoïèse et que les souris *Tet2*-mutées finissent par développer des hémopathies principalement myéloïdes[490]. Le second modèle possède une construction génique particulière basée sur un *gene-trap*, permettant d'obtenir des souris *knockdown* (et non pas *knockout*), avec par conséquent une expression réduite de TET2. Ces souris présentent une évolution lente vers un lymphome type T_{FH} avec une augmentation des T_{FH} spléniques à 40-60 semaines, puis le développement tardif de lymphomes T ($CD4^+$, $PD\text{-}1^+$, $CXCR5^+$) dont le profil T_{FH}-*like* fut confirmé en transcriptomique. Des analyses plus approfondies du profil de méthylation de ces lymphomes montrent une hyperméthylation de l'intron 1 de *Bcl6* (le *master-gene* de la différenciation T_{FH}) associée à sa surexpression[491]. Ce statut hypermethylé de *Bcl6* a récemment été confirmé dans les AITL porteurs de mutations de TET2, ce qui n'est pas le cas dans les lymphomes TET2-WT et/ou IDH2 mutés, démontrant un lien fort entre TET2, BCL6 et lymphomes T_{FH}[492].

Cependant aucune étude n'a démontré un rôle de BCL6 dans la lymphomagenèse des AITL et des PTCL-T_{FH}-*like*. Est-ce-que la mutation TET2 favorise, via la surexpression de BLC6 à laquelle elle semble corrélée, un biais vers la différenciation T_{FH}, qui, associé au potentiel pro-oncogénique de BCL6, favoriserait la transformation des T_{FH} ? Est-ce-que l'acquisition de ce profil T_{FH} est juste un effet collatéral indirect de la perte de TET2 ? Bien que la première solution paraisse la plus séduisante, quels seraient alors les mécanismes impliqués dans la lymphomagenèse T_{FH} dans les lymphomes TET2 non mutés ? La perte de TET2 ayant lieu dans les précurseurs, les leucocytes du microenvironnement des AITL sont donc également TET2 mutés, mais l'impact de cette délétion globale n'est pas encore connu. Le dernier modèle murin TET2, basé sur des greffes sériées de moelle de souris KO pour Tet2 et Dnmt3a, montre que ces anomalies coopèrent dans le développement d'AITL et de T-ALL. Dans ces dernières, les altérations de TET2 et DMNT3A sont responsables d'une hyperméthylation globale du génome, mais également d'une hypométhylation et d'une surexpression de *Notch1*, entrainant une activation de la voie Notch, une voie oncogénique récurrente de ces hémopathies T immatures[493]. DNMT3A est également un gène fréquemment muté dans les T-ALL[494].

Bien que ces mutations de TET2, DMT3A et IDH ait été principalement décrites dans les AITL, elles sont également retrouvées en de plus faible proportions dans d'autres PTCL, comme les CTCL[334,475] ou les EATL[472].

2-2. SETD2 et autres membres de la famille des SET Domain

SETD2 est une histone methytransférase intervenant dans la trimethylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36), favorisant l'expression génique en facilitant l'élongation, l'épissage[495]… Elle permet également une régulation du cycle cellulaire (transition G1/S), l'enclenchement de mécanismes de réparation de l'ADN[496], la méthylation de la tubuline[497]). L'absence de SETD2 empêche la machinerie de réparation de l'ADN de localiser les sites endommagés lors de la réplication de l'ADN, ce qui résulte en une accumulation d'erreurs et une instabilité génomique[496]. Des altérations de SETD2 ont été très récemment identifiées dans les HSTL[450] et les MEITCL (anciennement EATL de type II)[471,472]. Dans les MEITCL, les altérations de SETD2 représentent jusqu'à 92% des cas (13/15), soit par mutations ponctuelles pertes de fonction, soit par perte du locus correspondant. De manière intéressante, ces mutations sont beaucoup plus rares dans les EATL de type I, renforçant la distinction

entre ces 2 entités, émergeants donc sans doute de mécanismes de lymphomagenèse différents. Dans la moitié des cas (7/13), SETD2 est porteur de 2 altérations, parfois touchant les 2 allèles. De cette mutation résulte une hypométhylation de H3K36, probablement cruciale dans la transformation[471]. Ce rôle fonctionnel fut confirmé dans un modèle murins *Setd2*$^{-/-}$, montrant l'importance de cette protéine dans l'ontogénie T, en particulier au niveau du contrôle de différenciation αβ *vs* γδ, l'absence de SETD2 favorisant l'expansion γδ. Cependant ces souris ne développent pas de lymphome, suggérant que d'autres événements oncogéniques sont requis pour mener à la transformation complète[472]. Les HSTL sont la deuxième entité dans laquelle des mutations de SETD2 sont les altérations les plus fréquentes (12/17 soit 71%)[450]. Cette étude montre que la délétion de SETD2 dans une lignée d'HSTL (DERL2) induit des modifications majeures de voies de prolifération et de contrôle du cycle cellulaire, conférant aux cellules mutées des capacités proliférative augmentées.

Une étude de *whole-exome* réalisée sur des CTCL (SS) montre un grand nombre d'anomalies dans plusieurs gènes de l'épigénétique : membres de la famille ARID, protéines impliquée dans le remodelage chromatinien, tels que ARID1A (40% des cas) et AIRD5B principalement, ou encore des membres de la famille SMARC. A elles seules, ces familles de gènes sont retrouvées mutées/délétées dans plus de 90% des SS. D'autres altérations de methytransférase de la famille SETD (SETD1A, SETD1B, SETDB2, SETD6) et de la famille des MLL ont été identifiées et sont présentes dans 68% des SS. Une perte de fonction de NCOR1 (histone déacetylase) ou de KDM6B (histone démethylase) sont également retrouvées dans 45% des cas (délétions, mutations)[333]. Bien que les implications de tous ces facteurs soient parfois connues dans certains cancers, on en sait très peu dans le cadre des PTCL. Mais l'accumulation d'autant d'altérations laisse supposer un rôle important de la dérégulation de la méthylation de l'ADN dans la pathogenèse des CTCL. L'identification de ces anomalies offre cependant des perspectives thérapeutiques intéressantes.

3) Voie p53

La protéine p53, également appelée « gardien du génome », tire son surnom de son implication dans de nombreux mécanismes impliqués dans le maintient de l'intégrité génomique, notamment par la prévention des mutations, via leur détection, l'arrêt du cycle cellulaire, le recrutement de facteurs de réparation, et l'apopotose. p53 est codée par *TP53*,

gène retrouvé muté dans la moitié des cancers. Les personnes porteuses de mutations germinales de *TP53*, une pathologie appelée syndrome de Li-Fraumeni, possèdent un risque accru de développer un cancer.

Comparé à certains cancers, la fréquence de mutations somatiques de *TP53* dans les PTCL paraît relativement faible. Cependant les analyses plus poussées réalisées par NGS ont permis de démontrer que la voie p53 est finalement plus fréquemment altérée que ce qui était soupçonné. En effet, un certain nombre d'études basées majoritairement sur des marquages en immunohistochimie montre souvent une expression aberrante de p53, généralement résultant d'une accumulation de la protéine mutée[498]. Or dans les CTCL, une telle accumulation est plutôt observée dans les stade tardifs, sans que de mutations de p53 ne puissent être mises en évidence, semblant montrer une dérégulation de cette voie d'une manière différente de mutations p53[499]. D'autres études rapportent tout de même des mutations de *TP53* dans 35% des MF avancés[500]. En réalité des études plus récentes basée sur du *whole-exome* et de la CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) montrent que des mutations de *TP53* sont retrouvées plus fréquemment dans des MF de stade avancé et que des délétions de la région 17p contenant *TP53* sont parmi les anomalies plus fréquentes dans les CTCL (45-84%)[501-503]. Ces résultats ont été confirmés par des études à plus grande échelle, montrant encore une délétion de *TP53* dans 93% des échantillons, mais également des délétions de *CDKN2A* (40%), un membre de la voie p53[333,334]. Certains polymorphismes comme P72R sembleraient également conférer une légère prédisposition au MF[504]. D'autres étude rapportent des mutations de p53 et/ou de délétions dans d'autres entités : NK/TCL (17%)[505], MEITCL (33%)[471], EATL (10%)[472], HSTL (10%). Bien que la question n'ait pas été toujours adressée dans ces études, il semblerait que la perte de p53 soit très souvent un marqueur de mauvais pronostic.

Des réarrangements récurrents de la voie p53 ont été décrits dans une petite cohorte de divers PTCL (NOS, ALCL-ALK$^{+/-}$, CTCL). Ces réarrangements affectent *TP53*, *TP63*, *CDKN2A*, *WWOX*, et *ANKRD11* et sont présents dans 67% des PTCL testés. Le réarrangement *TP63* produit une version tronquée de p63 en N-terminal, exerçant alors un effet dominant négatif sur l'inhibition de p53, et donc un effet pro-oncogénique. Cette fusion fut confirmée sur une cohorte de 190 patients, montrant sa présence dans seulement 6% des cas (mais pas dans d'autres cancers), principalement dans les ALCL-ALK^{-} (12,5%, contre 0% dans les ALK^{+}, les AITL ou les MF)[506]. Ces résultats montrent que, possiblement, les mécanismes menant à une dérégulation de p53 sont variés. Cette fusion semble en tout cas avoir une importance fonctionnelle ayant des répercutions cliniques, puisque qu'il s'agit notamment d'un marqueur de mauvais pronostic dans les MF[507] et les ALCL[508].

En conclusion de ce chapitre, nous avons rassemblé dans un même schéma un ensemble de mécanismes impliqués dans la lymphomagenèse, qu'ils soient démontrés ou hypothétiques, en faisant le choix de se focaliser sur les CTCL (**Figure 11**).

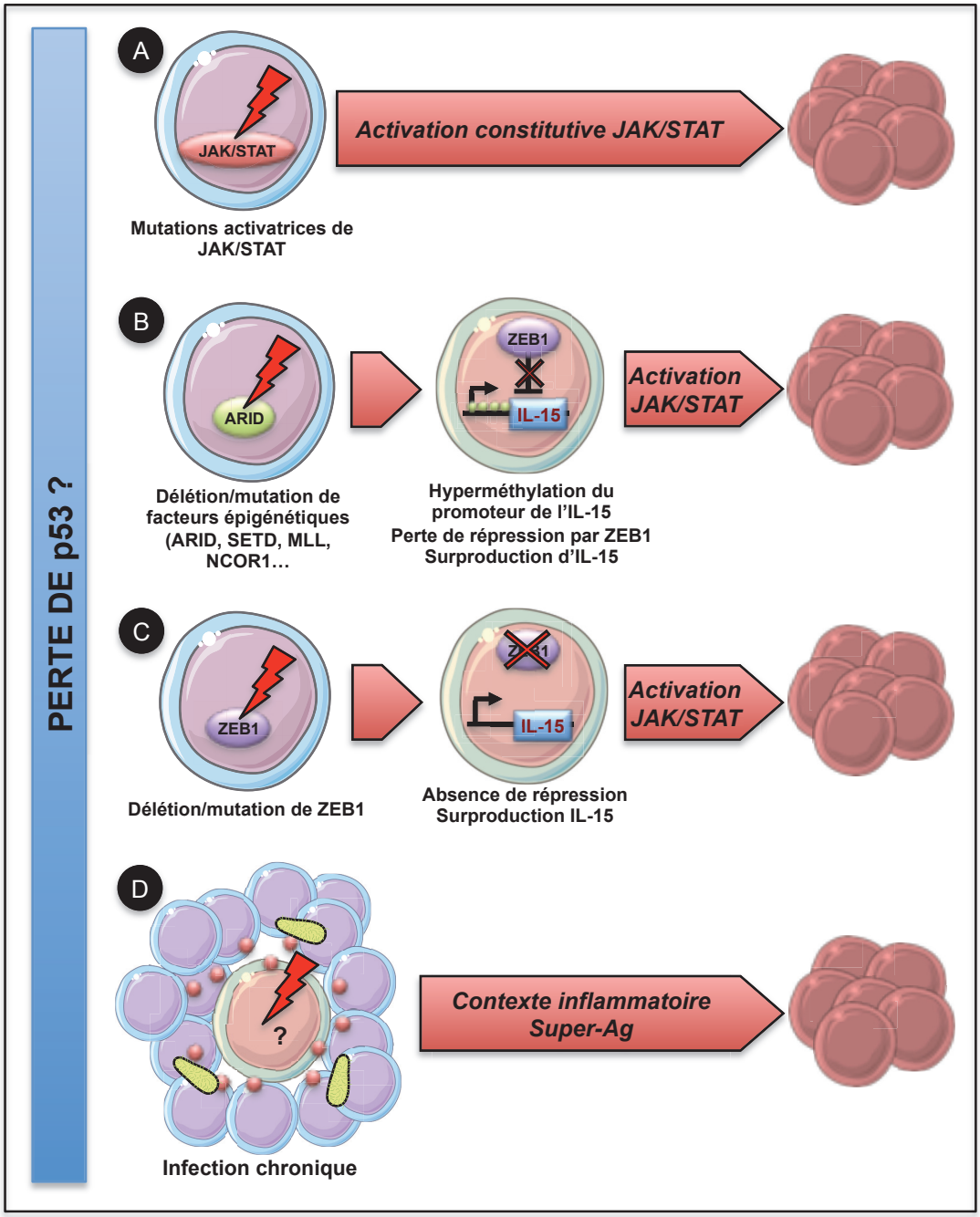


Figure 11 : Représentation schématique de mécanismes physiopathologiques possibles dans des CTCL. La perte de p53 étant très fréquemment altérée dans les CTCL, il pourrait s'agir d'un évènement driver, permettant un environnement permissif à l'accumulation d'autres évènements mutationnels (**A-D**) menant souvent à l'activation des voies JAK/STAT (prolifération, survie…). Ces mécanismes ne sont probablement pas toujours exclusifs.

CHAPITRE C – LES LYMPHOMES T « NON-CONVENTIONNELS »

Nous avons vu tout au long de cette partie introductive la biologie des lymphocytes T dits « non-conventionnels » (ou « *innate-like* ») puis les lymphomes T, principalement au travers des mécanismes physiopathologiques. Nous allons à présent dans ce chapitre tenter de rassembler les 2 aspects de cette introduction sous la thématique des lymphomes T « non-conventionnels », c'est à dire ayant pour cellule d'origine des lymphocytes Tγδ, NKT, ou MAIT. Nous exposerons alors en quoi nous pensons que ces entités plus ou moins connues seraient particulièrement sensibles à certains mécanismes de lymphomagenèse tels que la stimulation antigénique chronique et les modifications épigénétiques.

I – LES DIFFERENTES ENTITES DE LYMPHOMES T « NON-CONVENTIONNELS »

1) Les lymphomes T gamma-delta

Bien que de rares cas de PTCL-NOS, d'EATL, de CTCL ou encore de T-LGL γδ aient été décrits, seulement 3 entités de lymphomes sont considérées comme émergeant de lymphocytes Tγδ : les HSTL ; les PCGDTL (Primary Cutaneous γδ T-cell Lymphoma) et les MEITCL (ex-EATL de type II).

1-1. Les lymphomes T hépatospléniques (HSTL)

Il s'agit d'une entité rare et très agressive (médiane de survie de 1 an) dérivant de lymphocytes T γδ cytotoxiques (plus rarement de αβ[509]). Ces lymphomes étant majoritairement Vδ1[510], le tropisme extranodal (rate et foie, parfois moelle) des ces lymphomes concorde avec la localisation des lymphocytes TVδ1 normaux, principalement retrouvés au niveau du tractus digestif mais également dans la rate, et dans le foie où ils sont par exemple enrichis en cas d'infection par le HCV[221]. Comme nous l'avons évoqué, malgré la rareté des HSTL (moins de 2% des PTCL), ils représentent cependant l'entité T la plus

fréquemment rencontrée chez les patients transplantés (20%). Certains traitements immunosuppresseurs tels que l'infliximab (maladie de Crohn) ou les anti-TNF semblent également augmenter le risque d'HSTL[511,512]. D'un point de vue phénotypique, les cellules sont principalement $CD4^-/CD8^-$ $CD3^+$, bien que la perte de CD3 soit fréquemment observée avec l'expression de marqueurs NK (CD16, CD56, CD57, KIR)[513].
Une isochromosomie 7q ou une trisomie 8 est souvent observée[514,515], suggérant un rôle *driver* important, mais aucune étude n'a à ce jour démontré l'effet fonctionnel de telles altérations.

1-2. Les lymphomes T cutanés γδ (PCGD-TCL)

Ces lymphomes sont des entités très agressives ne représentent que <1% de l'ensemble des CTCL. Il s'agit de cellules au profil cytotoxiques, mais contrairement aux HSTL, ils expriment principalement une chaine Vδ2, similaire donc aux lymphocytes Tγδ présents dans la peau et le sang. Les cellules sont généralement $CD3^+$, $CD4^-CD8^-$ et $CD56^+$. D'un point de vue clinique, ils se caractérisent par des lésions cutanées disséminées, ulcérées et nécrotiques. De par leur rareté, rien n'est connu de leur physiopathologie.

1-3. MEITCL

Anciennement EATL de type II, cette pathologie a été classée à part en 2016, notamment de part son absence d'association avec la maladie coeliaque[270]. Cependant la distinction entre EATL et MEITCL n'est pas évidente. Cette hémopathie est plus fréquente en Asie. Ils sont généralement $CD3^+$, $CD56^+$ [516], et 78% expriment un TCRγ [302].

Une étude de 2015 montre dans une cohorte de 43 lymphomes Tγδ (+3 lignées) que des mutations des STAT5B (N642H principalement) et de STAT3 sont fréquentes (35%)[474]. Il ne s'agit pas d'une incidence très élevée, mais sans doute que la voie JAK/STAT sont importantes dans les hémopathies Tγδ, tout du moins dans une partie d'entre eux.

2) Autres (NKT, MAIT)

2-1. Lymphomes MAIT

A l'heure actuelle, seulement un papier a décrit des lymphomes émergeant de lymphocytes MAIT[517]. Cette étude à l'origine a screené une cohorte de 26 PTCL-NOS et 24 ALCL. 2 cas

de PTCL-NOS se sont révélés positifs pour PLZF en marquage histologique. L'analyse par PCR du réarrangement TCRα de ces 2 lymphomes montre un usage des chaines TRAV1-2-TRAJ33, typiques des MAIT (PCR négative pour TRAV10-TRAJ18 des iNKT).

2-2. Lymphomes NKT/CD1d-restreints

Il n'existe à notre connaissance aucune description de PTCL d'origine NKT chez l'homme. Comme nous l'avons déjà évoqué, la plupart des NKT chez l'homme sont de type II (dNKT) et nous manquons cruellement d'outils afin de les identifier. La recherche de PTCL-NKT humains paraît donc très compliquée à l'heure actuelle. En revanche nous avons dans notre équipe identifié un certain nombre de lymphomes T CD1d-restreints[413]. Il ne s'agit pas là de NKT à proprement parler, mais de Tγδ CD1d-restreints, que nous avons délibérément choisit de regrouper avec les NKT dans une catégorie « lymphocytes T CD1d-restreints ». Nous avons en effet montré un marquage positif de certains PTCL pour le tétramère CD1d-sulfatide, utilisé habituellement pour marquer une fraction dNKT (mais également reconnu par certains T-Vδ1^{+} [174-176]). En accords avec la littérature, l'ensemble des lymphomes positifs pour ce marquage (HSTL, T-LGL) expriment une chaine Vδ1. L'étude de Bai *et al* montre par ailleurs une expansion clonale de ces lymphocytes T-Vδ1 sulfatide-restreints dans le cadre de sclérose en plaque, montrant que ces lymphocytes sont capables de proliférer de manière clonale dans un contexte auto-immun, probablement en réponse à un antigène particulier, ce qui pourrait être le point de départ de l'émergence de clones tumoraux.

La découverte d'une telle restriction par certains PTCL a, à l'origine, émergé de la mise en évidence dans notre équipe de lymphomes iNKT chez les souris *p53*$^{-/-}$ [413], un modèle utilisé depuis une trentaine d'année dans lequel jamais de telles entitées n'avais été décrites. Dans cette étude nous avons montré que ces PTCL-NKT (NKTL) présentent des caractéristiques de NKT chroniquement activés, et que l'injection répétée de glycolipides activateurs des NKT (via l'injection de *Streptococcus pneumoniae*[112] inactivé) augmentait l'incidence des NKTL. De plus ces lymphomes sont dépendants de l'interaction de leur TCR avec le CD1d du microenvironnement pour leur développement et survie *in vivo*, une addiction au signal TCR dont nous avons déjà parlé dans le cadre des lymphocytes T à mémoire générés lors d'une infection virale chronique[295]. Tous ces arguments nous poussent à croire que les infections chroniques peuvent favoriser l'émergence de certains lymphomes T, probablement dans un contexte génétique particulier, permissif à la transformation (ici *p53*$^{-/-}$, mais d'autres altérations que nous avons décrit précédemment comme les facteurs épigénétiques sont

envisageables). Ce travail de thèse correspond principalement à la suite de notre étude sur ce modèle des lymphomagenèse NKT.

II – IMPORTANCE DES FACTEURS EPIGENETIQUES

1) SETD2 et lymphomes Tγδ

Les altérations les plus fréquemment retrouvées dans les HSTL concernent des gènes de l'épigénétiques. SETD2 en particulier est la plus récurrente. Cumulées avec les altérations de INO80, ARID1B, TET3, SMARCA2, TET2 et DNMT3A, elles sont retrouvées de manière quasiment mutuellement exclusives dans environ 70% des cas[450]. Ces mutations sont retrouvées en moindres fréquences dans les autres entités de PTCL et de lymphomes B analysés dans cette étude. D'un point de vue fonctionnel, comme nous l'avons déjà évoqué, SETD2 est une methytransférase d'H3K36 connue pour être impliquée dans différents processus biologiques importants : prolifération, détection/réparation des dommages à l'ADN, notamment via sont interaction avec p53[518,519]. 44% des patients HSTL mutés pour SETD2 présentent plus d'une seule mutation. Ces pertes bialléliques suggèrent un rôle important de SETD2 dans la lymphomagenèse. La suppression de SETD2 *in vitro* dans une lignée d'HSTL (DERL2) par des ARN interférants (shRNA), induit principalement une dérégulation de voies du cycle cellulaire et de la prolifération, et confère aux DERL2 une capacité proliférative 2 fois plus élevée que les DERL2 contrôles.

SETD2 est également l'anomalie la plus récurrente dans les EATL (32%), avec d'autres facteurs épigénétiques (YLPM1, TET2), avec une fréquence tout de même bien plus élevée dans les des EATL de type II (MEITCL), étant retrouvée dans plus de 60% des cas[472], venant confirmer les résultats d'une autre étude ayant montré une perte de SETD2 dans plus de 90% des cas de MEITCL[471].

Il semble donc y avoir un lien étroit entre la perte de SETD2 et l'émergence d'hémopathies Tγδ. Ce lien fonctionnel est renforcé par l'existence d'un modèle murin *Setd2*$^{-/-}$ que nous avons déjà décrit, dans lequel une expansion anormale de Tγδ est observée[472]. L'origine de ce lien n'est cependant pas connue. SETD2 pourrait peut-être être impliqué dans les voies de

différenciation ou d'activation γδ, comme peuvent l'être certains facteurs épigénétiques dans la différenciation NKT, comme nous allons le voir dans la partie qui suit.

2) Id2 et Id3

Les protéines Id (*Inhibitor of DNA binding*) sont des régulateurs transcriptionnels impliqué dans la prolifération et la survie de nombreux types cellules et leur surexpression est impliquée dans différents cancers. A l'inverse, la perte d'Id3 semble impliquée dans la physiopathologie des lymphomes de Burkitt[520]. La première mise en évidence d'un rôle de la perte d'une protéine Id dans la lymphomagenèse T provient d'une étude montrant que les souris *Id3*$^{-/-}$ développent des lymphomes Tγδ, partageant un certain nombre de caractéristiques avec les HSTL[521]. En revanche, l'implication d'Id3 dans la physiopathologie des HSTL semble contredite par l'absence de mutations d'Id3 dans l'étude de McKinney *et al*[450]. Peut-être qu'Id3 est impliqué dans d'autres lymphomes Tγδ trop rares pour être clairement étudiés. Une étude récente menée sur des souris *Id2*/*Id3*$^{-/-}$ a reporté des lymphoproliférations tumorales de type iNKT et d'autres lymphomes CD1d-restreints. De manière intéressante, ces souris semblent présenter un profil transcriptionnel dérégulé déjà au niveau des NKT néonataux, suggérant que cette dérégulation induite par la perte d'Id2 et Id3 prédispose les cellules NKT à la transformation[522].

3) Cas des lymphoproliférations NKT

Nous avons déjà évoqué une étude récente montrant une expansion iNKT dans un modèle murin *Tet2*$^{-/-}$ *x Tet3*$^{-/-}$ (double KO)[44]. Bien que le terme de lymphome NKT n'ait pas été utilisé, le caractère transférable de ces lymphoproliférations dans des souris B6 receveuses ne laisse aucun doute sur leur potentiel malin. Le profil de ces lymphomes présente un biais NKT17 avec une expression aberrante de RORγT^{+} qui pourrait être la conséquence d'une perte de répression par T-bet, associé à une légère augmentation des NKT1 et NKT2 thymiques. De la même manière que les lymphomes NKT de notre étude[413], ces lymphomes ne se développent pas après transfert dans des souris *CD1d*$^{-/-}$, suggérant une prolifération induite par une reconnaissance antigénique. Ce dernier point n'est pas particulièrement adressé dans cet article.

Deux études parue dans *J Exp Med* et *Nature Com* ont également reporté une expansion iNKT thymique et périphérique dans 2 modèles murins *Ezh2*$^{-/-}$ et *Jarid2*$^{-/-}$ conditionnels (système CD4-Cre) respectivement[42,43]. Il s'agit de 2 composants du complexe PRC2, qui régule la méthylation de l'histone H3K27. Dans ces 2 modèles, la déficience en ces facteurs épigénétiques provoque une expansion principalement de NKT2 (stade 2) (IL-4^{+}, CD44^{+}, NK1.1^{-}) associée à une surexpression de PLZF. Il ne s'agit pas ici de proliférations malignes (bien que leur transférabilité ni leur clonalité n'aient à priori pas été testées), mais elle montrent bien l'importance de certains facteurs épigénétiques dans la régulation du développement NKT.

Il est fort probable que les découvertes de telles proliférations de lymphocytes T non-conventionnels dans tous ces modèles (Tet2/Tet3, Ezh2, Jarid2, Id2/Id3, Setd2) aient été fortuites, tout comme dans le modèle p53 que nous avons étudié. Nous n'avons pour le moment pas les éléments nous permettant d'expliquer ce lien fort qu'il semble exister entre lymphomagenèse T non conventionnelle et facteurs épigénétiques. Cependant, considérant l'importance du signal TCR dans la différenciation vers ces différents lignages (NKT, MAIT, Tγδ) notamment via l'induction de facteurs de transcription tels que PLZF, dont l'expression est fortement modulée au niveau chromatinien, il est possible que l'absence de certains facteurs épigénétiques permette une différenciation facilitée vers la voie T non conventionnelle ainsi que des capacités prolifératives augmentées. Par exemple, les NKT immatures (NKT2 principalement) correspondent au stade au cours duquel les NKT possèdent la capacité proliférative la plus élevée[523]. Le maintient aberrant de PLZF, normalement fortement exprimé dans les NKT2, pourrait donc être à l'origine des proliférations anormales observées dans certains de ces modèles. Il semble néanmoins clair que les pertes de ces facteurs ne soient pas équivalentes en terme de potentiel pro-oncogénique.
Bien que les iNKT soient rares chez l'homme il est toutefois surprenant que des hémopathies NKT n'aient toujours pas été décrites. Probablement qu'il existe un certain nombre de PTCL d'origine dNKT, mais ces cellules restent très difficiles à identifier avec les outils actuels.

But du projet

Comme discuté lors de cette partie introductive, les données concernant la lymphomagenèse T associées aux stimulations antigéniques, et plus précisément aux infections chroniques, restent parcellaires et nécessite le développement de nouveaux modèles expérimentaux.

Notre laboratoire a fait récemment la découverte de PTCL d'origine NKT chez la souris. Ces lymphomes présentant des caractéristiques de cellules chroniquement activées, la première question fut de déterminer par quel moyen l'activation chronique induit-elle la lymphomagenèse : Est-ce via l'activation directe du TCR NKT par des glycolipides bactériens, ou bien via un mécanisme plutôt induit par l'inflammation associées à des glycolipides endogènes (activation NKT indirecte) ? De plus, quel rôle joue la flore commensale dans la génération spontanée de lymphomes NKT chez les souris *p53*$^{-/-}$?

D'autre part, nous avons voulu étudier, grâce au modèle *p53*$^{-/-}$, l'implication de pathogènes suspectés pour être associés avec certains lymphomes T chez l'homme mais dont l'association manque de preuves cliniques et expérimentales, tels que *Borrelia burgdorferi*. Nous avons également cherché à caractériser plus précisément cette nouvelle entité de PTCL, en particulier au niveau génomique afin d'identifier d'éventuels événements mutationnels clés de la lymphomagenèse NKT.

RESULTATS

Résumés

Article 1 : Lymphomes T périphérique restreints au CD1d chez la souris et l'homme.

Les lymphomes T périphériques (PTCL) sont une entité de néoplasmes de mauvais pronostic, manquant de traitements efficaces, et dont la physiopathologie demeure largement inconnue. Identifier les mécanismes de lymphomagenèse, ainsi que la cellule d'origine à partir de laquelle les PTCL émergent, est crucial pour le développement de stratégies thérapeutiques efficaces. En plus des lymphomes thymiques bien caractérisés, nous avons mis en évidence que les souris p53$^{-/-}$ développent également des PTCL n'émergeant pas de lymphocytes T conventionnels mais de cellules NKT restreintes au CD1d. Ces PTCL présentent des caractéristiques de NKT activés, telles que la sur-expression de PD-1 et la perte de NK1.1. Des injections de *Streptococcus pneumoniae* inactivé, une bactérie connue pour exprimer des glycolipides activant les NKT, augmentent l'incidence des PTCL, contrairement aux injections d'*Escherichia coli*. Des analyses transcriptomiques révèlent une expression significativement réduite de gènes codant des effecteurs de la voie de signalisation du TCR, une caractéristique classique de cellules T activées chroniquement. Le ciblage du signal TCR dans les PTCL, soit par cyclosporine A, soit par Ac bloquants anti-CD1d, prolonge la survie des souris. Nous avons également identifié chez l'homme des cellules lymphomateuses restreintes au CD1d au sein de PTCL exprimant un TCR Vδ1^{+}. Ces résultats permettent de définir un nouveau sous-type de PTCL, ouvrant la voie au développement d'Ac bloquants anti-CD1d comme perspective thérapeutique chez l'homme.

Article 2 : Jarid2 régule la lymphomagenèse NKT provoquée par l'infection chronique à *Borrelia burgdoferi*.

Borrelia burgdorferi (*Bb*), transmis à l'homme par les piqûres de tiques *Ixodes*, est l'agent responsable de la maladie de Lyme, une zoonose émergente reportée comme étant la maladie vectorielle la plus fréquente de l'hémisphère nord. En dépit de données suggérant que les infections chroniques par *Bb* peuvent engendrer des lymphomes B et T cutanés, aucune preuve formelle n'a pu établir un lien direct entre *Bb* et lymphomagenèse. Ici, nous avons observé que les souris *p53*$^{-/-}$ infectées par *Bb* présentent une incidence augmentée de lymphomes T périphériques (PTCL) émergeant de cellules NKT restreintes au CD1d. La chronicité de l'infection par *Bb* est nécessaire pour le développement des PTCL-NKT. En accord avec ces résultats, les PTCL-NKT présentent un phénotype de cellules NKT activées chroniquement via leur TCR, tel que la surexpression de PD-1, la perte de NK1.1 et la

dépendance de l'interaction TCR/CD1d pour leur survie. En se basant sur l'expression de marqueurs de surface, de facteurs de transcription, et sur leur production cytokinique, ces PTCL-NKT partagent de fortes similarités avec le sous-type NKT2, en dépit d'une dérégulation phénotypique partielle. Le séquençage whole-exome de 6 PTCL-NKT a révélé de larges perte récurrentes dans le chromosome 13, avec une zone minimale de délétion comprenant le gène d'un facteur épigénétique, *Jarid2,* dont la perte fut confirmée dans 92% (22/24) des PTCL-NKT. L'expression ainsi que la fonction de *Jarid2* sont profondément altérées dans ces lymphomes. Nous travaux représentent la première démonstration d'un rôle direct de *Bb* dans la lymphomagenèse T et décrivent l'inactivation de *Jarid2* comme une signature moléculaire des PTCL-NKT.

ARTICLE 1 :

CD1d-restricted peripheral T cell lymphoma in mice and humans

CD1d-restricted peripheral T cell lymphoma in mice and humans

Emmanuel Bachy,[1,2,3,4,5,6,11] Mirjam Urb,[1,2,3,4,5] Shilpi Chandra,[12] Rémy Robinot,[1,2,3,4,5] Gabriel Bricard,[1,2,3,4,5] Simon de Bernard,[13] Alexandra Traverse-Glehen,[7,14] Sophie Gazzo,[8,14] Olivier Blond,[15] Archana Khurana,[12] Lucile Baseggio,[9,14] Tayla Heavican,[16] Martine Ffrench,[9,14] Giuliano Crispatzu,[17] Paul Mondière,[1,2,3,4,5] Alexandra Schrader,[17] Morgan Taillardet,[1,2,3,4,5] Olivier Thaunat,[1,2,3,4,5] Nadine Martin,[18,19,20] Stéphane Dalle,[10,21,22] Magali Le Garff-Tavernier,[23,24] Gilles Salles,[6,11,14] Joel Lachuer,[11,22,25] Olivier Hermine,[26,27] Vahid Asnafi,[28] Mikael Roussel,[29] Thierry Lamy,[29] Marco Herling,[17] Javeed Iqbal,[16] Laurent Buffat,[13] Patrice N. Marche,[15] Philippe Gaulard,[18,19,20] Mitchell Kronenberg,[12] Thierry Defrance,[1,2,3,4,5] and Laurent Genestier[1,2,3,4,5]

[1]CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, 69007 Lyon, France
[2]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1111, 69007 Lyon, France
[3]Ecole Normale Supérieure de Lyon, 69007 Lyon, France
[4]Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, 69007 Lyon, France
[5]Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 5308, 69365 Lyon, France
[6]Department of Hematology, [7]Department of Pathology, [8]Department of Cytogenetics, [9]Department of Cytology, and [10]Department of Dermatology, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon, 69004 Lyon, France
[11]Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, 69007 Lyon, France
[12]Division of Developmental Immunology, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA 92037
[13]AltraBio SAS, 69007 Lyon, France
[14]CNRS, UMR 5239, 69342 Lyon, France
[15]Institut Albert Bonniot, INSERM U823, Université J. Fourier, 38041 Grenoble, France
[16]Department of Pathology and Microbiology, Center for Lymphoma and Leukemia Research, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198
[17]Laboratory of Lymphocyte Signaling and Oncoproteome, Department I of Internal Medicine, Center for Integrated Oncology Köln-Bonn, and Excellence Cluster for Cellular Stress Response and Aging-Associated Diseases, University of Cologne, 50923 Cologne, Germany
[18]INSERM U955 and [19]Université Paris-Est, Créteil 94000, France
[20]Department of Pathology, AP-HP, Groupe Henri-Mondor Albert-Chenevier, 94000 Créteil, France
[21]University Claude Bernard Lyon 1, 69100 Lyon, France
[22]INSERM UMR-S1052, CNRS UMR 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 69003 Lyon, France
[23]Service d'Hématologie Biologique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Sorbonne Universités, UPMC, Université Paris 06 et Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 75004 Paris, France
[24]INSERM U1138, Programmed cell death and physiopathology of tumor cells, Centre de Recherche des Cordeliers, 75006 Paris, France
[25]ProfileXpert, SFR Santé Lyon-Est, UCBL UMS 3453 CNRS-US7 INSERM, 69372 Lyon, France
[26]Institut Imagine, Laboratoire INSERM, Unité Mixte de Recherche 1163, CNRS Équipe de Recherche Laboratoryéllisée 8254, Cellular and Molecular Basis of Hematological Disorders and Therapeutic Implications, 75015 Paris, France
[27]Service d'Hématologie, Faculté de Médecine Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité et Assistance Publique-Hôpitaux de Paris Hôpital Necker, 75015 Paris, France
[28]Université Paris Descartes Sorbonne Cité, Institut Necker-Enfants Malades, INSERM U1151, and Laboratory of Onco-Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker Enfants-Malades, 75015 Paris, France
[29]Rennes University Hospital, Rennes INSERM UMR 917 Faculté de Médecine Université Rennes 1, 35000 Rennes, France

Peripheral T cell lymphomas (PTCLs) are a heterogeneous entity of neoplasms with poor prognosis, lack of effective therapies, and a largely unknown pathophysiology. Identifying the mechanism of lymphomagenesis and cell-of-origin from which PTCLs arise is crucial for the development of efficient treatment strategies. In addition to the well-described thymic lymphomas, we found that p53-deficient mice also developed mature PTCLs that did not originate from conventional T cells but from CD1d-restricted NKT cells. PTCLs showed phenotypic features of activated NKT cells, such as PD-1 up-regulation and loss of NK1.1 expression. Injections of heat-killed *Streptococcus pneumonia*, known to express glycolipid antigens activating NKT cells, increased the incidence of these PTCLs, whereas *Escherichia coli* injection did not. Gene expression profile analyses indicated a significant down-regulation of genes in the TCR signaling pathway in PTCL, a common feature of chronically activated T cells. Targeting TCR signaling pathway in lymphoma cells, either with cyclosporine A or anti-CD1d blocking antibody, prolonged mice survival. Importantly, we identified human CD1d-restricted lymphoma cells within Vδ1 TCR-expressing PTCL. These results define a new subtype of PTCL and pave the way for the development of blocking anti-CD1d antibody for therapeutic purposes in humans.

Correspondence to Laurent Genestier: laurent.genestier@inserm.fr

M. Urb, R. Robinot, and L. Genestier's present address is Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052, Faculté de Médecine Lyon-Sud 165, 69921 Oullins, France.

© 2016 Bachy et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see http://www.rupress.org/terms). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/).

The Rockefeller University Press $30.00
J. Exp. Med. 2016 Vol. 213 No. 5 841–857
www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20150794

Non-Hodgkin lymphoma is a form of cancer that emerges from the transformation of mature B, T, or NK cells. Peripheral T cell lymphomas (PTCLs) represent 12–15% of all lymphoid malignancies in Western countries and include >20 entities that can be grouped according to their presentation as disseminated (leukemic), predominantly extranodal, cutaneous, or predominantly nodal diseases (Swerdlow et al., 2008). Chemotherapy regimens that cure many patients with B cell lymphomas have produced disappointing results in PTCL so far, explaining a dismal prognosis with a 5-yr overall survival rate barely exceeding 30%. Furthermore, compared with the breakthrough achieved by anti-CD20 and BCR pathway inhibitors currently revolutionizing the management of B cell malignancies, no major advances have been made during the last decades in the study of PTCLs, emphasizing the need for innovative approaches.

Identifying the cell origin from which lymphomas arise is a field of intense research and has been fruitfully applied to B cell lymphoma classification (Swerdlow et al., 2008). Unraveling the correlations between B cell lymphoma subtypes and normal B cell development has helped to understand transformation mechanisms, formed the basis for the current classification of B cell lymphomas in humans, and, most importantly, contributed to tailored therapeutic strategies. Such a link between normal T cell developmental stages and the cellular origin in T cell lymphomas is poorly elucidated. Except for angioimmunoblastic T cell lymphoma, whose normal counterpart was identified as follicular helper T cells, the cell-of-origin for most mature T cell malignancy is still a matter of speculation (de Leval et al., 2007). The complexity of the T cell branch of adaptive immunity, encompassing numerous subsets of conventional (restricted by MHC molecules) and unconventional (restricted by MHC-like molecules) T cells (Salio et al., 2014) with effector, memory, and regulatory functions, might explain why PTCLs are still poorly defined.

Among unconventional T cells, invariant natural killer T cells (iNKT cells) represent a peculiar subset exhibiting several unusual properties. First, they express an invariant TCR α chain composed of a rearrangement of Vα14-Jα18, with a conserved CDR3α region generated by the rearrangement (Bendelac et al., 2007). Second, whereas conventional T cells recognize peptide fragments, iNKT cells recognize self-antigens and microbial lipid-containing antigens presented by CD1d, a nonpolymorphic MHC class I–like antigen-presenting molecule (Bendelac et al., 2007). Third, iNKT cells very rapidly produce several effector cytokines and, like innate immune cells, they lack a clear memory response.

Abbreviations used: ALK, anaplastic lymphoma kinase; αGalCer, α-galactosylceramide; CsA, cyclosporine A; GEP, gene expression profile; GO, gene ontology; GSEA, gene set enrichment analysis; H&E, hematoxylin and eosin; HSTL, hepatosplenic T cell lymphoma; iNKT, invariant NKT; MAIT, mucosal invariant T; MFI, mean fluorescence intensity; M-FISH, multicolor fluorescence in situ hybridization; PCA, principal component analysis; PLZF, promyelocytic leukemia zinc finger; PTCL, peripheral T cell lymphoma; PTCL-NOS, PCTL-not otherwise specified; Spn, *Streptococcus pneumonia*; TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase; TL, thymic lymphoma; T-LGL, T cell large granular lymphocyte leukemia; T-PLL, T cell prolymphocytic leukemia.

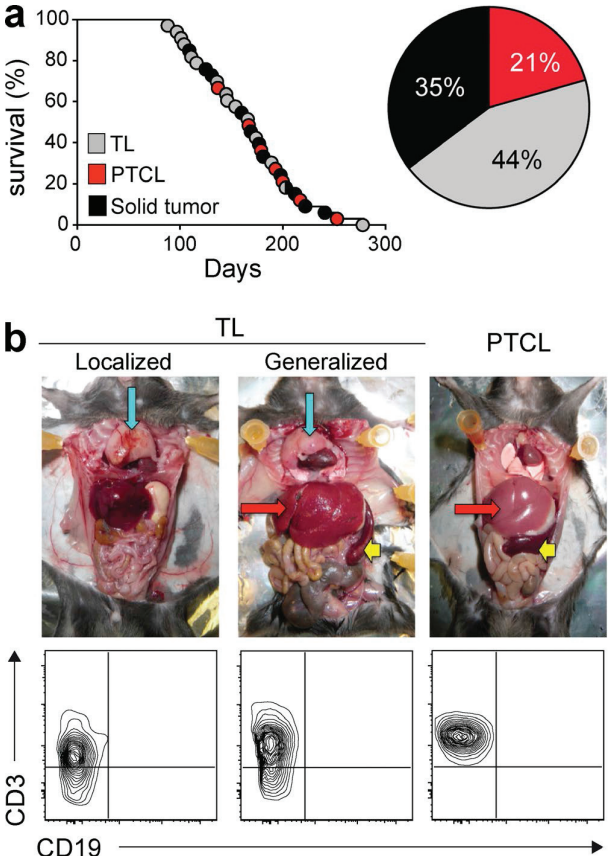


Figure 1. ***p53*$^{-/-}$ mice develop PTCL.** (a) Survival and tumor development spectrum in *p53*$^{-/-}$ mice. Of note, the number of tumors (n = 34) exceeded the total number of mice (n = 33) due to one animal bearing two tumors (i.e., a solid tumor and a lymphoma). (b) Macroscopic and phenotypic characteristics of the three different types of lymphoma encountered in *p53*$^{-/-}$ mice (thymus, blue arrow; spleen, yellow arrow; liver, red arrow). Contour plots were gated on abnormal FSC^{high}/SSC^{high} tumor cells recovered from the thymus for TLs and the liver for PTCLs. Data are representative of at least five different TLs and PTCLs.

Until recently, with the notable exception of anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangement in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma, genetic alterations in most PTCL entities were limited to the description of recurrent chromosomal gains and losses without established clinical and biological relevance (Gaulard and de Leval, 2014). However, the advances in deep sequencing technologies have allowed the discovery of recurrent alterations in several PTCLs. These include the recently described *RHOA* G17V hotspot mutation found in up to 70% of angioimmunoblastic T cell lymphomas (Palomero et al., 2014; Sakata-Yanagimoto et al., 2014; Yoo et al., 2014), sometimes in association with *FYN*, *TET2*, *IDH2*, or *DNMT3A* mutations (Quivoron et al., 2011; Cairns et al., 2012; Couronné et al., 2012). Other genomic abnormalities have also been identified, including rearrangements of the

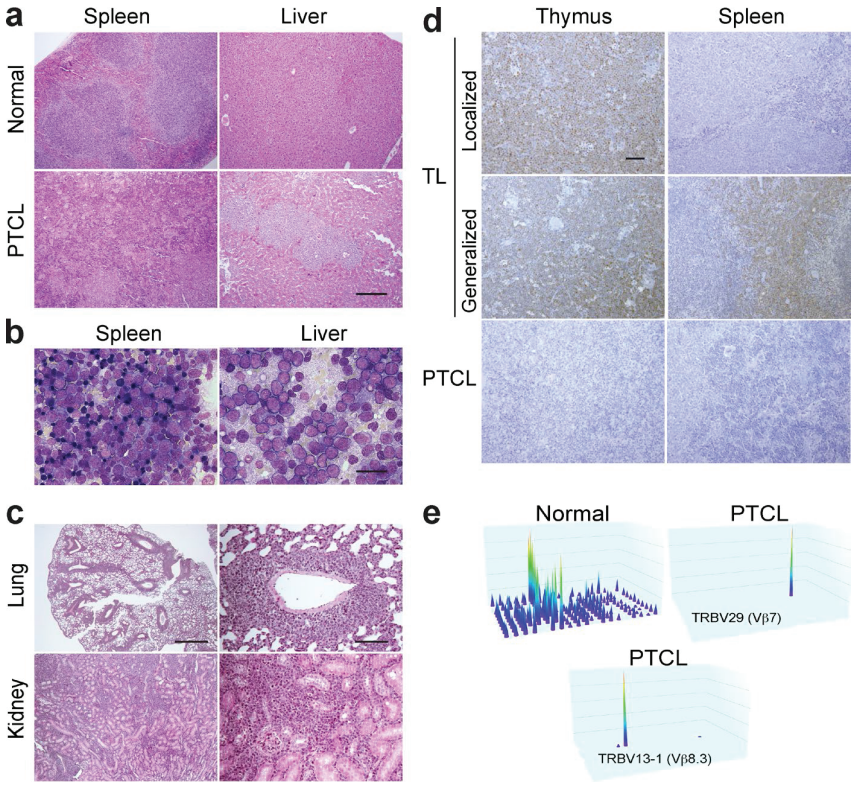


Figure 2. **Histology and clonality of PTCLs.** (a) H&E staining of spleen and liver from normal and PTCL-bearing mice. Bar, 750 µm. Experiments were conducted with five different PTCLs with similar results. (b) H&E staining of spleen and liver appositions from PTCL-bearing mice. Bar, 50 µm. Experiments were conducted with three different PTCLs with similar results. (c) H&E staining of lung and kidney from mice that developed PTCLs. Bars: 500 µm (left); 100 µm (right). Experiments were conducted with five different PTCLs with similar results. (d) TdT staining of formalin-fixed and paraffin-embedded sections from thymi and spleens of representative localized TL, generalized TLs, and PTCLs. Bars, 200 µm. Experiments were conducted with three different PTCLs with similar results. (e) Clonality assessment of the *TRBV* locus (TCRVβ) of spleen cells from one WT mouse and two representative PTCLs mice (out of seven analyzed specimens) by genomic multiplex PCR.

6p25.3 locus, involving *DUSP22* in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma (Feldman et al., 2009); *ITK-SYK* rearrangements in some nodal PTCL-not otherwise specified (NOS; Streubel et al., 2006); and *STAT5B* mutations in hepatosplenic T cell lymphomas (HSTLs; Nicolae et al., 2014). Whole-exome sequencing of cutaneous T cell lymphomas and Sézary syndrome have shown that the most prevalent genetic abnormalities include frequent deletions and mutations in chromatin-modifying genes (*TET2*, *DNMT3A*, and *ARID1A*) and in multiple components of the TCR signaling pathway (*PTEN*, *PLCG*1, *PRKCQ*, *CD28*, and *TNFAIP3*), as well as *TP53* (*p53*) mutations or copy number alterations (Cristofoletti et al., 2013; Vaqué et al., 2014; Choi et al., 2015; da Silva Almeida et al., 2015). Inactivating point mutations of *TP53* are particularly rare in other PTCL, but genome-wide analyses have identified structural rearrangements of at least 1 of 5 *TP53*-related genes in 67% of PTCLs (Vasmatzis et al., 2012). Moreover, the cytoplasmic p53 protein is overexpressed in many digestive, cutaneous, and nodal PTCLs (Murray et al., 1995; Lamprecht et al., 2012; Vasmatzis et al., 2012), evocative of a dysfunctional p53 signaling pathway. However, although 70% of *p53*$^{-/-}$ mice spontaneously develop immature thymic lymphomas (TLs; Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994), little is known about the role of *p53* in mature T cell lymphomagenesis in mice. Although *p53*$^{-/-}$ mice have been used as a model for immature T cell lymphoma for years, we demonstrate that they are also a suitable model for PTCL development, and uncover a new cellular origin for PTCLs with potential therapeutic application.

RESULTS

p53$^{-/-}$ mice develop PTCL

We studied peripheral lymphoma development in *p53*$^{-/-}$ mice. As expected, all *p53*$^{-/-}$ mice were dead after 278 d (median survival = 166 d) and approximately two-thirds of the mice developed T cell lymphoma (Fig. 1 a). As previously demonstrated (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994), most of the mice developed well-known TL (44% of mice) that could be further subdivided into localized TL, where only thymus was macroscopically involved, and generalized TL, where lymphoma cells had spread to liver and spleen (Fig. 1, a and b). However, 21% of mice had massive hepatomegaly and splenomegaly without thymic involvement reminiscent of PTCL (Fig. 1, a and b). In PTCLs, all organs examined (liver, spleen, lung, lymph nodes, bone marrow, and kidney) were characterized by a polymorphic infiltrate of predominantly large cells (Fig. 2, a–c). The architecture of spleen and liver from PTCL mice was nodular and diffuse, with massive cell infiltration leading to the effacement of the normal structure (Fig. 2 a). Negative terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) staining was observed across all samples analyzed, regardless of the organ (thymus, spleen, liver, lymph node, lung, and kidney), as opposed to a strong positive staining in all TLs examined (Fig. 2 d), confirming the post-thymic or mature

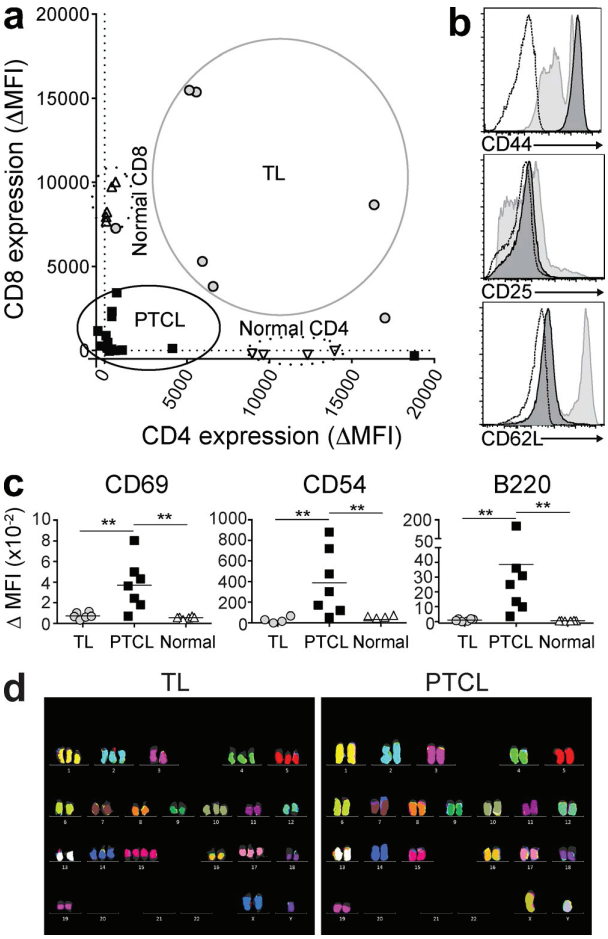


Figure 3. **PTCLs in *p53*$^{-/-}$ mice exhibit features of activated memory-phenotype T cells.** (a) Co-receptor expression in PTCLs compared with TLs, normal CD4$^+$, and CD8$^+$ splenic T cells. (b) Surface staining of PTCLs compared with normal splenic T cells (dark gray shaded histograms indicate PTCLs; light gray shaded histograms indicate normal splenic T cells and dotted lines indicate isotype controls). This staining is representative of all seven PTCLs tested. (c) Expression of activation surface markers in PTCLs compared with TLs and normal splenic T cells. P-values were determined by Mann-Whitney *U* tests. **, $P < 0.01$. (d) Representative M-FISH images of TLs ($n = 2$) and PTCLs ($n = 3$).

origin of these PTCLs. We also demonstrated clonality of the PTCLs using assessment of the variable region of the TCR β chain (*TRBV*) locus by genomic multiplex PCR (Fig. 2 e).

PTCLs exhibit features of activated memory T cells

Compared with TL and normal CD8$^+$ or CD4$^+$ T cells, all PTCLs had decreased expression of the CD4 and CD8 co-receptor molecules, with most of them being double negative (Fig. 3 a). PTCLs were also CD44^{hi}CD25$^-$CD62L^{lo}, which suggests an effector–memory T cell phenotype (Fig. 3 b). These staining patterns were consistent across the different organs involved, including spleen, liver, blood, lymph node, and bone marrow (unpublished data). Activation markers, such as CD69, CD54, and B220 (Renno et al., 1998), were significantly up-regulated in PTCLs (Fig. 3 c) compared with TLs and normal T cells. Finally, cytogenetic alterations of PTCLs were examined using multicolor fluorescence in situ hybridization (M-FISH). In sharp contrast to the well-documented aneuploidy observed in TLs (Liu et al., 2004) and to the two TLs that served as positive controls in our study, no clonal translocation or chromosomes number alterations were observed in PTCLs (Fig. 3 d), giving strong support to a distinct pathophysiological transformation process leading to this type of tumor.

PTCLs originate from invariant NKT (iNKT) cells

Clonality studies of PTCLs revealed a striking Vβ repertoire usage bias with five PTCLs expressing the Vβ7 chain and two the Vβ8 chain (Fig. 2 e and Table 1). Given the strong Vβ8, Vβ7, and Vβ2 repertoire bias that characterizes mouse iNKT cells (Lantz and Bendelac, 1994; Godfrey et al., 2004), we hypothesized that PTCLs might derive from the transformation of these cells. Indeed, a positive staining with CD1d-α-galactosylceramide (αGalCer) tetramer, a specific marker for iNKT cell detection, confirmed this hypothesis (Fig. 4 a). In addition, the transcription factor promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF or ZBTB16), which directs the effector program of the iNKT cell lineage, was significantly expressed in these PTCLs (Fig. 4 b). The iNKT cellular origin of PTCLs was further validated by the expression of the invariant Vα14-Jα18 rearrangement of the TCR Vα chain repertoire (Fig. S1). Functionally, iNKT cells are known to rapidly produce high levels of Th1, Th2, or Th17 cytokines upon activation (Kronenberg, 2005; Coquet et al., 2008). All PTCLs expressed IFN-γ and IL-17, either spontaneously or upon activation, but failed to produce IL-4, thereby displaying a Th1 and Th17 cytokine profile (Fig. 4 c). Similar to their normal iNKT cell counterparts (Matsuda et al., 2002), PTCLs expressed CD122 and CD127 and were highly dependent on IL-15 and -7 for their survival in vitro (Fig. 4 d). Finally, PTCLs were characterized by up-regulation of PD-1 and loss of NK1.1 expression, which are all features of activated or anergic iNKT cells (Fig. 4 e; Wilson et al., 2003; Chang et al., 2008). Consistent with the state of anergy, no proliferation, either by [^{3}H]-thymidine incorporation or Cell Trace Violet dilution, could be observed after ex vivo stimulation of PTCLs with anti-CD3/anti-CD28–coated beads or by PMA plus ionomycin in the presence of IL-7 (unpublished data). All these data demonstrate that iNKT cells are the cell-of-origin of these PTCLs, and support a transformation from an activated cell.

Chronic TCR stimulation drives iNKT cell lymphomagenesis

Because PTCLs expressed features of activated iNKT cells, we explored whether deliberate activation of iNKT cells with repeated injections of heat-killed *Streptococcus pneumonia*

Table 1. **Characteristics of PTCL in p53-deficient mice injected with PBS or bacteria**

No.	Injections	p53 genotype	TCR	Vα/Vδ chain[a]	Vβ/Vγ chain[a]	Co-receptor	CD1d-tetramer binding[b]	PLZF[b]
1	PBS	–/–	αβ	iVα14	Vβ8.2	DN	+	+
2	PBS	–/–	αβ	iVα14	Vβ7	DN	+	+
3	PBS	–/–	αβ	iVα14	Vβ7	DN	n.d.	n.d.
4	PBS	–/–	αβ	iVα14	Vβ7	DN	+	+
5	PBS	–/–	αβ	iVα14	Vβ7	$CD8^{lo}$	n.d.	n.d.
6	*Spn*	–/–	αβ	iVα14	Vβ8.2	$CD8^{lo}$	+	+
7	*Spn*	–/–	αβ	iVα14	Vβ8.3	DN	+	+
8	*Spn*	–/–	αβ	iVα14	Vβ7	DN	n.d.	n.d.
9	*Spn*	–/–	αβ	iVα14	Vβ8.2	$CD8^{lo}$	n.d.	n.d.
10	*Spn*	–/–	αβ	iVα14	Vβ8.2	$CD8^{lo}$	n.d.	n.d.
11	*Spn*	–/–	αβ	iVα14	Vβ8.2	$CD8^{lo}$	+	+
12	*Spn*	–/–	αβ	iVα14	Vβ8	CD4	+	+
13	*Spn*	+/–	αβ	iVα14	Vβ8.3	DN	+	+
14	*Spn*	–/–	γδ	Vδ6.3	Vγ1.1	DN	–	+
15	*Spn*	–/–	γδ	Vδ6.3	Vγ1.1	DN	–	+
16	*Spn*	+/-	γδ	Vδ6.3	Vγ1.1	DN	n.d.	n.d.
17	*E. coli*	–/–	αβ	iVα14	n.d.	DN	+	n.d.
18	*E. coli*	–/–	αβ	iVα14	n.d.	$CD8^{lo}$	+	n.d.
19	*E. coli*	–/–	αβ	iVα14	n.d.	$CD8^{lo}$	+	n.d.
20	*E. coli*	–/–	αβ	iVα14	n.d.	DN	+	n.d.
21	*E. coli*	–/–	αβ	iVα14	n.d.	DN	+	n.d.
22	*E. coli*	–/–	αβ	iVα14	n.d.	DN	+	n.d.
23	*E. coli*	–/–	αβ	iVα14	n.d.	CD4	+	n.d.
24	*E. coli*	–/–	αβ	iVα14	n.d.	DN	+	n.d.
25	*E. coli*	–/–	αβ	iVα14	n.d.	CD8lo	+	n.d.
26	*E. coli*	–/–	αβ	iVα14	n.d.	n.d.	+	n.d.
27	*E. coli*	–/–	αβ	iVα14	n.d.	n.d.	+	n.d.
28	*E. coli*	–/–	γδ	Vδ6.3	Vγ1.1	DN	–	n.d.

[a]Vα/Vγ and Vβ/Vδ chains were determined using either antibody staining and flow cytometry analysis or RT-PCR and nucleotide sequencing of CDR3; iVα14 corresponds to the invariant Vα14 described in iNKT cells.
[b]Assessed by flow cytometry analysis, after fixation and permeabilization for PLZF intracellular staining.

(*Spn*), a bacteria known to express glycolipid antigens that activate iNKT cells through TCR stimulation (Kinjo et al., 2011), could increase the incidence of PTCLs in $p53^{-/-}$ mice. As controls, we chronically injected $p53^{-/-}$ mice with either PBS or heat-killed *Escherichia coli* that do not express iNKT cell antigens. In $p53^{-/-}$ mice, no difference, both in terms of survival or incidence of solid versus hematopoietic tumors, was observed between the PBS-injected group and the *E. coli*– or *Spn*-injected experimental groups (Fig. 5 a). Repeated *Spn* injections shortened survival of $p53^{+/-}$ mice ($P = 0.0045$) by accelerating the development of solid tumors ($P = 0.007$; Fig. 5 a). Importantly in $p53^{-/-}$ mice, PTCLs, unlike other lymphoma subtypes, were overrepresented in the *Spn*-injected group compared with the PBS- and *E. coli*–injected groups ($P < 0.05$; Fig. 5 b). Moreover, although PBS-injected $p53^{+/-}$ mice did not develop PTCLs, chronic injection of heat-killed *Spn* significantly promoted PTCL development in these mice as well ($P = 0.01$; Fig. 5 b). The iNKT cellular origin of these PTCLs was confirmed by CD1d-αGalCer tetramer staining, PLZF expression, and invariant Vα14-Jα18 TCR rearrangements (Table 1). PTCLs expressing Vγ1.1 and Vδ6.3 TCR, a previously reported population of γδ NKT cells (Lees et al., 2001), also arose in *Spn*-injected mice (Table 1).

We next compared the gene expression profile (GEP) of freshly isolated and sorted TLs and PTCLs with normal T and iNKT cells purified from $p53^{-/-}$ mice (either resting or ex vivo activated). Using unsupervised hierarchical clustering, we confirmed that PTCLs were distinct from TLs (Fig. 5 c). Two different clusters were observed that discriminated normal resting T cells, activated T cells, and resting iNKT cells (cluster 1) from tumor cells (cluster 2), with the exception of normal activated iNKT cells that clustered very close to PTCL samples (Fig. 5 c). Thus based on their GEP, PTCLs shared strong similarities with normal activated iNKT cells. To look in more detail at what genes might distinguish PTCLs from normal resting iNKT cells, we performed gene set enrichment analyses (GSEA; Subramanian et al., 2005) using annotated gene sets from the Molecular Signatures Database (Liberzon et al., 2011). Notably, there was a significant down-regulation of genes in the TCR signaling pathway (FDR q-value, 0.011), a phenomenon previously reported in chronically TCR-stimulated T cells (Fig. 5 d). In particular, *CD247* (CD3ζ), *LCK*, and *LAT*, genes known to be down-regulated upon repeated stimulations arising in a context of chronic infection, autoimmunity and inflammation (Baniyash, 2004), were found

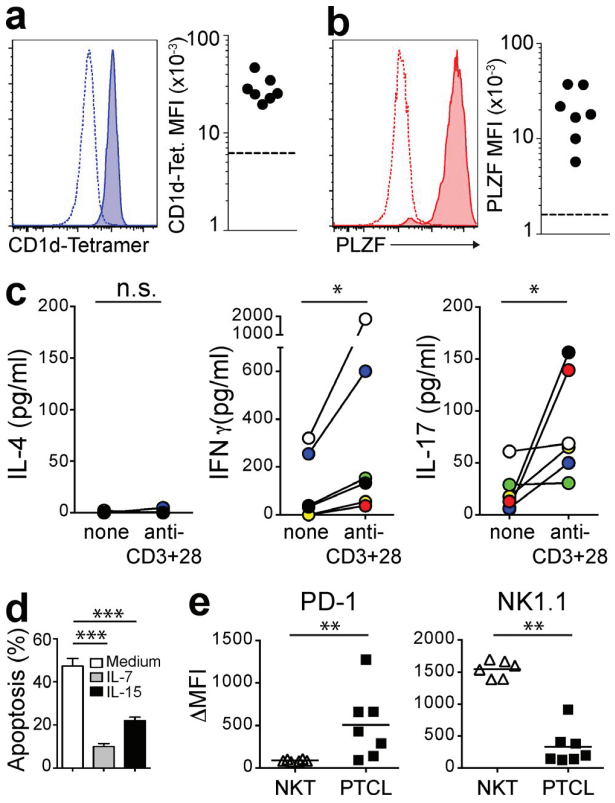


Figure 4. **PTCLs are derived from iNKT cells.** (a) A representative flow cytometry histogram of PTCLs stained with CD1d-αGalCer tetramers is depicted on the left (shaded histogram indicates CD1d-αGalCer tetramer and dashed line represents CD1d-empty tetramer). Sequential gating on abnormal FSC^{high}/SSC^{high} and CD3^{+}Thy1.2^{+} tumor T cells was performed. MFI of CD1d-αGalCer tetramer stainings for different PTCLs are represented on the right. Dotted line represents the highest MFI of CD1d-empty tetramer staining. (b) A representative flow cytometry histogram of intracellular PLZF staining of PTCLs is depicted on the left (shaded histogram indicates PLZF and dashed line isotype control). MFI of PLZF staining for different PTCLs is represented on the right. Dotted line represents the highest MFI of isotype control staining. (c) Cytokines secretion of different PTCLs cultured in the presence or absence of anti-CD3ε- and anti-CD28-coated beads for 24 h. Each color corresponds to one PTCL for IL-4, IL-17, and IFN-γ secretion. P-values were determined by Wilcoxon matched-pairs signed rank test. *, $P < 0.05$ and ns, nonsignificant. (d) Mortality measured by Annexin V staining after culture for 24 h of iNKT lymphoma cells in the absence or presence of IL-7 (10 ng/ml) or IL-15 (10 ng/ml). Data are shown as mean ± SD of one PTCL in quadruplicate and are representative of four experiments performed with different PTCLs (***, $P < 0.001$). (e) Surface expression of PD-1 and NK1.1 in different PTCLs compared with normal iNKT cells. P-values were determined by Mann-Whitney *U* tests. **, $P < 0.01$.

underexpressed compared with normal resting iNKT cells (Fig. 5 e). Furthermore, genes up-regulated by c-Myc were significantly overexpressed (FDR q-value, 0.036) in PTCLs as compared with normal resting iNKT cells (Fig. 6, a and b). *MYC* expression was also significantly up-regulated in PTCLs compared with NKT cells, but more importantly, compared with TLs (Fig. 6 c; $P < 0.05$, Mann-Whitney). Expression of *MYC* is known to be up-regulated after ligation of TCR-CD3, as well as after stimulation with PMA and ionomycin (Lindsten et al., 1988), and is required for TCR-induced proliferation (Guy et al., 2013; Wang et al., 2013). MYC signature was the second most significantly enriched signature when the whole oncogenic (i.e., C6 Molecular Signatures Database) database from the Broad Institute was queried (unpublished data). Together with the down-regulation of genes in the TCR pathway upon chronic stimulation, *MYC* overexpression supports the hypothesis that cell proliferation is mediated by the activation of TCR pathway in PTCLs.

PTCLs survival depends on TCR–CD1d interactions

A key property of memory T cells generated after acute infection is their ability to persist without antigen encounter (Kaech et al., 2002; Wherry and Ahmed, 2004). Similarly, normal iNKT cells persist in vivo in the absence of TCR–CD1d interactions (Matsuda et al., 2002; Vahl et al., 2013). Conversely, during chronic infections, such as human immunodeficiency virus or hepatitis C virus infections, the survival of antigen-specific memory T cells relies on the persistence of cognate antigens through repeated TCR engagements (Shin et al., 2007). Whether this also applies to chronically activated iNKT cell survival is unknown. To investigate the role of TCR signaling in PTCL survival, we first used cyclosporine A (CsA), a calcineurin inhibitor known to strongly suppress TCR signaling. The viability of PTCL was reduced in a dose-dependent manner i*n vitro* (Fig. 7 a). Furthermore, the in vivo administration of CsA significantly increased the survival of wild type (WT) recipient mice transferred with PTCLs (Fig. 7 b), suggesting that PTCL survival partly relies on TCR signaling pathway. To examine the importance of CD1d-mediated TCR engagement, we transferred PTCLs into *Cd1d*$^{-/-}$ recipient mice. All *Cd1d*$^{-/-}$ mice transferred with PTCL survived whereas WT mice did not (Fig. 7 c), suggesting that TCR engagement by CD1d-glycolipid complexes is also a requisite for PTCL survival. On the contrary, CD1d-unrestricted TL did not require TCR–CD1d interaction for survival (Fig. 7 d), thus demonstrating that PTCLs is truly CD1d dependent.

Having established that interrupting the CD1d–TCR interaction is detrimental for PTCL survival, we next evaluated the therapeutic potential of in vivo administration of a blocking CD1d mAb. PTCL cells were transferred into WT C57BL/6 syngeneic recipient mice, followed by blocking CD1d mAb injections twice a week from day 1 (i.e., at the day of PTCL transfer) or day 21 (i.e., at the appearance of the first clinical signs of lymphoma engraftment) until animals had to be sacrificed. Treatment of PTCL-bearing mice with the blocking CD1d mAb, but not with its IgG1 isotype control, delayed PTCL development and significantly increased mouse survival, regardless of the start of the injection (Fig. 7, e and f).

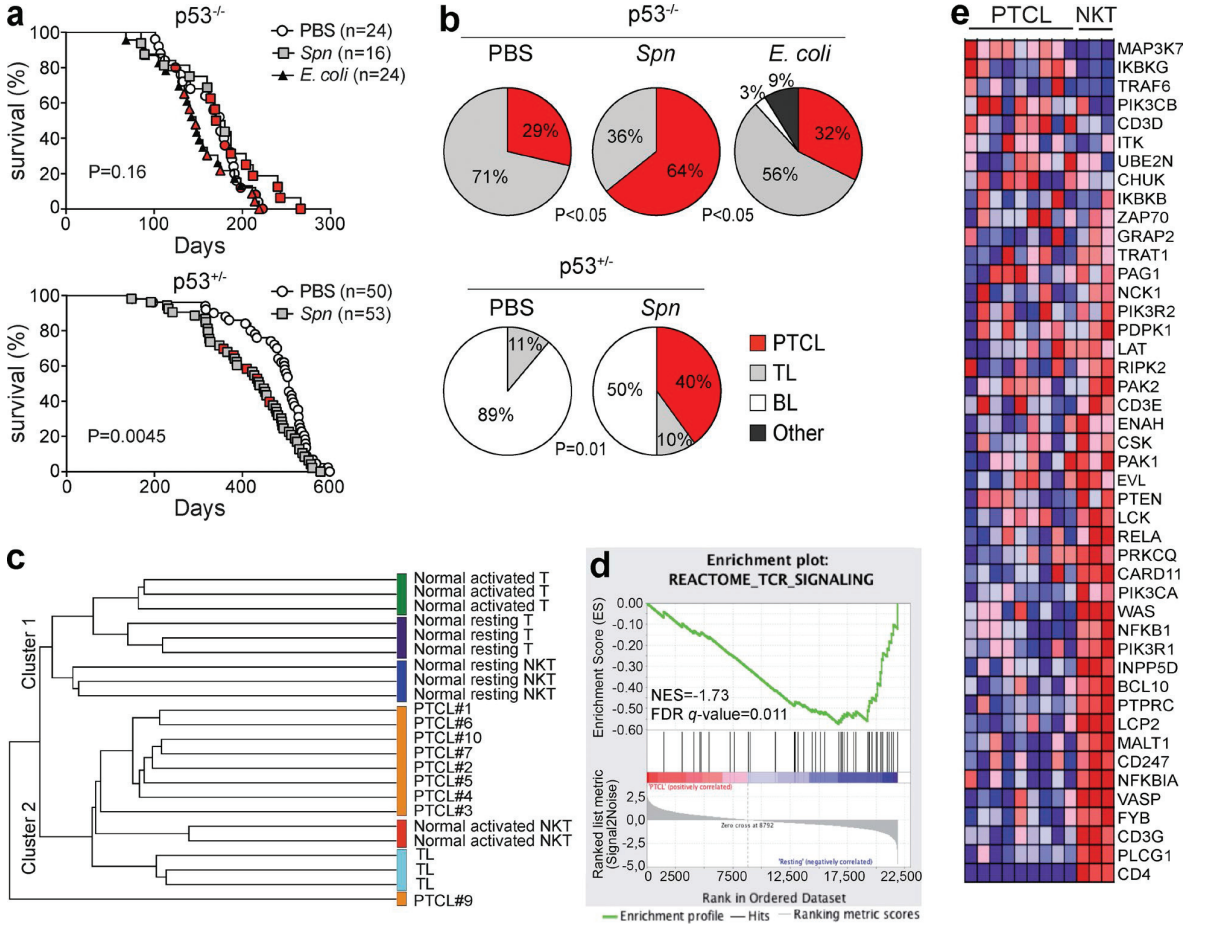


Figure 5. **Chronic stimulation of TCR drives PTCL lymphomagenesis.** (a) Survival curves of PBS-, *Spn*-, and *E. coli*–injected $p53^{-/-}$, and PBS-, and *Spn*-injected $p53^{+/-}$ mice. Red symbols correspond to mice that developed PTCLs. P-values were determined by log-rank test. (b) Lymphoma spectrum in PBS- (n = 24), *Spn*- (n = 16), and *E. coli*–injected (n = 24) $p53^{-/-}$ and PBS- (n = 50) and *Spn*-injected (n = 53) $p53^{+/-}$ mice (solid tumors were not taken into account). P-values were determined by χ^2 test (PTCLs vs. all other lymphomas). In the legend, other corresponds to PTCL originating from conventional T cells. (c) Unsupervised hierarchical clustering based on GEP analysis from nine PTCL samples, TL samples and normal samples from tumor-free $p53^{-/-}$ mice that included resting T and iNKT cells and ex vivo activated T and iNKT cells. The bar on the right of the dendrogram is color-coded according to sample type. (d) GSEA for a set of genes from the TCR signaling pathway. Downward deflection indicates enrichment of the TCR signaling pathway signature in resting iNKT cells from tumor-free $p53^{-/-}$ mice (FDR = 0.011). NES, normalized enrichment score; FDR, false discovery rate. (e) The heat map shows expression of all genes included in the TCR signature.

Gene expression patterns of murine PTCLs resemble those of specific human T cell malignancies

To find the human counterpart to CD1d-restricted murine PTCL (hereafter referred to as mPTCL), we compared GEP of mPTCLs to those of human PTCLs. GEP data of >400 human PTCL samples from previously published datasets were analyzed (Travert et al., 2012; Iqbal et al., 2014) and compared with the orthologue-based profiles of mPTCLs. Unsupervised hierarchical clustering between murine and human data showed that the closest human entities to mPTCLs were HSTL and T cell prolymphocytic leukemia (T-PLL; unpublished data). Similarly, principal component analysis (PCA) revealed that mPTCLs are closer to human HSTL and T-PLL compared with other human mature T cell malignancies (Fig. 8 a). Genes expressed in NK cells, such as *NCAM1* (CD56) and *KLRD1* (CD94), were found to drive mPTCL and HSTL clustering, as well as chimerin2 (*CHN2*), a gene overexpressed in HSTLs (Finalet Ferreiro et al., 2014) and known to regulate TCR signaling (Siliceo and Mérida, 2009; Fig. 8 b). Among other genes, *BCL7A*, a subunit of the mammalian SWI–SNF complex (Kadoch et al., 2013), and *LEF1*, a transcription factor promoting iNKT cell expansion and differentiation (Carr et al., 2015), drove clustering of mPTCLs with T-PLL (Fig. 8 b). Significantly shared gene expression clusters between human and murine subtypes were illustrated by a heat map based on 82 orthologues among the

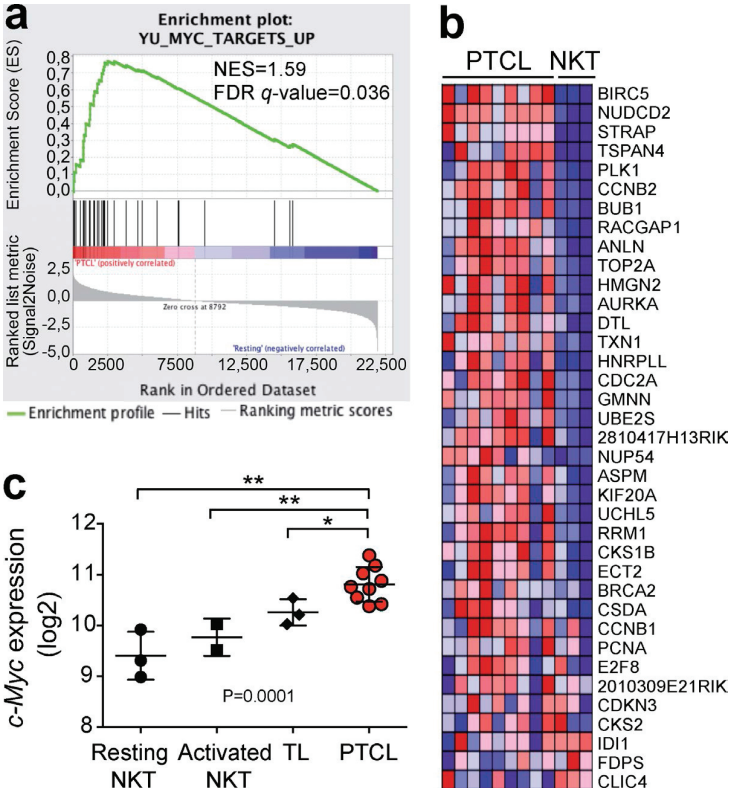


Figure 6. **GEP analysis displays features of c-Myc activation in PTCL.** (a) GSEA analysis of genes up-regulated by c-Myc. Upward deflection of the green line indicates that PTCLs are enriched for genes that are up-regulated by c-Myc, compared with resting iNKT cells; (FDR = 0.036). NES, normalized enrichment score; FDR, false discovery rate. (b) Heat map showing the differential expression of all the genes that constitute the c-Myc signature between PTCLs and resting iNKT cells. (c) *MYC* mRNA up-regulation in PTCLs based on GEP data compared with normal resting and activated iNKT cells, as well as TLs. P-value was determined by Kruskall-Wallis test. P-values between PTCLs and TLs, resting NKT, or activated NKT were determined by Mann-Whitney *U* tests. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

100 genes that best discriminated the human PTCL types from one another (based on an F test; Fig. 8 c and Table S1). Finally, analysis of Gene Ontology (GO) biological processes significantly overexpressed in mPTCL, human HSTL and T-PLL compared with other human entities identified mainly chromosome organization, DNA repair, and epigenetic modifications (Fig. 8 d and Table S1). Conversely, a pronounced down-regulation of immune, cytokine, and inflammatory responses was found. This is consistent with a negative feedback mechanism seen in the context of the chronic antigenic stimulation process suggested in HSTL development (Belhadj et al., 2003). Importantly, removing the murine samples from the analysis led to similar results for HSTL and T-PLL compared with other human lymphomas, implying that the negative feedback loop observed in mPTCLs overdrove GO analysis (unpublished data).

Vδ1 TCR-expressing human PTCLs are CD1d restricted

HSTLs mostly derive from γδ T cell subsets and exhibit a substantial Vδ1 TCR bias (Belhadj et al., 2003). Several lines of evidence indicate that the surveillance of lipid antigens is not solely restricted to iNKT cells and can be substantially complemented by γδ T cells (Bendelac et al., 2007). Their role may even be more prominent in humans, where iNKT cells are >10-fold less abundant than in mice (Bendelac et al., 2007). Recent reports have demonstrated that, like iNKT cells, a minor population of Vδ1 TCR-expressing T cells recognizes αGalCer or the self-lipid sulfatide presented by the CD1d molecule (Bai et al., 2012; Luoma et al., 2013; Uldrich et al., 2013). We therefore studied whether HSTLs were CD1d-restricted T cell malignancies using human CD1d-loaded tetramers. All Vδ1-expressing lymphoma cells from primary HSTL samples bound human CD1d tetramers loaded with sulfatide but not with αGalCer (Fig. 9 a). Based on the GEP data results, we also tested whether human CD1d tetramers would bind to T-PLL that express αβ TCR. All four T-PLL tested were negative for CD1d tetramer staining, regardless of the glycolipid (Fig. 9 b). This demonstrates that despite their clustering with mPTCLs in terms of GEP, T-PLL is not CD1d restricted. To determine whether the CD1d restriction was dictated by the type of PTCLs or by the nature of the TCR expressed, we examined the binding of human CD1d tetramers to PTCL-NOS and T cell large granular lymphocyte leukemia (T-LGL) expressing Vδ1, Vδ2, or αβ TCR. No binding was observed for Vδ2- and TCRαβ-expressing PTCL-NOS and T-LGL. However, both PTCL-NOS and T-LGL bearing the Vδ1 TCR stained positive for sulfatide-loaded CD1d tetramers, thus confirming a broad CD1d restriction for all tested Vδ1-expressing mature T cell malignancies beyond the GEP similarities (Fig. 9, c and d).

DISCUSSION

Mice deficient in *p53* are predisposed to develop cancer, such as TL and sarcoma, with 100% cancer-related mortal-

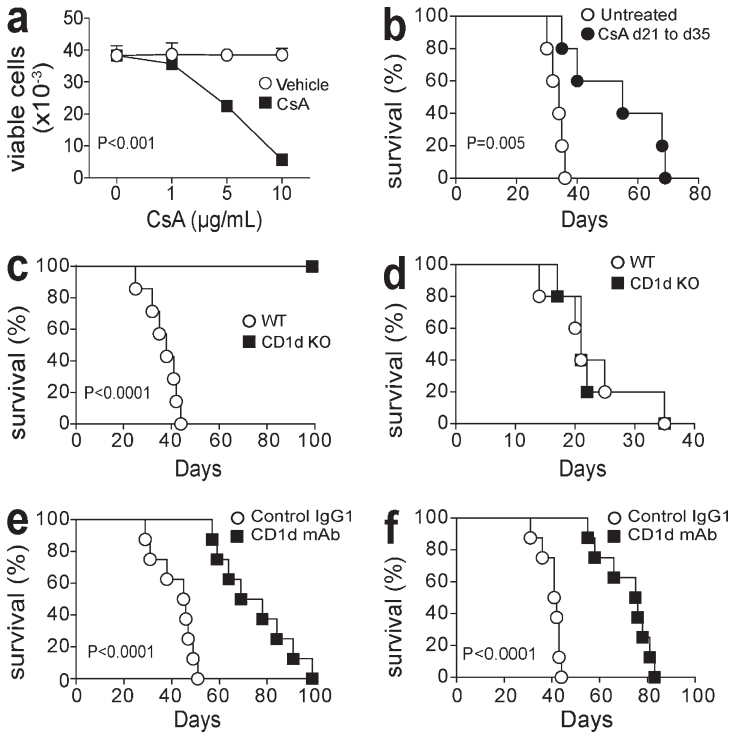


Figure 7. **PTCLs rely on TCR signaling resulting from TCR–CD1d interaction for engraftment and survival.** (a) Cells from PTCLs were cultured in vitro in the presence or absence of increasing concentrations of CsA (or equal concentrations of excipient ethanol, as control vehicle). Data are shown as mean ± SD of one TCRαβ-expressing PTCL in quadruplicate and are representative of four independent experiments performed with four different PTCLs. P-value was determined by two-way ANOVA test. (b) Mice were transferred with 10^6 PTCL cells, then left untreated (n = 5 mice) or injected i.p. daily with 20 mg/kg of CsA (n = 5 mice) for 2 wk starting from day 21 after transfer (i.e., when abdomen enlargement was clinically detectable). Transfer experiments conducted with three different PTCLs provided similar results. (c) Survival curves of WT and *Cd1d*$^{-/-}$ mice (n = 7) transferred with 10^6 TCRαβ-expressing PTCL cells. All mice alive at day 100 were sacrificed and showed absence of macroscopic lymphoma development. Experiments were conducted with four different PTCLs with similar results. (d) Survival curves of WT and *Cd1d*$^{-/-}$ mice (n = 5) transferred with 2 × 10^6 TL cells. Experiments were conducted with two different TLs with similar results. P-value was determined by log-rank test and was not significant. (e) Survival curves of WT mice transferred with 10^6 TCRαβ-expressing PTCL cells and injected twice a week by i.p. route with 15 mg/kg of either IgG1 isotype control (n = 8 mice) or blocking CD1d mAb from day 1 (n = 8 mice) and until mice were considered moribund and euthanized. Transfer experiments conducted with three different PTCLs provided similar results. (f) Survival curves of WT mice transferred with 10^6 TCRαβ-expressing PTCL cells and injected twice a week by i.p. route with 15 mg/kg of either IgG1 control isotype (n = 8 mice) or blocking CD1d mAb from day 21 (n = 8 mice; i.e., when abdomen enlargement was clinically detectable) and until mice were considered moribund and euthanized. Transfer experiments conducted with three different PTCLs provided similar results. P-values in b–f were determined by log-rank test.

ity by ~300 d (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994). However, little is known about the role of *p53* in mature T cell lymphomagenesis, although structural rearrangements of at least 1 of 5 *p53*-related genes have been described in 67% of PTCLs (Vasmatzis et al., 2012). In this study, using *p53*$^{-/-}$ mice, we identified a new entity of PTCL that does not originate from conventional T cells but from CD1d-restricted T cells. Most PTCLs arising in *p53*$^{-/-}$ mice were derived from iNKT cells, the most abundant CD1d-restricted T cell subset in mice. The iNKT origin of these PTCLs was demonstrated by CD1d-αGalCer tetramer staining, expression of the transcription factor PLZF or ZBTB16, invariant Vα14-Jα18 rearrangement of the TCR Vα chain, and rapid secretion of Th1 and Th17 cytokines upon activation. Although these lymphomas have never been characterized in previous studies, they were probably described as splenic marginal zone B cell lymphomas because they were defined in *p53*$^{-/-}$ mice as B220- and CD5-positive, two markers expressed by mPTCLs (Ward et al., 1999). Furthermore, whereas many B cell lymphomas were encountered in p53$^{+/-}$ mice, we never identified CD19$^+$ or Ig$^+$ B cell lymphomas in p53$^{-/-}$ mice, whatever the condition (injection with HK *Spn* or controls).

Unlike the well described CD4$^+$CD8$^+$ double positive TLs that develop in p53$^{-/-}$ mice, PTCLs exhibited a normal- or minute-sized thymus with a widespread involvement of all analyzed peripheral organs, including bone marrow, lung, kidney, spleen, and liver, and a lack of immaturity markers, such as TdT. Altogether, these findings led us to consider these lymphomas as postthymic. The liver was predominantly involved in all the diseased mice, consistent with the known preferential localization of normal iNKT cells to the sinusoids of the liver (Bendelac et al., 2007).

Several lines of evidence suggested a contribution of chronic TCR engagement to the development of these PTCLs: (1) the cells showed typical features of activated iNKT cells, such as PD-1 up-regulation and loss of NK1.1 expression; (2) chronic injection of *Spn*, a bacteria known to express glycolipid antigens that activate iNKT cells through TCR stimulation (Kinjo et al., 2011), significantly increased the incidence of PTCLs; (3) GSEA indicated a significant down-regulation of genes in the TCR signaling pathway,

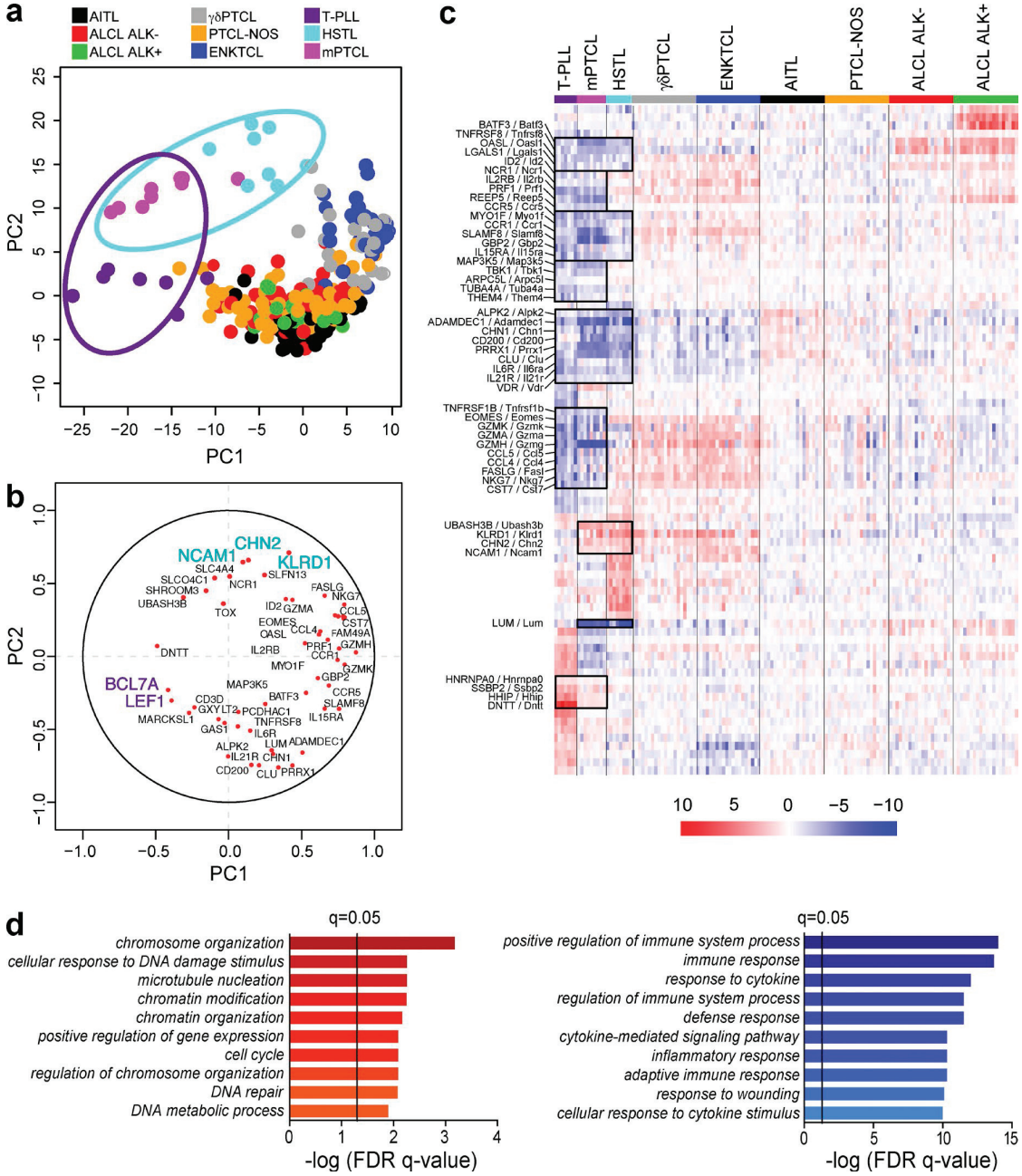


Figure 8. **Gene expression patterns of murine PTCLs resemble those of human HSTL and T-PLL.** (a) Unsupervised PCA showing similarities between murine PTCLs, and human HSTL, and T-PLL compared with other human mature T cell lymphoid malignancies (n = 420 samples). Axes are scaled according to mean-centering and component score distribution. (b) Correlation circle from the unsupervised PCA. Genes highlighted in blue and purple are genes with known function contributing positively to the clustering of murine PTCLs and human HSTLs, and murine PTCLs and human T-PLL, respectively. (c) Heat map of supervised clustering based on GEP analysis from nine murine PTCLs samples and human tumor samples. 82 genes, with orthologues in mouse and human among the 100 genes that best discriminated the human PTCL types from one another (based on an F test), are depicted. The bar above the heat map is color-coded according to the sample type. For better readability, a maximum of only 20 randomly selected human samples per lymphoma subtype are represented (among >400 human samples analyzed). Black boxes indicate clusters of genes overexpressed (red color-coded) or underexpressed (blue color-coded) in mPTCLs and HSTLs or T-PLL clusters compared with other entities. Selected human gene names are shown in capital letters and murine orthologues are shown in lowercase on the left side of the heat map. (d) Representation of the 10 most highly significant subsets among GO biological

previously reported for chronically TCR-stimulated T cells (Baniyash, 2004); (4) CsA, a TCR signaling inhibitor, decreased tumor cell survival in vitro, and prolonged mouse survival after transfer of PTCL cells into recipient mice; (5) engraftments of PTCLs into mice treated with blocking CD1d mAb or into *Cd1d*$^{-/-}$ mice were partially or completely inhibited, respectively, compared with engraftments conducted into WT mice. It could be hypothesized that PTCL cells displayed a poor engraftment in these conditions because they rely on specific CD1d/TCR interactions to survive and/or to proliferate. Indeed, although survival of WT iNKT cells does not require TCR signaling (Vahl et al., 2013) or CD1d expression (Matsuda et al., 2002), it is possible that iNKT cells that have been repeatedly stimulated could become addicted to their cognate antigen and use TCR signaling for long-term maintenance, like exhausted memory CD8^{+} T cells in chronic infections (Wherry, 2011).

However, if iNKT cell lymphomagenesis is driven by chronic TCR stimulation, spontaneous emergence of PTCLs in *p53*$^{-/-}$ mice raises the question of whether lymphomagenesis could have been driven by environmental factors or self-antigens. Indeed, iNKT cells recognize both self- and microbial lipid-based antigens bound to CD1d. These antigens are widespread in the environment (Wingender et al., 2011) and are also abundant in commensal organisms of the microbiota (Wieland Brown et al., 2013). All PTCLs displayed the same typical features of activated iNKT cells, such as PD-1 up-regulation and loss of NK1.1 expression, lending support to a similar mechanism of transformation in the different groups of mice (spontaneous emergence, PBS-, *E. coli*–, or *Spn*-injected mice). Whether the increased incidence of PTCLs, in the context of chronic pneumococcal stimulation, is only a result of TCR activation triggered by microbial lipid antigen presented by CD1d (Kinjo et al., 2011) or also caused in part by activation by self-antigens presented by CD1d and inflammatory signals from the bacteria remains to be seen. However, no increased incidence of PTCLs in *p53*$^{-/-}$ mice chronically injected with *E. coli,* known to activate iNKT cells through innate cytokine production (Brigl et al., 2011), was observed. This argues that microbial lipid antigens presented by CD1d play a direct role in iNKT cell lymphomagenesis.

Repeated engagements of self- and nonself-antigens, as well as constitutive signaling downstream of the BCR, now emerge as mechanisms by which human B cell type lymphomas might develop and expand (Küppers, 2005; Shaffer et al., 2012). An analogous role of chronic antigenic stimulation via TCR signaling in mature T cell malignancies development is far less documented. However, recent data from mouse models indicated that constitutive TCR signaling by the fusion kinase ITK-SYK drives transformation of mature T cells (Pechloff et al., 2010). In addition, *SNF5*$^{-/-}$ mice develop TCR-dependent PTCLs arising from a peculiar CD8^{+}CD122^{lo} and IL-15–independent memory T cell population (Wang et al., 2011). In humans, a link between chronic stimulation by pathogens or self-antigens and lymphomagenesis has been speculated for T-LGL (Rodríguez-Caballero et al., 2008) and HSTL (Belhadj et al., 2003). GEP analysis showed that murine PTCLs displayed similarities with human HSTL and T-PLL compared with other entities. However, CD1d restriction in human T cell malignancies extended far beyond all Vδ1 TCR-expressing lymphoma cells, identifying for the first time lymphomas deriving from human CD1d-restricted T cells. Interestingly, a recent report described a NKp46^{+} NKT-like population both in the IL-15 transgenic mouse model of T-LGL and in human T-LGL (Yu et al., 2011). However, this population was not CD1d-restricted like bona fide mouse iNKT cell lymphomas or CD1d-restricted human PTCLs described here.

Aside from CD1d-restricted cells, other unconventional T lymphocytes also recognize nonclassical MHC molecules, such as some of the CD8αα TCRαβ intraepithelial lymphocytes, MR1-specific mucosal invariant T (MAIT) cells (Le Bourhis et al., 2010), and CD1b-restricted human T cells (Van Rhijn et al., 2013). It is tempting to speculate that a previously unsuspected number of human PTCLs could also derive from the transformation of these unconventional T cells. In agreement with this hypothesis, PLZF expression in at least 20% of lymphoma cells has been described in 2 of 26 PTCL-NOS, which were thereafter found to originate from MAIT cells as demonstrated by the TRAV1-2-TRAJ33 TCRα rearrangement (Vα1-2-Jα33; McGregor et al., 2014).

In conclusion, our work describes a previously unrecognized lymphoma entity emerging from CD1d-restricted T cells in mice and humans. Our data highlight the major role of TCR in CD1d-restricted T cell lymphomagenesis and the potential contribution of chronic antigenic stimulation in PTCL etiology, extending to PTCLs the concepts of antigen receptor signaling dependence and chronic stimulation broadly accepted in B cell lymphomagenesis (Suarez et al., 2006). Our present findings, that blocking anti-CD1d mAb delays CD1d-restricted T cell lymphoma engraftment and prolongs the survival of mice, pave the way for the development of a new therapeutic approach for patients with CD1d-restricted PTCLs. In summary, the identification of CD1d-restricted PTCLs in mice and humans alters current classifications of the disease, provides a previously unrecognized animal model, and might lead to promising therapy for patients.

processes when comparing mPTCLs, HSTLs, and T-PLL to other human entities. Processes encompassing up-regulated genes are color-coded in red and processes encompassing down-regulated genes are color-coded in blue. The 300 most differentially up-regulated and down-regulated genes were taken into account for analysis.

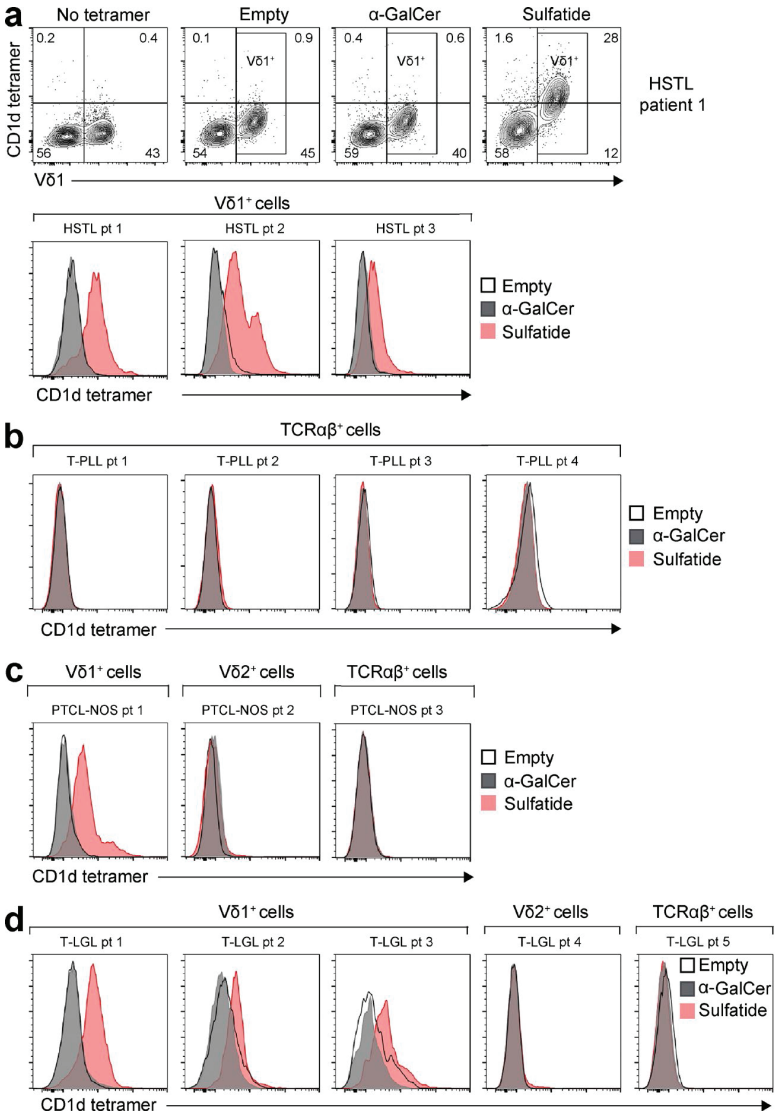


Figure 9. **Vδ1 TCR-expressing human lymphomas are CD1d-restricted PTCLs.** (a) Flow cytometry contour plot analysis showing staining with anti-Vδ1 antibody versus human CD1d-tetramer loaded with αGalCer, sulfatide or unloaded (empty tetramer) of cells from one HSTL patient. Histograms of human CD1d-tetramer stainings gated on Vδ1⁺ lymphoma cells from all three HSTL patients analyzed are presented below. (b) Flow cytometry histograms of human CD1d-tetramer stainings gated on TCRαβ⁺ lymphoma cells from four T-PLL patients. (c) Flow cytometry histograms of human CD1d-tetramer stainings gated on Vδ1⁺, Vδ2⁺, or TCRαβ⁺ lymphoma cells from three PTCL-NOS patients. (d) Flow cytometry histograms of human CD1d-tetramer stainings gated on Vδ1⁺, Vδ2⁺, or TCRαβ⁺ leukemic cells from five T-LGL patients.

MATERIALS AND METHODS

Mice

p53$^{-/-}$ mice (B6.129S2-*Trp53*^{tm1Tyj}/J) were purchased from The Jackson Laboratory. *p53*$^{+/-}$ mice were generated by crossing *p53*$^{-/-}$ mice with C57BL/6J WT mice purchased from Charles River Laboratories. *CD3ε*$^{-/-}$ mice were obtained from M. Malissen (Centre d'Immunologie Marseille-Luminy, Marseille, France). *Cd1d*$^{-/-}$ (*Cd1*^{tm1Gru}) mice were provided by L. Van Kaer (Howard Hughes Medical Institute, Nashville, TN). All mice were on the C57BL/6J background and were maintained in specific pathogen–free conditions at the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France). All studies and procedures were performed in accordance with European Union guidelines and approved by the local Animal Ethics Evaluation Committee (CECCAPP).

Human lymphoma/leukemia cells

Frozen cells were obtained from blood or lymph nodes of lymphoma patients, with informed consent from the patients and review board number 008–09 from the Comité de Protection des Personnes - Ile-de-France IX.

Flow cytometry analysis

Single-cell suspension prepared from spleen, mesenteric, or mediastinal lymph nodes, liver, and bone marrow were stained with a panel of fluorescently labeled antibodies. Before staining, Fc receptors were blocked for 15 min at 4°C with 24G2 hybridoma supernatant. Data were collected using LSRII and LSR Fortessa flow cytometers (BD) and analyzed with FlowJo software (Tree Star). The following membrane mAbs reactive with murine cells were pur-

chased from BD: CD3ε (145-2C11), CD4 (GK1.5), CD8α (53–6.7), B220 (RA3-6B2), CD69 (H1.2F3), CD62L (MEL-14), CD54 (3E2), CD44 (IM7), CD25 (PC61), TCRβ (H57-597), TCRγδ (GL3), CD5 (53–7.3), CD19 (1D3), CD127 (A7R34), CD122 (TM-β1), NK1.1 (PK136), Vβ5.1+5.2 (MR9-34), Vβ8.1+8.2 (MR5-2), Vβ8.3 (1B3.3) and Vδ6.3/2 (8F4H7B7). Antibodies were conjugated to FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy5.5, APC, PE-Cy7, APC-Cy7, or Alexa Fluor 647. PerCP-conjugated anti-Thy1.2 (30-H12) mAb, and PE-conjugated anti-Vγ1.1 (4B2.9) mAb reactive with murine cells was purchased from BioLegend. PE-conjugated anti–PD-1 (J43), PE-conjugated anti-PLZF (Mags.21F7; anti–mouse and –human), and FITC-conjugated anti–human TCRαβ (IP26) were purchased from eBioscience. FITC-conjugated anti–human Vδ1 (TS8.2) and anti–human Vδ2 (15D) were purchased from Thermo Fisher Scientific. For all antibodies, corresponding isotype controls were purchased from the same suppliers. Results expressed in ΔMFI (mean fluorescence intensity) were obtained after subtraction of isotype control MFI from specific marker MFI. PE- and APC-conjugated mouse CD1d-αGalCer tetramers (PBS57) were obtained from the National Institutes of Health Tetramer Core Facility. PE- and APC-conjugated unloaded mouse CD1d tetramers from the same supplier were used as control. Human CD1d tetramers were produced as previously described (Sidobre and Kronenberg, 2002) using αGalCer (Kirin) and sulfatide (Avanti).

Clonality assessment

PTCL cells from involved spleen or liver were sorted on a FACS Aria sorter (BD). Murine T-lymphocyte repertoire diversity was measured using Immun'Ig tests (ImmunID Technology). Genomic DNA was extracted using standard techniques, and Multi-N-plex PCR reactions were performed using an upstream primer specific to all functional members of a given TRBV family and a downstream primer specific to a given TRBJ segment (international ImMunoGeneTics information system). This assay allows the simultaneous and exhaustive detection of Vβ–Jβ rearrangements in the same reaction. Each Vx–J1, J2, J3, J4, and Jn product was separated as a function of its size, and the Constel'ID software (ImmunID Technologies) was used for further analytical studies, including generation of three-dimensional repertoire illustrations.

Bacterial culture and injections

The encapsulated serotype 3 WU2 strain of *S. pneumonia*, obtained from A. Fleer (University Medical Center, Utrecht, The Netherlands), was grown in Todd-Hewitt broth supplemented with 0.5% yeast extract to mid-log phase, and then enumerated by plating the suspension on blood agar plates. The *E. coli* strain 25922 from ATCC was grown in LB medium to mid-log phase, and then enumerated by plating the suspension on TBX agar plates. Bacteria were washed twice in PBS and heat-inactivated by a 1-h incubation at 60°C. Aliquots of this suspension were stored at −80°C until use. At the time of injection, 5×10^6 bacteria were diluted in 200 μl of sterile PBS for intraperitoneal injection, as previously described (Kuranaga et al., 2006). Animal experiments were performed in a biosafety level 2 animal care facility.

CDR3 sequences of the TCRα and TCRβ chains of PTCL

RNA extracted from cell preparations was converted into cDNA. Samples of cDNA were amplified by PCR for β chain with Vβ- and Cβ-specific primers and for α chain with Vα14 and Cα primers and IQ SuperMix reagents (Bio-Rad Laboratories). PCR were run on a Gene AMP PCR System2700 (Applied Biosystems) with the following conditions: a first cycle at 94°C for 10 min, 35 cycles of 94°C for 3 s, 60°C for 3 s, 72°C for 3 s, and a last cycle at 72°C for 10 min. PCR products were precipitated with ethanol and sequenced using C- and V-specific primers by Cogenics. Primers for constant regions were reverse to transcription orientation: Cβ, 5′-CAGCTCAGCTCCACGTGGTCAGG-3′; Cα, 5′-CTGGGGTAGGTGGCGTT-3′. Primers for the variable regions were specific and in the transcription orientation: Vβ8, 5′-GGCATGGGCTGAGGCTGATCC-3′; Vβ2, 5′-TCACTGATACGGAGCTGAGGC-3′; Vβ7, 5′-TACAGGGTCTCACGGAAGAAGC-3′; Vα14, 5′-CTAAGCACAGCACGCTGCACA-3′.

Tumor transplantation and therapeutic in vivo experiments

For transfer experiments, 10^6 thawed PTCL cells isolated from liver and cryopreserved in 10% DMSO in liquid nitrogen were injected. PTCLs were injected i.v. into syngeneic *Cd1d*$^{-/-}$ and WT mice. For therapeutic trials, 20 mg/kg of CsA (Novartis Pharma) or 15 mg/kg of blocking CD1d mAbs (clone HB323; BioXcell) diluted in 200 μl of PBS were injected daily or twice a week, respectively, from day 1 after transfer of PTCLs or when tumors became clinically apparent in the transplant-recipient mice (i.e., at day 21). All groups of mice were age and sex matched.

Immunostaining

For immunohistochemistry, thymus, spleen, liver, kidney, lung, and mesenteric or mediastinal lymph nodes were fixed in 10% formaldehyde and paraffin embedded. 4-μm-thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or immunostained with anti-TdT (A3524; Dako). For cytology, fresh tissue appositions were obtained by touch imprints of spleen and liver. Sections and appositions were viewed using a Leica DMR microscope and images were captured with a digital camera (DXM 1200C; Nikon).

Microarray analysis

Cell sorting. Thymic and PCTL tumoral cells from thymus or liver, respectively, were sorted on a FACSAria sorter (BD). Purity was consistently >98%. Sorted normal iNKT cells from liver and normal T lymphocytes pooled from spleen and mesenteric lymph nodes from age-matched WT animals were used as controls. For normal iNKT cell and T cell activation,

anti-CD3/anti-CD28–coated beads (Invitrogen) were used at a 1:1 bead-to-cell ratio in 3-d cultures.

Target labeling. Total RNA was extracted using TRIzol-Reagent (Invitrogen) and was amplified by two rounds of in vitro transcription (IVT) using an ExpressArt C&E mRNA amplification nano kit (AmpTec GmbH). During the second IVT amplification, RNA was biotin-labeled using BioArray HighYield RNA Transcript Labeling kit (Enzo Life Sciences). Before amplification, spikes of synthetic mRNA (GeneChip Eukaryotic Poly-A RNA Controls; Affymetrix) at different concentrations were added to all samples; these positive controls were used to ascertain the quality of the process. Biotinylated antisense cRNA quantification was performed with Nanodrop 1000 (Nanodrop) and quality checked with Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Array hybridizations, scanning, and normalization. Hybridization was performed following the Affymetrix protocol. In brief, 15 µg of labeled cRNA was fragmented and denatured in hybridization buffer, and then 10 µg was hybridized on GeneChip Mouse Genome 430 2.0 array (Affymetrix) for 16 h at 45°C with constant mixing by rotation at 60 rpm in the Hybridization Oven 640 (Affymetrix). After hybridization, arrays were washed and stained with streptavidin-phycoerythrin (GeneChip Hybridization Wash and Stain kit) in the Fluidics Station 450 (Affymetrix) according to the manufacturer's instruction. The arrays were read with a confocal laser (GeneChip Scanner 3000 7G; Affymetrix). The CEL files were generated using the Affymetrix GeneChip Command Console software 3.0. The obtained data were normalized with Affymetrix Expression Console software using MAS5 statistical algorithm.

GSEA was performed using the publicly available desktop application from the Broad Institute after normalization with Affymetrix Expression Console software using MAS5 statistical algorithm. Affymetrix CEL files from mouse samples were also analyzed in R using the Bioconductor. Raw probe signals were background-corrected using the maximum likelihood estimation of the normal-exponential mixture model, and normalized using the variance-stabilization transformation, followed by a quantile normalization. Summarization was performed using the median-polish version 17.1 of the Entrez Gene-based reannotated chip description file. Murine microarray data have been deposited into the Gene Expression omnibus (GEO) database under accession no. GSE63264. GEP from human samples for hierarchical clustering, PCA, and GO analyses were collected from ArrayExpress accession nos. E-TABM-702, E-TABM-783, and E-TABM-638, and GEO accession nos. GSE19067, GSE58445, GSE19069, and GSE6338. The various human GEP datasets were normalized in BRB-ArrayTools v4.5.0 Beta 2 using default settings, exported, combined, and batch corrected via Combat. The batch corrected datasets were reimported into BRB-ArrayTools, but not renormalized. The mouse expression matrix was combined with the human expression matrix, pairing orthologue genes based on the information in version 68 of HomoloGene. In the PCA analysis, distance between individual samples was depicted according to the first two principal components. First and second principal components accounted for >40% of the total variance. For analysis of GO biological processes, the 300 most differentially up-regulated or down-regulated genes between groups of entities were considered.

IL-7, IL-15m, and CsA in vitro experiments

PTCL viability was assessed after 24 h of culture in medium alone or in medium supplemented with 10 ng/ml of IL-7 (R&D Systems) or IL-15 (R&D Systems), or with increasing concentrations of CsA (Sigma-Aldrich). Viability was assessed by PTCL staining with FITC-conjugated Annexin V at the indicated time.

M-FISH

M-FISH was performed on chromosome spreads obtained from fixed-cell material and prepared using standard cytogenetic protocols. A mix of 21 labeled painting probes specific to the different mouse chromosomes was used (MetaSystems). Experiments were performed according to the manufacturer's protocols. Metaphase spreads were analyzed using a fluorescence microscope (Axioplan II; ZEISS) equipped with appropriate filters (DAPI, FITC, Spectrum Orange, TRITC, Cy5, and DEAC). Images were captured and processed using the ISIS/mFISH imaging system (Metasystems).

Statistical analyses

All analyses were performed using Prism (GraphPad Software) version 6.0. In all figures, histograms represent mean and error bars represent SD. Comparisons were made with the χ^2 test or the Fisher's exact test for categorical variables, and with Mann-Whitney nonparametric test for continuous parameters. Survival curves were constructed with the Kaplan-Meier method and survival distributions were compared by the log-rank test. All tests were two-sided and p-values of <0.05 were considered statistically significant.

Online supplemental material

Fig. S1 shows CDR3 nucleotide and amino acid sequences of the TCR Vα rearrangements of PTCL. Table S1 shows gene ontology terms most strongly up-regulated and down-regulated in mPTCL, human HSTL, and T-PLL compared with other human PTCL entities. Online supplemental material is available at http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20150794/DC1.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the National Institutes of Health Tetramer Facility for mouse CD1d tetramers; T. Andrieu and S. Dussurgey (SFR BioSciences – UMS3444/US8) for technical assistance with flow cytometry and cell sorting; N. Aguilera and J.-F. Henry (PBES, SFR BioSciences Gerland – UMS3444/US8) for help at the animal care facility; S. Croze, A.

Besse (ProfileXpert), and S. Tymen (Altrabio) for assistance in GEP analysis; L. Moro-Sobilot for iconography assistance; and V. Bachy for discussions and critical reading of the manuscript.

L. Genestier was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, CLARA "program Oncostarter", Plan Cancer 2009-2013, the Institut Carnot CALYM granted by the French National Research Agency, grants from "Ligue contre le Cancer–CD69 and CD26," and a grant from the ARC foundation. M. Herling was supported by a Deutsche Forschungsgemeinschaft grant as part of the FOR1961 (HE-3553/4-1).

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 7 May 2015
Accepted: 25 February 2016

REFERENCES

Bai, L., D. Picard, B. Anderson, V. Chaudhary, A. Luoma, B. Jabri, E.J. Adams, P.B. Savage, and A. Bendelac. 2012. The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant Vδ1 TCR. *Eur. J. Immunol.* 42:2505–2510. http://dx.doi.org/10.1002/eji.201242531

Baniyash, M. 2004. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 4:675–687. http://dx.doi.org/10.1038/nri1434

Belhadj, K., F. Reyes, J.P. Farcet, H. Tilly, C. Bastard, R. Angonin, E. Deconinck, F. Charlotte, V. Leblond, E. Labouyrie, et al. 2003. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: report on a series of 21 patients. *Blood.* 102:4261–4269. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-05-1675

Bendelac, A., P.B. Savage, and L. Teyton. 2007. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25:297–336. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711

Brigl, M., R.V. Tatituri, G.F. Watts, V. Bhowruth, E.A. Leadbetter, N. Barton, N.R. Cohen, F.F. Hsu, G.S. Besra, and M.B. Brenner. 2011. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *J. Exp. Med.* 208:1163–1177. http://dx.doi.org/10.1084/jem.20102555

Cairns, R.A., J. Iqbal, F. Lemonnier, C. Kucuk, L. de Leval, J.P. Jais, M. Parrens, A. Martin, L. Xerri, P. Brousset, et al. 2012. IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood.* 119:1901–1903. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-11-391748

Carr, T., V. Krishnamoorthy, S. Yu, H.H. Xue, B.L. Kee, and M. Verykokakis. 2015. The transcription factor lymphoid enhancer factor 1 controls invariant natural killer T cell expansion and Th2-type effector differentiation. *J. Exp. Med.* 212:793–807. http://dx.doi.org/10.1084/jem.20141849

Chang, W.S., J.Y. Kim, Y.J. Kim, Y.S. Kim, J.M. Lee, M. Azuma, H. Yagita, and C.Y. Kang. 2008. Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. *J. Immunol.* 181:6707–6710. http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.6707

Choi, J., G. Goh, T. Walradt, B.S. Hong, C.G. Bunick, K. Chen, R.D. Bjornson, Y. Maman, T. Wang, J. Tordoff, et al. 2015. Genomic landscape of cutaneous T cell lymphoma. *Nat. Genet.* 47:1011–1019. http://dx.doi.org/10.1038/ng.3356

Coquet, J.M., S. Chakravarti, K. Kyparissoudis, F.W. McNab, L.A. Pitt, B.S. McKenzie, S.P. Berzins, M.J. Smyth, and D.I. Godfrey. 2008. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17–producing $CD4^{-}NK1.1^{-}$ NKT cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:11287–11292. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0801631105

Couronné, L., C. Bastard, and O.A. Bernard. 2012. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 366:95–96. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1111708

Cristofoletti, C., M.C. Picchio, C. Lazzeri, V. Tocco, E. Pagani, A. Bresin, B. Mancini, F. Passarelli, A. Facchiano, E. Scala, et al. 2013. Comprehensive analysis of PTEN status in Sezary syndrome. *Blood.* 122:3511–3520. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-06-510578

da Silva Almeida, A.C., F. Abate, H. Khiabanian, E. Martinez-Escala, J. Guitart, C.P. Tensen, M.H. Vermeer, R. Rabadan, A. Ferrando, and T. Palomero. 2015. The mutational landscape of cutaneous T cell lymphoma and Sézary syndrome. *Nat. Genet.* 47:1465–1470. http://dx.doi.org/10.1038/ng.3442

de Leval, L., D.S. Rickman, C. Thielen, A. Reynies, Y.L. Huang, G. Delsol, L. Lamant, K. Leroy, J. Brière, T. Molina, et al. 2007. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood.* 109:4952–4963. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-10-055145

Donehower, L.A., M. Harvey, B.L. Slagle, M.J. McArthur, C.A. Montgomery Jr., J.S. Butel, and A. Bradley. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature.* 356:215–221. http://dx.doi.org/10.1038/356215a0

Feldman, A.L., M. Law, E.D. Remstein, W.R. Macon, L.A. Erickson, K.L. Grogg, P.J. Kurtin, and A. Dogan. 2009. Recurrent translocations involving the IRF4 oncogene locus in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia.* 23:574–580. http://dx.doi.org/10.1038/leu.2008.320

Finalet Ferreiro, J., L. Rouhigharabaei, H. Urbankova, J.A. van der Krogt, L. Michaux, S. Shetty, L. Krenacs, T. Tousseyn, P. De Paepe, A. Uyttebroeck, et al. 2014. Integrative genomic and transcriptomic analysis identified candidate genes implicated in the pathogenesis of hepatosplenic T-cell lymphoma. *PLoS One.* 9:e102977. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0102977

Gaulard, P., and L. de Leval. 2014. Pathology of peripheral T-cell lymphomas: where do we stand? *Semin. Hematol.* 51:5–16. http://dx.doi.org/10.1053/j.seminhematol.2013.11.003

Godfrey, D.I., H.R. MacDonald, M. Kronenberg, M.J. Smyth, and L. Van Kaer. 2004. NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* 4:231–237. http://dx.doi.org/10.1038/nri1309

Guy, C.S., K.M. Vignali, J. Temirov, M.L. Bettini, A.E. Overacre, M. Smeltzer, H. Zhang, J.B. Huppa, Y.H. Tsai, C. Lobry, et al. 2013. Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. *Nat. Immunol.* 14:262–270. http://dx.doi.org/10.1038/ni.2538

Iqbal, J., G. Wright, C. Wang, A. Rosenwald, R.D. Gascoyne, D.D. Weisenburger, T.C. Greiner, L. Smith, S. Guo, R.A. Wilcox, et al. Lymphoma Leukemia Molecular Profiling Project and the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. 2014. Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma. *Blood.* 123:2915–2923. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-11-536359

Jacks, T., L. Remington, B.O. Williams, E.M. Schmitt, S. Halachmi, R.T. Bronson, and R.A. Weinberg. 1994. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr. Biol.* 4:1–7. http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00002-6

Kadoch, C., D.C. Hargreaves, C. Hodges, L. Elias, L. Ho, J. Ranish, and G.R. Crabtree. 2013. Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat. Genet.* 45:592–601. http://dx.doi.org/10.1038/ng.2628

Kaech, S.M., E.J. Wherry, and R. Ahmed. 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* 2:251–262. http://dx.doi.org/10.1038/nri778

Kinjo, Y., P. Illarionov, J.L. Vela, B. Pei, E. Girardi, X. Li, Y. Li, M. Imamura, Y. Kaneko, A. Okawara, et al. 2011. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat. Immunol.* 12:966–974. http://dx.doi.org/10.1038/ni.2096

Kronenberg, M. 2005. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu. Rev. Immunol.* 23:877–900. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115742

Küppers, R. 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 5:251–262. http://dx.doi.org/10.1038/nrc1589

Kuranaga, N., M. Kinoshita, T. Kawabata, Y. Habu, N. Shinomiya, and S. Seki. 2006. Interleukin-18 protects splenectomized mice from lethal Streptococcus pneumoniae sepsis independent of interferon-gamma by inducing IgM production. *J. Infect. Dis.* 194:993–1002. http://dx.doi.org/10.1086/507428

Lamprecht, B., S. Kreher, M. Möbs, W. Sterry, B. Dörken, M. Janz, C. Assaf, and S. Mathas. 2012. The tumour suppressor p53 is frequently nonfunctional in Sézary syndrome. *Br. J. Dermatol.* 167:240–246. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10918.x

Lantz, O., and A. Bendelac. 1994. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J. Exp. Med.* 180:1097–1106. http://dx.doi.org/10.1084/jem.180.3.1097

Le Bourhis, L., E. Martin, I. Péguillet, A. Guihot, N. Froux, M. Coré, E. Lévy, M. Dusseaux, V. Meyssonnier, V. Premel, et al. 2010. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Immunol.* 11:701–708. http://dx.doi.org/10.1038/ni.1890

Lees, R.K., I. Ferrero, and H.R. MacDonald. 2001. Tissue-specific segregation of TCRgamma delta+ NKT cells according to phenotype TCR repertoire and activation status: parallels with TCR $\alpha\beta^+$NKT cells. *Eur. J. Immunol.* 31:2901–2909. http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141(2001010)31:10<2901::AID-IMMU2901>3.0.CO;2-#

Liberzon, A., A. Subramanian, R. Pinchback, H. Thorvaldsdóttir, P. Tamayo, and J.P. Mesirov. 2011. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics.* 27:1739–1740. http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btr260

Lindsten, T., C.H. June, and C.B. Thompson. 1988. Multiple mechanisms regulate c-myc gene expression during normal T cell activation. *EMBO J.* 7:2787–2794.

Liu, G., J.M. Parant, G. Lang, P. Chau, A. Chavez-Reyes, A.K. El-Naggar, A. Multani, S. Chang, and G. Lozano. 2004. Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. *Nat. Genet.* 36:63–68. http://dx.doi.org/10.1038/ng1282

Luoma, A.M., C.D. Castro, T. Mayassi, L.A. Bembinster, L. Bai, D. Picard, B. Anderson, L. Scharf, J.E. Kung, L.V. Sibener, et al. 2013. Crystal structure of Vδ1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human γδ T cells. *Immunity.* 39:1032–1042. http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.001

Matsuda, J.L., L. Gapin, S. Sidobre, W.C. Kieper, J.T. Tan, R. Ceredig, C.D. Surh, and M. Kronenberg. 2002. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat. Immunol.* 3:966–974. http://dx.doi.org/10.1038/ni837

McGregor, S., A. Shah, G. Raca, M.K. Mirza, S.M. Smith, J. Anastasi, J.W. Vardiman, E. Hyjek, and S. Gurbuxani. 2014. PLZF staining identifies peripheral T-cell lymphomas derived from innate-like T-cells with TRAV1-2-TRAJ33 TCR-α rearrangement. *Blood.* 123:2742–2743. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-02-555482

Murray, A., E.C. Cuevas, D.B. Jones, and D.H. Wright. 1995. Study of the immunohistochemistry and T cell clonality of enteropathy-associated T cell lymphoma. *Am. J. Pathol.* 146:509–519.

Nicolae, A., L. Xi, S. Pittaluga, Z. Abdullaev, S.D. Pack, J. Chen, T.A. Waldmann, E.S. Jaffe, and M. Raffeld. 2014. Frequent STAT5B mutations in γδ hepatosplenic T-cell lymphomas. *Leukemia.* 28:2244–2248. http://dx.doi.org/10.1038/leu.2014.200

Palomero, T., L. Couronné, H. Khiabanian, M.Y. Kim, A. Ambesi-Impiombato, A. Perez-Garcia, Z. Carpenter, F. Abate, M. Allegretta, J.E. Haydu, et al. 2014. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat. Genet.* 46:166–170. http://dx.doi.org/10.1038/ng.2873

Pechloff, K., J. Holch, U. Ferch, M. Schweneker, K. Brunner, M. Kremer, T. Sparwasser, L. Quintanilla-Martinez, U. Zimber-Strobl, B. Streubel, et al. 2010. The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma. *J. Exp. Med.* 207:1031–1044. http://dx.doi.org/10.1084/jem.20092042

Quivoron, C., L. Couronné, V. Della Valle, C.K. Lopez, I. Plo, O. Wagner-Ballon, M. Do Cruzeiro, F. Delhommeau, B. Arnulf, M.-H. Stern, et al. 2011. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell.* 20:25–38. http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.003

Renno, T., A. Attinger, D. Rimoldi, M. Hahne, J. Tschopp, and H.R. MacDonald. 1998. Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 28:540–547. http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<540::AID-IMMU540>3.0.CO;2-Y

Rodríguez-Caballero, A., A.C. García-Montero, P. Bárcena, J. Almeida, F. Ruiz-Cabello, M.D. Tabernero, P. Garrido, S. Muñoz-Criado, Y. Sandberg, A.W. Langerak, et al. 2008. Expanded cells in monoclonal TCR-alphabeta+/CD4+/NKa+/CD8-/+dim T-LGL lymphocytosis recognize hCMV antigens. *Blood.* 112:4609–4616. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-03-146241

Sakata-Yanagimoto, M., T. Enami, K. Yoshida, Y. Shiraishi, R. Ishii, Y. Miyake, H. Muto, N. Tsuyama, A. Sato-Otsubo, Y. Okuno, et al. 2014. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat. Genet.* 46:171–175. http://dx.doi.org/10.1038/ng.2872

Salio, M., J.D. Silk, E.Y. Jones, and V. Cerundolo. 2014. Biology of CD1- and MR1-restricted T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 32:323–366. http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120243

Shaffer, A.L. III, R.M. Young, and L.M. Staudt. 2012. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu. Rev. Immunol.* 30:565–610. http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075027

Shin, H., S.D. Blackburn, J.N. Blattman, and E.J. Wherry. 2007. Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J. Exp. Med.* 204:941–949. http://dx.doi.org/10.1084/jem.20061937

Sidobre, S., and M. Kronenberg. 2002. CD1 tetramers: a powerful tool for the analysis of glycolipid-reactive T cells. *J. Immunol. Methods.* 268:107–121. http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00204-1

Siliceo, M., and I. Mérida. 2009. T cell receptor-dependent tyrosine phosphorylation of beta2-chimaerin modulates its Rac-GAP function in T cells. *J. Biol. Chem.* 284:11354–11363. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M806098200

Streubel, B., U. Vinatzer, M. Willheim, M. Raderer, and A. Chott. 2006. Novel t(5;9)(q33;q22) fuses ITK to SYK in unspecified peripheral T-cell lymphoma. *Leukemia.* 20:313–318. http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2404045

Suarez, F., O. Lortholary, O. Hermine, and M. Lecuit. 2006. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood.* 107:3034–3044. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-09-3679

Subramanian, A., P. Tamayo, V.K. Mootha, S. Mukherjee, B.L. Ebert, M.A. Gillette, A. Paulovich, S.L. Pomeroy, T.R. Golub, E.S. Lander, and J.P. Mesirov. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:15545–15550. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0506580102

Swerdlow, S., E. Campo, and N. Harris. 2008. World Health Organization Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon, France. 439 pp.

Travert, M., Y. Huang, L. de Leval, N. Martin-Garcia, M.H. Delfau-Larue, F. Berger, J. Bosq, J. Brière, J. Soulier, E. Macintyre, et al. 2012. Molecular features of hepatosplenic T-cell lymphoma unravels potential novel

therapeutic targets. *Blood*. 119:5795–5806. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-12-396150

Uldrich, A.P., J. Le Nours, D.G. Pellicci, N.A. Gherardin, K.G. McPherson, R.T. Lim, O. Patel, T. Beddoe, S. Gras, J. Rossjohn, and D.I. Godfrey. 2013. CD1d-lipid antigen recognition by the γδ TCR. *Nat. Immunol.* 14:1137–1145. http://dx.doi.org/10.1038/ni.2713

Vahl, J.C., K. Heger, N. Knies, M.Y. Hein, L. Boon, H. Yagita, B. Polic, and M. Schmidt-Supprian. 2013. NKT cell-TCR expression activates conventional T cells in vivo, but is largely dispensable for mature NKT cell biology. *PLoS Biol.* 11:e1001589. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001589

Van Rhijn, I., A. Kasmar, A. de Jong, S. Gras, M. Bhati, M.E. Doorenspleet, N. de Vries, D.I. Godfrey, J.D. Altman, W. de Jager, et al. 2013. A conserved human T cell population targets mycobacterial antigens presented by CD1b. *Nat. Immunol.* 14:706–713. http://dx.doi.org/10.1038/ni.2630

Vaqué, J.P., G. Gómez-López, V. Monsálvez, I. Varela, N. Martínez, C. Pérez, O. Domínguez, O. Graña, J.L. Rodríguez-Peralto, S.M. Rodríguez-Pinilla, et al. 2014. PLCG1 mutations in cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. 123:2034–2043. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-05-504308

Vasmatzis, G., S.H. Johnson, R.A. Knudson, R.P. Ketterling, E. Braggio, R. Fonseca, D.S. Viswanatha, M.E. Law, N.S. Kip, N. Ozsan, et al. 2012. Genome-wide analysis reveals recurrent structural abnormalities of TP63 and other p53-related genes in peripheral T-cell lymphomas. *Blood*. 120:2280–2289. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-03-419937

Wang, X., M.B. Werneck, B.G. Wilson, H.J. Kim, M.J. Kluk, C.S. Thom, J.W. Wischhusen, J.A. Evans, J.L. Jesneck, P. Nguyen, et al. 2011. TCR-dependent transformation of mature memory phenotype T cells in mice. *J. Clin. Invest.* 121:3834–3845. http://dx.doi.org/10.1172/JCI37210

Wang, Y., I. Misumi, A.D. Gu, T.A. Curtis, L. Su, J.K. Whitmire, and Y.Y. Wan. 2013. GATA-3 controls the maintenance and proliferation of T cells downstream of TCR and cytokine signaling. *Nat. Immunol.* 14:714–722. http://dx.doi.org/10.1038/ni.2623

Ward, J.M., L. Tadesse-Heath, S.N. Perkins, S.K. Chattopadhyay, S.D. Hursting, and H.C. Morse III. 1999. Splenic marginal zone B-cell and thymic T-cell lymphomas in p53-deficient mice. *Lab. Invest.* 79:3–14.

Wherry, E.J. 2011. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12:492–499. http://dx.doi.org/10.1038/ni.2035

Wherry, E.J., and R. Ahmed. 2004. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J. Virol.* 78:5535–5545. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.11.5535-5545.2004

Wieland Brown, L.C., C. Penaranda, P.C. Kashyap, B.B. Williams, J. Clardy, M. Kronenberg, J.L. Sonnenburg, L.E. Comstock, J.A. Bluestone, and M.A. Fischbach. 2013. Production of α-galactosylceramide by a prominent member of the human gut microbiota. *PLoS Biol.* 11:e1001610. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001610

Wilson, M.T., C. Johansson, D. Olivares-Villagómez, A.K. Singh, A.K. Stanic, C.R. Wang, S. Joyce, M.J. Wick, and L. Van Kaer. 2003. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100:10913–10918. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1833166100

Wingender, G., P. Rogers, G. Batzer, M.S. Lee, D. Bai, B. Pei, A. Khurana, M. Kronenberg, and A.A. Horner. 2011. Invariant NKT cells are required for airway inflammation induced by environmental antigens. *J. Exp. Med.* 208:1151–1162. http://dx.doi.org/10.1084/jem.20102229

Yoo, H.Y., M.K. Sung, S.H. Lee, S. Kim, H. Lee, S. Park, S.C. Kim, B. Lee, K. Rho, J.E. Lee, et al. 2014. A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat. Genet.* 46:371–375. http://dx.doi.org/10.1038/ng.2916

Yu, J., T. Mitsui, M. Wei, H. Mao, J.P. Butchar, M.V. Shah, J. Zhang, A. Mishra, C. Alvarez-Breckenridge, X. Liu, et al. 2011. NKp46 identifies an NKT cell subset susceptible to leukemic transformation in mouse and human. *J. Clin. Invest.* 121:1456–1470. http://dx.doi.org/10.1172/JCI43242

ARTICLE 2 :

Jarid2 regulates NKT lymphomagenesis triggered by *Borrelia burgdoferi* chronic infection

Jarid2 regulates NKT lymphomagenesis triggered by *Borrelia burgdoferi* chronic infection

Rémy Robinot[1,2], Emmanuel Bachy[1-3], Mirjam Urb[1,2], Pierre Sujobert[1,3], Sylvain Carras[1,2], Amel Chebel[1,2], Dimitri Chartoire[1,2], Alexandra Traverse-Glehen[1,2,4], Patrice Marche[5], Philippe Gaulard[6-8], Isaac Engel[9], Mitchell Kronenberg[9], Benoit Jaulhac[10,11], Gilles Salles[1-3], Laurent Genestier[1,2]

[1]Inserm UMR-S1052, CNRS UMR 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France - Equipe Labéllisée LIGUE Contre le Cancer . [2]Faculté de Médecine Lyon-Sud, Oullins, France. [3]Department of Hematology, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. [4]Department of Pathology, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. [5]Institut Albert Bonniot, INSERM U823, Université J. Fourier, Grenoble, France. [6]Inserm U955, Créteil 94000, France. [7]Université Paris-Est, Créteil 94000, France. [8]Department of Pathology, AP-HP, Groupe Henri-Mondor Albert-Chenevier, Créteil, France. [9]Division of Developmental Immunology, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA 92037, USA. [10]Université de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, VBP EA 7290, Strasbourg, France. [11]French National Reference Center for Borrelia, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

Correspondence:

Laurent Genestier, CRCL, INSERM U1052.

Faculté de Médecine Lyon-Sud. 165, Chemin du petit Revoyet - BP 12, 69921 OULLINS Cedex, France.

Tel: +33 (0)4 2623 5981 / Fax: +33 (0)4 2623 5900

Email: laurent.genestier@inserm.fr

Abstract

Borrelia Burgdoferi (*Bb*), transmitted to human by *Ixodes* ticks bite, is the causative agent of Lyme disease, an emerging zoonose reported as the most important vector-borne diseases of the northern hemisphere. Despite accumulating data suggesting that chronic bacterial infections by *Bb* can promote B- and T-cell cutaneous lymphomas, no formal evidence was able to establish a direct link between *Bb* and lymphomagenesis. Here, we observed that *p53*-deficient mice infected with live *Bb* showed a significant increase incidence of peripheral T-cell lymphoma (PTCL) originating from CD1d-restricted natural killer T (NKT) cells. Chronicity of *Bb* infection is mandatory for PTCL-NKT development. According to this result, PTCL-NKT exhibited a phenotype of chronically TCR-activated NKT cells, characterized by upregulation of PD-1, loss of NK1.1 and a dependence on TCR/CD1d interaction for survival. Based on surface markers, transcription factors and cytokine production analyses, PTCL-NKT shared strong similarities with NKT2 subset, despite partial phenotypic deregulation. Whole-exome sequencing on 6 PTCL-NKT revealed recurrent large losses in chromosome 13 with a minimal deletion region including the epigenetic modifier gene *Jarid2,* confirmed in 92% (22/24) of PTCL-NKT. *Jarid2* expression as well as its function was profoundly impaired in PTCL-NKT. Our work thus represents the first demonstration of a direct role of *Bb* in T-cell lymphomagenesis and describes Jarid2 inactivation as PTCL-NKT molecular hallmark.

Introduction

Borrelia Burgdoferi (*Bb*), the causative agent of Lyme disease, is transmitted to human by *Ixodes* ticks bite. Lyme borreliosis is an emerging zoonose and the most important vector-borne diseases of the northern hemisphere with 30,000 cases per year in United States[1] and 65,000 cases per year in Europe[2]. After inoculation to its human host, a short clinically silent phase allows *Bb* to multiply locally, leading to a characteristic local cutaneous inflammation called *erythema migrans*. If left untreated by antibiotics, *Bb* can disseminate and induce systemic manifestations such as articular, neurological, cardiac or cutaneous symptoms[3]. Among the 20 species currently belonging to the *Bb* senso lato group, six have been recognized as pathogenic for humans. In the USA, *Bb* sensu stricto (ss) is the only species known as responsible for human disease. Conversely, five pathogenic *Bb* species have been identified in Europe: *B. afzelii*, *B. garinii* and *Bb*ss, are the three most frequently identified pathogenic agents. *B.garinii* most often induces neurologic manifestations, while *B.afzelii* is mainly responsible for skin disorders[4,5] and *Bb*ss the main cause of Lyme arthritis[6]. The association between chronic bacterial infections and lymphomas as been now suggested for a long time, but except for few pathologies (ie gastic B-cell lymphomas and *Helicobacter pylori* infection[7]), clinical and experimental data are lacking to affirm causative links. Different *Borrelia* strains have been variably associated with primary cutaneous lymphomas. This association has been suggested by the correlation occurring between cutaneous T- and B-cell lymphomas and acrodermatitis chronica atrophicans, a cutaneous manifestation of Lyme disease often marked by T-cell infiltration[8]. These results are almost exclusively reported under the form of case studies or small retrospective series of cutaneous lymphomas[9-13]. *Bb* DNA has been detected in 10%– 42% of patients with cutaneous mucosa-associated lymphoïd tissue (MALT) B-cell lymphomas, in 15%–26% of cases of cutaneous follicular and diffuse large B-cell lymphomas[10,11,13], and in 18% of mycosis fungoides diagnosed in some European

countries[12,14]. In contrast to these results, other American[15], European[16,17], and Asian[18] studies did not confirm these observations. Taken together, this incomplete evidence presently impairs our ability to show a definitive association between *Bb* and cutaneous lymphomas. Therefore, the development of animal models allowing to decipher the potential link between *Borrelia*-driven infection and lymphomagenesis is warranted.

Interestingly, *Bb* belongs to the few bacteria known to express glycolipids activating natural-killer T (NKT)-cells[19]. NKT cells are unconventional T cells, expressing a semi-invariant TCR chain composed of a rearrangement of Vα14-Jα18 chain, with restricted set of Vβ chains (Vβ2, Vβ7 and Vβ8) in mice[20]. Whereas conventional T cells recognize peptide fragments, iNKT cells recognize self- and microbial lipid-containing antigens presented by CD1d, a non-polymorphic MHC class Ib molecule[20]. We and others recently described T-cell lymphomas originating from NKT-cells in different mouse models[21-23]. Our data using $p53^{-/-}$ mice strongly suggested that these NKT-cell lymphomas are driven by chronic TCR activation[21]. We therefore wondered whether chronic *Borrelia* infection could drive NKT lymphomagenesis in $p53^{-/-}$ mice.

Here we bring the first direct evidence that *Bb* can favor the development of PTCL originating from NKT cells (PTCL-NKT). Chronic TCR stimulation of NKT cells by live spirochetes was required for *Bb* to increase PTCL-NKT rate since heat-inactivation of the bacteria or treatment of infected mice with antibiotics curtailed PTCL-NKT incidence. We also identified Jarid2, a epigenetic modifier gene, as the main hallmark of PTCL-NKT and proposed that its inactivation might contribute to the development of innate-like T-cell lymphomas in humans.

Methods

Mice

p53$^{-/-}$ mice (B6.129S2-Trp53^{tm1Tyj}/J) were purchased from The Jackson Laboratory. Mice were generated by crossing *p53*$^{-/-}$ mice with *p53*$^{+/-}$ and genotyping of offspings by PCR. *Cd1d*$^{-/-}$ mice (Cd1tm1Gru) were provided by L. Van Kaer (Howard Hughes Medical Institute, Nashville,TN). C57BL/6J WT mice were purchased from Charles River Laboratories. All mice were on the C57BL/6J background and were maintained in specific pathogen–free conditions at the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France). All studies and procedures were performed in accordance with European Union guidelines and approved by the local Animal Ethics Evaluation Committee (CECCAPP).

Borrelia burgdorferi infection models

Borrelia burgdorferi (*Bb*) *afzelii* IBS39 is an isolate from a patient with cutaneous lymphocytoma. Spirochetes were cultivated in Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) medium (Sigma) supplemented with 7% gelatine at 33°C under anaerobic conditions. Spirochetes count was performed by dark field microscopy using Petroff-Hausser counting slide before injection. Four to six-week-old WT or *p53*$^{-/-}$ mice were infected with 5.10^4 live spirochetes by intradermal injection of 100μL in the shaved back. Control mice were injected with the same volume of sterile BSK medium. Infection status was controlled by serological evidence of anti-*Bb* IgG at day 15 and 30 post-infection using ELISA tests. Animals negative for anti-*Bb* IgG antibodies were removed from the experiment. ELISAs were performed using spirochete lysate-coated plates blocked in PBS-milk. Diluted sera from infected mice were incubated, and anti-*Bb* IgG were then revealed using HRP-conjugated anti-IgG secondary Ab (Southern Biotech) and HRP substrate (Sigma-Aldrich).

Eradication of *Bb* with antibiotherapy was performed at 10 days post-infection by treating the mice with intraperitoneal injection of ceftriaxone (Sigma-Aldrich) at 25mg/kg in 500μL, twice a day during 5 days.

Inactivation of *Bb* was performed by heating live *Bb* 45min at 56°C. Inactivation and integrity of heat-killed (HK) *Bb* was checked by dark field microscopy observation. HK-*Bb* were injected as previously described for live *Bb*.

Leucocytes isolation and lymphoma cells purification

Mice were sacrificed and liver and spleen harvested. Livers were manually chopped and digested at 37°C in RPMI supplemented with 1mg/mL of collagenase 4 (Worthington) and 0,1mg/mL of DNaseI (Roche). Digested livers were mashed through cell strainer and leucocytes were purified by Percoll gradient. Spleens were mashed through cell strainer. Red blood cell lysis was performed using ACK (Ammonium-Chloride-Potassium) lysis buffer. Cell suspensions from lymphomatous liver or spleen were stained with αGalCer-CD1d-tetramers, then FACS-sorted after gating on tetramer-positive cells. Highly enriched (>95%) lymphoma cells where used for several DNA and RNA purification and Western Blot analysis.

Histology

Harvested liver and spleen biopsies were fixed in 4% formol then paraffin embedded. 4μm-thick sections were stained by HPS (hematoxylin phloxine saffron).

Flow cytometry

Single-cell suspensions prepared from spleen or liver were stained with a panel of fluorescently labeled antibodies. Data were collected using LSRII flow cytometers (BD) and

analyzed with FlowJo software (Tree Star). The following monoclonal Abs reactive with murine markers were purchased from BD: B220 (RA3-6B2), CCR6 (140706), CD3ε (145-2C11), CD4 (GK1.5), CD8α (53-6.7), CD19 (1D3), CD44 (IM7), CD49a (Ha31/8), ICOS (C3984A), NK1.1 (PK136), RORγT (Q31-378) and TCRγδ (GL3). T-bet (4B10) and Thy-1.2 (53-2.1) mAb were purchased from BioLegend. PD-1 (J43) and PLZF (Mags.21F7) were purchased from eBioscience. Anti-Histone H3 mono- (ab9045), di-(ab1220) and tri-(ab8898) methyl K9, and secondary Ab (ab150113) were purchased from Abcam. Antibodies were conjugated to FITC, AlexaFluor488, PE, PE-CF594, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5, APC, AlexaFluor647, APC-Cy7, BV421, BV605, BV796 or BUV395. For all antibodies, corresponding isotype controls were purchased from the same suppliers. Intranuclear stainings were performed using the FoxP3/Transcription factor staining buffer set from eBioscience. Results expressed in ΔMFI (mean fluorescence intensity) were obtained after subtraction of isotype control MFI from specific marker MFI. PE-, APC- and BV421-conjugated mouse αGalCer loaded CD1d-tetramers (PBS57) were obtained from the National Institutes of Health Tetramer Core Facility. Corresponding unloaded mouse CD1d-tetramers from the same supplier were used as control.

In vitro cytokine production assays

Lymphoma cells cryopreserved in FBS supplemented with 10% DMSO were thawed and cultured in 96 wells plates at 10^6 cells/mL (37°C with 5% CO_2) in RPMI (Gibco) supplemented with 10% FBS (Eurobio), 20mM HEPES, Penicilline/Streptomycine, 20μM β-mercoptoethanol, and 10ng/mL of murine IL-7 (Peprotech). Cells were activated with anti-murine CD3/CD28 Dynabeads (Gibco) using 1:1 beads-to-cells ratio. After 24h activation, culture supernatants were harvested for cytokine production measurement (IFN-γ, IL-4, IL-

17) using ELISA assays (ELISA MAX Deluxe, Biolegend) following manufacturer's instructions.

Lymphomas clonality assessment

DNA from lymphomatous livers or spleen were purified using NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel). Lymphoma clonality was determined using mTCRβ kit (ImmunoSEQ) following manufacturer's instructions. Resulting barcoded PCR products were sequenced by NGS using NextSeq 500/550 Mid Output kit (Illumina) and analyzed on ImmunoSEQ Analyzer 3.0 online platform.

Whole exome sequencing of murine NKTL

Whole exome sequencing (WES) analysis was performed on 6 lymphomas (highly infiltrated livers) and 6 non-tumoral tissues (ears) from corresponding mice. DNA were purified using NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel). Library preparation, exome capture, sequencing and data analyses have been done by IntegraGen SA (Evry, France). Genomic DNA was captured using Agilent in-solution enrichment methodology (SureSelect XT Mouse All Exon Kits, Agilent) with biotinylated oligonucleotides probes library (SureSelect XT Mouse All Exon Kits - 49.6 Mb, Agilent), followed by paired-end 75 bases massively parallel sequencing on Illumina HiSeq4000. Sequence capture, enrichment and elution were performed according to manufacturer's instruction and protocols (SureSelect, Agilent) without modification except for library preparation performed with NEBNext Ultra kit (New England Biolabs). For library preparation 600ng of each genomic DNA were fragmented by sonication and purified to yield fragments of 150-200bp. Paired-end adaptor oligonucleotides from the NEB kit were ligated on repaired, and tailed fragments were then purified and enriched by 8 PCR cycles. 1200ng of these purified Libraries were then hybridized to the

SureSelect oligo probe capture library for 72 hr. After hybridization, washing, and elution, the eluted fraction was PCR-amplified with 9 cycles, purified and quantified by qPCR to obtain sufficient DNA template for downstream applications. Each eluted-enriched DNA sample were then sequenced on an Illumina HiSeq4000 as paired-end 75b reads. Image analysis and base calling were performed using Illumina Real Time Analysis (2.7.6) with default parameters.

WES analysis

Sequencing results were analyzed by IntegraGen SA (Evry, France). Base calling was performed using the Real-Time Analysis software sequence pipeline (2.7.6) with default parameters. Sequence reads were mapped to the mouse genome build (mm10/GRCh38) using Elandv2e (Illumina, CASAVA1.8.2) allowing multiseed and gapped alignments. The duplicated reads (e.g. paired-end reads in which the insert DNA molecule showed identical start and end locations in the mouse genome) were removed. CASAVA1.8.2 was used to call single-nucleotide variants (SNVs) and short insertions/deletions (max. size is 300nt), taking into account all reads per position. Indels with Q(Indel) <20, or regions with low mappability (QVCutoff <90) were filtered out. The frequency with which single base differences are expected between two unrelated haplotype (Theta parameter) is 0.001. An in-house algorithm compared normal and tumor genotypes from exome sequencing data to determine the somatic nature of the variation. A somatic score was calculated for each variant ranging from 1 to 30, a score of 30 translating the highest confidence index. This score takes into account the frequencies and counts of mutated allele in both samples to minimize false positive variations. Finally, variants displaying mutated reads in the constitutional sample above 5 percent were considered as germline or false positive and eliminated to the somatic tab. The somatic variant caller handles indels similarly, analyzing the number of alignments covering a given position

that included a particular indel (the variant count) versus the overall coverage at that position. Variants annotation takes into account data available in dbSNP (dbSNP144). Functional consequences of variants on genes, transcripts, and protein sequence, as well as regulatory regions, were predicted by Variant Effect Predictor (VEP release 83) (stop, splicing, missense, synonymous...), as well as by location of the variants (e.g. upstream of a transcript, in coding sequence, in non-coding RNA, in regulatory regions). Regarding missense changes, one bioinformatics predictions for pathogenicity was available PolyPhen (2.2.2). Other information like quality score, homozygote/heterozygote status, count of variant allele reads, mutation type (somatic or germline) and somatics score, the presence of the variant in the COSMIC database (version71) were reported.

To investigate genomic copy number aberrations (CNA) (e.g. copy number gains and copy number losses), the Bioconductor DNACopy package (DNAcopy 1.32.0) was used by comparing tumor from each sample to the normal DNA exome data. It implements the circular binary segmentation (CBS) algorithm to segment DNA copy number data.

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analysis of CNV

DNA from lymphomas and matched non-tumoral tissues were purified using NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel). Based on WES CNV results, MLPA probes were designed for *Jarid2* and 4 more genes covering the chromosome 13 (*Exoc2*, *1700029N11Rik*, *Dtnbp1* and *Kif27*) plus 4 invariant control genes (*Tmem200a*, *Zeb2*, *Abat*, *Gin1*) using MLPA Designer software (Premier Biosoft) and following MRC-Holland recommendations. Probes sequences are summarized in supplementary methods. MLPA was performed following manufacturer's instruction and products (MRC-Holland). Briefly, 50ng of genomic DNA were denatured then hybridized overnight with MLPA probes-mix. Hybridized probes were ligated and amplified using the universal PCR primers pair (supplementary methods). PCR products were separated

and visualized by capillary electrophoresis on a 3500DX Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Peaks height were measured using Gene Mapper software. The mean value of peak heights of invariant genes was used for intersample normalization. Then, the log2 value of normalized pic height was used to take into account the exponential PCR amplification. Finally, a Z-score was used to determine the probability of the observed value to come from the distribution of normal samples. Z score was calculated as following: $Z = (V-V_{NON-TUM}) / SD_{NON-TUM})$. V is the log2 of normalized peak height, $V_{NON-TUM}$ the mean of V in non-tumoral samples and $SD_{NON-TUM}$ the standard deviation among non-tumoral samples. A Z-score ≥ 2 was considered as a copy loss or gain.

Sanger sequencing of Jarid2

Purified genomic DNAs from enriched lymphoma cells (>90%) were amplified by PCR reactions targeting each 18 exons and untranslated regions of *Jarid2*, using Expand Long Template polymerase (Roche). PCR products were Sanger-sequenced and mutations detected using SnapGene software. PCR primers are summarized in supplementary methods.

Western Blot

Whole cell extracts were prepared from highly enriched lymphoma cells (>90%) using EDTA-free cOmplete lysis protease inhibitor cocktail (Roche). 40μg of lysates were denatured 10min at 95°C in NuPAGE buffer (Invitrogen) and run on a 4-12% gradient SDS-PAGE. Proteins were dry-transferred on nitrocellulose membrane using iBlot2 (Life). Membranes were blocked in milk. The primary Ab used were anti-Jarid2 (NB100-2214, Novus Biologicals) and anti-GAPDH (Cell Signaling). Proteins of interest were revealed using HRP-conjugated secondary antibody (GE Healthcare) and HRP substrate Luminata Forte (Millipore). Membranes were read on a C300 imaging system (Azure Biosystems).

Reverse Transcritpion-quantitative PCR

Freshly highly enriched or FACS sorted lymphoma cells were frozen in trizol (Life) and stored at -80°C until extraction. RNAs were extracted by trizol/chloroform protocol. cDNAs were synthetized by reverse transcription using M-MLV RT (Invitrogen) and oligo dT15 (Roche). qPCR was performed using designed primers from QuantiTect kits (Qiagen). qPCR were run on AriaMx RT-PCR system (Agilent Technologies). Expression was normalized on one housekeeping gene (HPRT).

Statistical analyses

All analyses were performed using Prism 6.0 (GraphPad Software). In all figures, histograms represent mean and error bars represent SD. Comparisons of lymphoma spectrum were made with the χ^2 test for categorical variables, and with Mann-Whitney nonparametric test for continuous parameters. Survival curves were constructed with the Kaplan-Meier method. All tests were two-sided and p values of <0.05 were considered statistically significant.

Results

Bb infection increases NKT-cell lymphomas development in p53$^{-/-}$ mice.

To explore the role of *Bb* in T-cell lymphomagenesis, we infected *p53*$^{-/-}$ mice with a *Bb* IBS39 strain isolated from a patient whose infection induced lymphocytosis (n=34) or with the *Bb* culture medium (BSK medium) (uninfected group) (n=39). Injections of live spirochetes (5.10^4 / mouse) or medium alone were carried out intradermally in order to mimic the tick bites and consequently the natural infection. In order to verify the mice infection, blood was collected at day 15 and day 30 after injection and ELISAs were performed to demonstrate the presence of anti-*Borrelia* IgG. Of 34 mice injected with *Bb*, 29 were positive for the presence of anti-*Borrelia* IgG at the two time points, confirming the infection. The survival curve of these mice indicates a median survival of 158 days (Figure 1A), which is not significantly different from uninfected *p53*$^{-/-}$ mice (median survival = 168 days). Among the tumors developed in *Borrelia*-infected mice, almost 50% developed PTCLs, compared with only 32% in the uninfected group (Figure 1A). Macroscopically, these PTCLs were characterized by hepatomegaly and splenomegaly with an increased number of lymphocytes per liver and spleen of 58 fold and 4 fold respectively, compared with healthy mice (Figure 1B). The architecture of spleen and liver from PTCLs mice was nodular and diffuse, with massive cell infiltration leading to the effacement of the normal structure (Fig. 1C). The infiltrate in the liver was massively perivascular but also intrasinusoïdal, the preferential localization of normal NKT cells in the liver. To determine the NKT-cell origin of these PTCLs, we studied the binding of CD1d-tetramer loaded with αGalCer on PTCL cell suspensions. A set of PTCLs was characterized by positive CD1d-tetramer staining, revealing their NKT-cell origin (PTCL-NKT), whereas another set of PTCLs was negative defining conventional PTCL (PTCL-T) (Figure 1D and Table 1). As shown in Figure 1E, *Bb* infection significantly increased the percentage of PTCL-NKT (94% in *Bb*-infected group vs 61% in uninfected

group among all PTCLs), whereas PTCL-T were decreased, compared with uninfected group. The NKT-cell origin of these PTCLs was further validated by the expression of the invariant Vα14-Jα18 rearrangement of the TCRα chain and by the clonal rearrangement of TCRβ chain with only Vβ7, Vβ8.2 and Vβ8.3 rearrangements (Table 1).

Chronic infection is mandatory for NKT-cell lymphomagenesis driven by *Bb*.

To decipher the role of chronic infection by *Bb* in the PTCL-NKT development, we studied PTCL-NKT incidence in different experimental conditions, as well as the persistence of anti-*Borrelia* IgG, since these Abs play an important role in controlling spirochetes[24]. *p53*$^{-/-}$ mice infected with live *Bb* produced high and long-term persistent anti-*Borrelia* IgG levels (>120 days) (Figure 2A) and developed significantly more PTCL-NKT, compared with uninfected mice (p=0.023) (Figure 2B). Conversely, mice injected with heat-killed (HK) *Bb* or infected with *Bb* and then treated with antibiotics (ceftriaxone for 5 days) in order to eradicate bacteria[25], did not produce long-term persisting anti-Borrelia IgG (Figure 2A) and showed no increased incidence of PTCL-NKT (Figure 2B). These results demonstrated the importance of the persistence of *Bb* infection and therefore chronicity of the infection in the PTCL-NKT development. PTCL-NKT showed downregulated NK1.1 and increased PD-1 expression, two characteristic of chronically activated NKT lymphocytes[26,27], reinforcing the role of chronic infection by *Bb* in NKT lymphomagenesis in this model (Figure 2C). To further study the role of chronic TCR stimulation in NKT lymphomagenesis, we chronically injected *p53*$^{-/-}$ mice with αGalCer, a prototypic Ag that triggers TCR-dependent activation of NKT cells. In this condition, αGalCer injections significantly increased the incidence of PTCL-NKT (Figure 2D), showing that NKT lymphomagenesis is driven through chronic TCR activation by glycolipids.

Normal iNKT cells persist *in vivo* in the absence of TCR/CD1d interactions[28,29]. Conversely,

during chronic infections, such as human immunodeficiency virus or hepatitis C virus infections, the survival of antigen-specific memory T cells relies on the persistence of cognate antigens through repeated TCR engagements[30]. Whether this also applies to chronically activated iNKT cell survival is unknown. To investigate the importance of CD1d-mediated TCR engagement in PTCL-NKT survival, we transferred NKT lymphoma cells into *CD1d*$^{-/-}$ recipient mice. All WT recipients developed enlarged liver and spleen and succumbed to lymphoma by day 63, whereas all *CD1d*$^{-/-}$ remained healthy (Figure 2E). Liver cellularity increased significantly in WT recipient mice with NKT lymphoma cells representing 92 to 95% of total liver cells whereas they were undetectable in *CD1d*$^{-/-}$ recipient mice (Figure 2F). This addiction to CD1d/TCR interaction strongly suggests that PTCL-NKT has been driven by chronic TCR stimulation.

PTCL-NKT exhibited a dysregulated profile of NKT subset.

As conventional T lymphocytes, NKT cells differentiate into NKT1, NKT2 and NKT17. These different subsets can be first defined by their cytokine secretion profile: IFNγ, IL-4 and IL-17, respectively. After activation with anti-CD3/CD28-coated beads, some PTCL-NKT expressed a NKT1 (number 8), NKT2 (numbers 3 and 13), or NKT17 (numbers 16, 19 and 28) cytokine profile, but we also identified PTCL-NKT with mixed subtype profiles, producing IL-4 and IL-17 (number 15), IL-4 and IFNγ (number 1), IFNγ and IL-17 (number 20) or all three cytokines (numbers 17, 23, 26 and 27). Expression of surface markers such as CD49a, ICOS and CCR6[31-33] and transcription factors such as T-bet, PLZF and RORγt[31] have also been described to discriminate these three NKT subsets. Although the expression of these markers and transcription factors have been preferentially used in the thymus, they were found to be very useful to delineate normal NKT1, NKT2 and NKT17 in the periphery (Figure 3B). PTCL-NKT showed low expression of CD49a, a marker defining NKT1 subset,

and no expression of CCR6, a marker defining NKT17. However, PTCL-NKT showed a very high expression of ICOS, also preferentialy defining NKT2 and NKT17 (Figure 3B). The level of ICOS expression is 5 to 10 fold higher in PTCL-NKT compared to normal NKT17, which could be explained by dysregulation of ICOS expression during NKT-cell lymphomagenesis. This also suggests an important role of this co-stimulatory pathway in PTCL-NKT biology, in particular NKT-cell survival, as previously reported for normal NKT[34]. Expression of the transcription factors defining NKT subsets in PTCL-NKT was also surprising since some of them expressed high level of T-bet and/or RORγt, whereas all highly expressed PLZF (Figure 3C and Supplementary Figure 1A). Such PLZF overexpression might explain the high ICOS level observed, since PLZF is known as an inducer of ICOS expression[35,36]. To better understand these results, we sought to analyse the correlation between transcription factors expression and associated cytokine production (IFNγ/T-bet for NKT1, IL-4/PLZF for NKT2 and RORγT/IL-17 for NKT17). Weak correlation for NKT1 or no correlation for NKT2 and NKT17 were found, indicating a dysregulated phenotype in PTCL-NKT (Supplementary Figure 1B). We finally tried to classify these PTCL-NKT using unsupervised hierarchical clustering based on surface markers and transcription factors expression. All PTCL-NKT, except two, clustered with normal NKT2 cells (Figure 3D), suggesting that based on these criteria PTCL-NKT shared strong similarities with NKT2 subset. Altogether, these results suggested that PTCL-NKT showed a dysregulated profile of NKT subset with a NKT2 bias.

Deletions and mutations of Jarid2 are the most frequent genomic alterations in PTCL-NKT.

To characterize the genomic landscape of PTCL-NKT, we performed whole-exome sequencing on 6 tumors along with paired normal samples. Mean exome sequencing depth

was greater than 85x, with around 92% of the target sequence covered by at least 25 reads. Copy number analysis derived from WES data identified multiple regions of frequent monoallelic gains and losses. In particular, we observed a trisomy of chromosome 9 on all PTCL-NKT, gains in chromosome 17 (5 out of 6) and 11 (4/6), and a recurrent loss of chromosome 13. Three minimal deletions of regions 13qA4-A5, 13qB3-C1 and 13qC1-C3, representing 124, 11, and 11 genes respectively, have been identified (Figure 4A, supplementary table 1). Among all these deleted genes, *Jarid2* was of particular interest since it plays a central role in NKT cell biology[37]. Copy number analysis of the chromosome 13 using MLPA confirmed *Jarid2* loss in 92% of a larger cohort of PTCL-NKT (n=24), whereas the 4 other genes *Dtnbp1 and Rik* (first 5' and 3' genes surrounding *Jarid2,* respectively) and *ExoC2* and *Kif27* (both not present in the 13q minimal deleted region) were deleted in 67%, 63%, 42% and 38%, respectively, demonstrating that *Jarid2* was the most deleted tested gene in PTCL-NKT (Figure 4B, right panel).

SNV and Indels analysis of WES identified a mean of 67 (range 60-77) somatic non-synonymous mutations per lymphoma. Since we performed only 6 WES, only few reccurent mutations were identified, but significantly enriched gene clusters were recognized among cation channels, epigenetic modifiers and DNA/RNA helicases pathways (Figure 4C). A non sense mutation in the start codon of *Jarid2* on the remaining allele of one PTCL-NKT was also identified (Figure 4C). We therefore performed Sanger sequencing of the 18 *Jarid2* exons in all PTCL-NKT. We confirmed the nonsense mutation in the start codon of PTCL-NKT#12 identified by WES but did not find mutation in the 25 other PTCL-NKT tested.

Loss of function of Jarid2 in PTCL-NKT

Jarid2 is a direct binding partner of SETDB1, an histone lysine methyltransferase that allows gene repression by the di- and trimethylation of lysine 9 of histone H3 (H3K9)[38]. Jarid2

represses the Zbtb16 gene promoter, therefore *Jarid2* deficient mice in the T-cell compartment showed high expression of PLZF in NKT cells and an expansion of peripheral NKT cells[37]. We first investigated whether deletions and/or mutations of *Jarid2* impacted the expression of Jarid2 mRNA and protein in PTCL-NKT. As shown in Figure 5A, 24 out of 26 PTCL-NKT tested have significantly downregulated Jarid2 mRNA level compared with both resting and activated normal NKT cells. This result was confirmed at the protein level since 4 out of 9 PTCL-NKT tested showed absence of Jarid2 protein expression, compared with normal T lymphocytes (Figure 5B). Funtional inactivation of Jarid2 was first suggested by the very high expression of PLZF in most PTCL-NKT (Figure 3B). To further study the functional consequences of *Jarid2* alterations, we measured by flow cytometry the level of total H3K9me3 versus H3K9me1 using specific antibodies for these different methylated H3K9 forms. The H3K9me3/me1 ratio was significantly reduced in PTCL-NKT compared with normal NKT cells (Figure 5C), supporting a direct correlation between Jarid2 genetic alterations, protein downregulation and loss of function in PTCL-NKT.

Discussion

Peripheral T-cell lymphoma (PTCL) are diverse, comprising more than 25 post-thymic (ie mature) T or NK-cell-derived entities according to the current 2016 WHO classification of lymphomas[39]. They represent around 15% of all NHL in Western countries. Cutaneous mycosis fungoides (MF) and Sézary syndrome (SS) neoplasms are the most prevalent PTCL and are associated with *Bb* infection, since *Bb* DNA has been detected in up to 18% of cases in some European countries[12,14]. In this report, we described that *Bb* infection increased the incidence of PTCL originating from unconventional CD1d-restricted NKT cells. Several evidences led us to speculate that at least some PTCL, and in particular SS and/or MF, may originate from unconventional T cells such as NKT or MAIT cells. First, recent data indicated that the transcription factor PLFZ, the master gene of unconventional T cell differentiation, could be overexpressed in human T-cell lymphomas/leukemias such as MF and SS[40]. These preliminary data have been challenged by Jeon *et al.*[41] based on the expression of PLZF determined by immunohistochemistry in PTCL-NOS or cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). In a series of 588 hematological malignancies, they have found an expression of PLZF in 27/54 cases of lymphoblastic T-cell leukemia/lymphoma, 1/51 cases of PTCL-NOS and 1/13 cases of CTCL (including 9 cases expressing a TCRβ chain). To identify NKT population, Vα24 PCR were performed in the case of PTCL-NOS and the case of CTCL (MF) positive for PLZF by immunohistochemistry and all were negative. A similar approach was used to identify 2/26 lymphomas originating from MAIT cells in PLZF-expressing PTCL-NOS[42]. Second, CD1d expression level in non-tumoral peripheral blood mononuclear cells was described as one of the top 5 genes permitting the most accurate diagnosis of SS[43]. 107:3189). Finally, *Jarid2* deletions have been identified in 20% of SS[44] and mice deficient for *Jarid2* in the T-cell compartment showed an increased proportion of NKT cells in the periphery. Since Vß and, to a lesser extent, V α repertoire in T-cell malignancies have been investigated and

no semi-invariant chain usage has been observed in a specific entity, it is unlikely that human PTCL and SS in particular could derive from invariant NKT cells. Rather, they could derive from type II NKT cells, known to express a diverse Vα and Vß TCR repertoire[45,46]. Such a difference between the p53-deficient mouse model and humans might be explained by the higher prevalence of type II NKT in humans[47,48].

Our data strongly support the role of chronic TCR stimulation in NKT-cell lymphomagenesis triggered by *Bb*. Indeed, we demonstrated that: i) live spirochetes were required for NKT lymphomagenesis since inactivation of the bacteria or treatment of infected mice with antibiotics, eliminating *Bb,* prevented the increased incidence of PTCL-NKT; ii) lymphoma cells showed downregulated NK1.1 and increased PD-1 expression, two characteristic of chronically TCR-activated NKT cells; iii) chronic injection of αGalCer, a prototypic Ag that triggers TCR-dependent activation of NKT cells, increased significantly the incidence of PTCL-NKT; iv) engraftments of PTCL-NKT into *Cd1d*$^{-/-}$ mice completely inhibited lymphoma development. The importance of the chronic TCR stimulation in human T-cell lymphomagenesis has been highlighted in several reports, such as entheropathy associated T-cell lymphoma (EATL), T-cell large granular lymphocytic leukemia (T-LGL), hepatosplenic T-cell lymphoma (HSTL) and MF/SS[12,49-51]. In addition, recent data from mouse models indicated that constitutive TCR signaling by the fusion kinase ITK-SYK drives transformation of mature T cells[52,53]. *SNF5*$^{-/-}$ mice also develop TCR-dependent PTCL arising from a peculiar CD8^{+}CD122^{lo} memory T cell population[54].

Lyme disease can be successfully treated with *Borrelia* eradication with specific antibiotics, which is particularly evident for Borrelial lymphocytoma, a cutaneous manifestation of Lyme disease[55,56] that is suggested to be associated with cutaneous lymphomas. The present results suggested that *Bb* infection should be investigated and, if present, eradicated in patients with

cutaneous lymphomas. If fact, this strategy has already been apply for cutaneous MALT lymphoma with few cases responding to antibiotics[11,57-59].

Our study also provides a comprehensive genomic characterization of PTCL-NKT with the identification of recurrent alterations of the *Jarid2* gene by mutations and/or deletion of the corresponding locus in chromosome 13 in >90% (22/24 cases), bringing to the light a previously unexplored genetic player in the pathogenesis of PTCL. Only 1/26 PTCL-NKT showed biallelic inactivation of *Jarid2* with monoallelic deletion of *Jarid2* locus and mutation in the remaining allele, suggesting that haploinsufficiency of Jarid2 would be enough for NKT-cell lymphomagenesis.

Jarid2 encodes a member of the Jumonji family that negatively regulates targeted gene transcription by associating with histone methyltransferase complexes such as PRC2 or SETDB1[38,60,61]. *Zbtb16* promoter constitutes a target regulated by the SETDB1/Jarid2 complex, leading to repression of PLZF expression at the transition from immature to mature stages of NKT cell development[37]. PTCL-NKT display a NKT2-like phenotype as described in NKT cells from mice lacking *Jarid2* in T cells ($CD44^+$, $NK1.1^-$ and PLZF high)[37]. Two main hypotheses may explain the NKT2-like phenotype of PTCL-NKT. First this phenotype is the result of PLZF expression persistence, caused by loss of *Jarid2* repressing activity on *Zbtb16* promoter in immature NKT cells, driving strong developmental bias towards NKT2. Second, *Jarid2* deletion may occur in any mature NKT subsets (NKT1, NKT2 or NKT17), explaining the NKT2-like profile mixed with other subset features observed in a large set of PTCL-NKT. This NKT2 phenotype would favor NKT-cell lymphomagenesis by increasing expression of genes involved in cell-cycle-control, mitosis, signaling via the tumor suppressor p53 and DNA replication, indicating that NKT2 cells are actively dividing cells[62].

JARID2 gene is altered in several human hematological malignancies such as leukemic transformation of chronic myeloid malignancies, adult T-cell acute leukemia and SS where it

has been found deleted and/or mutated in >20%[44,63,64].

In conclusion, our study brings the first direct evidence that *Bb* can trigger PTCL in an animal model. The main features of these PTCL were their CD1d-restriction and Vα14-Jα18 rearrangement of the TCRα chain, defining an NKT cell origin. Chronic TCR stimulation of NKT cells by live spirochetes was required for NKT lymphomagenesis and TCR/CD1d interactions were instrumental for PTCL-NKT survival. The present results suggested that *Bb* infection should be investigated and, if present, eradicated in patients with cutaneous lymphomas. Our study also uncovers a unique genetic profile of PTCL-NKT characterized by highly recurrent *Jarid2* alterations, demonstrating the plausible oncogenic role of epigenetic deregulation in this neoplasia and opening new avenues for the development of targeted therapies representing a highly unmet medical need for PTCL patients.

References

1. Piesman J, Eisen L. Prevention of tick-borne diseases. *Annu Rev Entomol*. 2008;53(1):323-343. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093429.

2. Hubálek Z. Epidemiology of lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol*. 2009;37:31-50. doi:10.1159/000213069.

3. Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(8):1093-1101. doi:10.1172/JCI21681.

4. Balmelli T, Piffaretti JC. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of Borrelia burgdorferi sensu lato. *Res Microbiol*. 1995;146(4):329-340.

5. Lenormand C, Jaulhac B, De Martino S, Barthel C, Lipsker D. Species of Borrelia burgdorferi complex that cause borrelial lymphocytoma in France. *Br J Dermatol*. 2009;161(1):174-176. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09100.x.

6. Radolf JD, Caimano MJ, Stevenson B, Hu LT. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(2):87-99. doi:10.1038/nrmicro2714.

7. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori. *Lancet*. 1993;342(8871):575-577.

8. Buechner SA, Rufli T, Erb P. Acrodermatitis chronic atrophicans: a chronic T-cell-mediated immune reaction against Borrelia burgdorferi? Clinical, histologic, and immunohistochemical study of five cases. *J Am Acad Dermatol*. 1993;28(3):399-405.

9. Schöllkopf C, Melbye M, Munksgaard L, et al. Borrelia infection and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008;111(12):5524-5529. doi:10.1182/blood-2007-08-109611.

10. Cerroni L, Zöchling N, Pütz B, Kerl H. Infection by Borrelia burgdorferi and cutaneous B-cell lymphoma. *J Cutan Pathol*. 1997;24(8):457-461.

11. la Fouchardiere de A, Vandenesch F, Berger F. Borrelia-associated primary cutaneous MALT lymphoma in a nonendemic region. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(5):702-703.

12. Tothova SM, Bonin S, Trevisan G, Stanta G. Mycosis fungoides: is it a Borrelia burgdorferi-associated disease? *Br J Cancer*. 2006;94(6):879-883. doi:10.1038/sj.bjc.6602997.

13. Goodlad JR, Davidson MM, Hollowood K, et al. Primary cutaneous B-cell lymphoma and Borrelia burgdorferi infection in patients from the Highlands of Scotland. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(9):1279-1285.

14. Bonin S, Tothova SM, Barbazza R, Brunetti D, Stanta G, Trevisan G. Evidence of multiple infectious agents in mycosis fungoides lesions. *Exp Mol Pathol*.

2010;89(1):46-50. doi:10.1016/j.yexmp.2010.05.001.

15. Wood GS, Kamath NV, Guitart J, et al. Absence of Borrelia burgdorferi DNA in cutaneous B-cell lymphomas from the United States. *J Cutan Pathol*. 2001;28(10):502-507.

16. Goteri G, Ranaldi R, Simonetti O, et al. Clinicopathological features of primary cutaneous B-cell lymphomas from an academic regional hospital in central Italy: no evidence of Borrelia burgdorferi association. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(11):2184-2188. doi:10.1080/10428190701618250.

17. Ponzoni M, Ferreri AJM, Mappa S, et al. Prevalence of Borrelia burgdorferi infection in a series of 98 primary cutaneous lymphomas. *Oncologist*. 2011;16(11):1582-1588. doi:10.1634/theoncologist.2011-0108.

18. Li C, Inagaki H, Kuo T-T, Hu S, Okabe M, Eimoto T. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a molecular and clinicopathologic study of 24 asian cases. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(8):1061-1069.

19. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, et al. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol*. 2006;7(9):978-986. doi:10.1038/ni1380.

20. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711.

21. Bachy E, Urb M, Chandra S, et al. CD1d-restricted peripheral T cell lymphoma in mice and humans. *Journal of Experimental Medicine*. 2016;213(5):841-857. doi:10.1084/jem.20150794.

22. Li J, Roy S, Kim Y-M, et al. Id2 Collaborates with Id3 To Suppress Invariant NKT and Innate-like Tumors. *The Journal of Immunology*. 2017;198(8):3136-3148. doi:10.4049/jimmunol.1601935.

23. Tsagaratou A, González-Avalos E, Rautio S, et al. TET proteins regulate the lineage specification and TCR-mediated expansion of iNKT cells. *Nat Immunol*. 2017;18(1):45-53. doi:10.1038/ni.3630.

24. McKisic MD, Barthold SW. T-cell-independent responses to Borrelia burgdorferi are critical for protective immunity and resolution of lyme disease. *Infection and Immunity*. 2000;68(9):5190-5197.

25. Bockenstedt LK, Gonzalez DG, Haberman AM, Belperron AA. Spirochete antigens persist near cartilage after murine Lyme borreliosis therapy. *J Clin Invest*. 2012;122(7):2652-2660. doi:10.1172/JCI58813.

26. Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagómez D, et al. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(19):10913-10918. doi:10.1073/pnas.1833166100.

27. Chang W-S, Kim J-Y, Kim Y-J, et al. Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT

cell anergy. *The Journal of Immunology*. 2008;181(10):6707-6710.

28. Vahl JC, Heger K, Knies N, et al. NKT cell-TCR expression activates conventional T cells in vivo, but is largely dispensable for mature NKT cell biology. Marrack P, ed. *PLoS Biol*. 2013;11(6):e1001589. doi:10.1371/journal.pbio.1001589.

29. Matsuda JL, Gapin L, Sidobre S, et al. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat Immunol*. 2002;3(10):966-974. doi:10.1038/ni837.

30. Shin H, Blackburn SD, Blattman JN, Wherry EJ. Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J Exp Med*. 2007;204(4):941-949. doi:10.1084/jem.20061937.

31. Lee YJ, Holzapfel KL, Zhu J, Jameson SC, Hogquist KA. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nat Immunol*. 2013;14(11):1146-1154. doi:10.1038/ni.2731.

32. Watarai H, Sekine-Kondo E, Shigeura T, et al. Development and function of invariant natural killer T cells producing T(h)2- and T(h)17-cytokines. Marrack P, ed. *PLoS Biol*. 2012;10(2):e1001255. doi:10.1371/journal.pbio.1001255.

33. Doisne J-M, Becourt C, Amniai L, et al. Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor (gamma)t+ and respond preferentially under inflammatory conditions. *The Journal of Immunology*. 2009;183(3):2142-2149. doi:10.4049/jimmunol.0901059.

34. Akbari O, Stock P, Meyer EH, et al. ICOS/ICOSL interaction is required for CD4+ invariant NKT cell function and homeostatic survival. *J Immunol*. 2008;180(8):5448-5456.

35. Mao A-P, Constantinides MG, Mathew R, et al. Multiple layers of transcriptional regulation by PLZF in NKT-cell development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(27):7602-7607. doi:10.1073/pnas.1601504113.

36. Gleimer M, Boehmer von H, Kreslavsky T. PLZF Controls the Expression of a Limited Number of Genes Essential for NKT Cell Function. *Front Immunol*. 2012;3:374. doi:10.3389/fimmu.2012.00374.

37. Pereira RM, Martinez GJ, Engel I, et al. Jarid2 is induced by TCR signalling and controls iNKT cell maturation. *Nat Commun*. 2014;5:4540. doi:10.1038/ncomms5540.

38. Mysliwiec MR, Carlson CD, Tietjen J, Hung H, Ansari AZ, Lee Y. Jarid2 (Jumonji, AT rich interactive domain 2) regulates NOTCH1 expression via histone modification in the developing heart. *J Biol Chem*. 2012;287(2):1235-1241. doi:10.1074/jbc.M111.315945.

39. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390. doi:10.1182/blood-2016-01-643569.

40. Pomerantz RG, Mirvish ED, Erdos G, Falo LD, Geskin LJ. Novel approach to gene expression profiling in Sézary syndrome. *Br J Dermatol*. 2010;163(5):1090-1094.

doi:10.1111/j.1365-2133.2010.09973.x.

41. Jeon YK, Go H, Nam SJ, et al. Expression of the promyelocytic leukemia zinc-finger in T-lymphoblastic lymphoma and leukemia has strong implications for their cellular origin and greater association with initial bone marrow involvement. *Mod Pathol*. 2012;25(9):1236-1245. doi:10.1038/modpathol.2012.82.

42. McGregor S, Shah A, Raca G, et al. PLZF staining identifies peripheral T-cell lymphomas derived from innate-like T-cells with TRAV1-2-TRAJ33 TCR-α rearrangement. *Blood*. 2014;123(17):2742-2743. doi:10.1182/blood-2014-02-555482.

43. Nebozhyn M, Loboda A, Kari L, et al. Quantitative PCR on 5 genes reliably identifies CTCL patients with 5% to 99% circulating tumor cells with 90% accuracy. *Blood*. 2006;107(8):3189-3196. doi:10.1182/blood-2005-07-2813.

44. Kiel MJ, Sahasrabuddhe AA, Rolland DCM, et al. Genomic analyses reveal recurrent mutations in epigenetic modifiers and the JAK-STAT pathway in Sézary syndrome. *Nat Commun*. 2015;6:8470. doi:10.1038/ncomms9470.

45. Chiu YH, Jayawardena J, Weiss A, et al. Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments. *J Exp Med*. 1999;189(1):103-110.

46. Behar SM, Podrebarac TA, Roy CJ, Wang CR, Brenner MB. Diverse TCRs recognize murine CD1. *J Immunol*. 1999;162(1):161-167.

47. Exley MA, Tahir SM, Cheng O, et al. A major fraction of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can suppress mixed lymphocyte responses. *J Immunol*. 2001;167(10):5531-5534.

48. Arrenberg P, Halder R, Kumar V. Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J Cell Physiol*. 2009;218(2):246-250. doi:10.1002/jcp.21597.

49. Garrido P, Ruiz-Cabello F, Bárcena P, et al. Monoclonal TCR-Vbeta13.1+/CD4+/NKa+/CD8-/+dim T-LGL lymphocytosis: evidence for an antigen-driven chronic T-cell stimulation origin. *Blood*. 2007;109(11):4890-4898. doi:10.1182/blood-2006-05-022277.

50. Murray A, Cuevas EC, Jones DB, Wright DH. Study of the immunohistochemistry and T cell clonality of enteropathy-associated T cell lymphoma. *Am J Pathol*. 1995;146(2):509-519.

51. Belhadj K, Reyes F, Farcet J-P, et al. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: report on a series of 21 patients. *Blood*. 2003;102(13):4261-4269. doi:10.1182/blood-2003-05-1675.

52. Dierks C, Adrian F, Fisch P, et al. The ITK-SYK fusion oncogene induces a T-cell lymphoproliferative disease in mice mimicking human disease. *Cancer Res*. 2010;70(15):6193-6204. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3719.

53. Pechloff K, Holch J, Ferch U, et al. The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell

receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma. *Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(5):1031-1044. doi:10.1084/jem.20092042.

54. Wang X, Werneck MBF, Wilson BG, et al. TCR-dependent transformation of mature memory phenotype T cells in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3834-3845. doi:10.1172/JCI37210.

55. Picken RN, Strle F, Ruzic-Sabljic E, et al. Molecular subtyping of Borrelia burgdorferi sensu lato isolates from five patients with solitary lymphocytoma. *J Invest Dermatol*. 1997;108(1):92-97.

56. Jelić S, Filipović-Ljesković I. Positive serology for Lyme disease borrelias in primary cutaneous B-cell lymphoma: a study in 22 patients; is it a fortuitous finding? *Hematol Oncol*. 1999;17(3):107-116.

57. Kütting B, Bonsmann G, Metze D, Luger TA, Cerroni L. Borrelia burgdorferi-associated primary cutaneous B cell lymphoma: complete clearing of skin lesions after antibiotic pulse therapy or intralesional injection of interferon alfa-2a. *J Am Acad Dermatol*. 1997;36(2 Pt 2):311-314.

58. Grange F, Wechsler J, Guillaume J-C, et al. Borrelia burgdorferi-associated lymphocytoma cutis simulating a primary cutaneous large B-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol*. 2002;47(4):530-534.

59. Roggero E, Zucca E, Mainetti C, et al. Eradication of Borrelia burgdorferi infection in primary marginal zone B-cell lymphoma of the skin. *Hum Pathol*. 2000;31(2):263-268.

60. Landeira D, Sauer S, Poot R, et al. Jarid2 is a PRC2 component in embryonic stem cells required for multi-lineage differentiation and recruitment of PRC1 and RNA Polymerase II to developmental regulators. *Nat Cell Biol*. 2010;12(6):618-624. doi:10.1038/ncb2065.

61. Li G, Margueron R, Ku M, Chambon P, Bernstein BE, Reinberg D. Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes & Development*. 2010;24(4):368-380. doi:10.1101/gad.1886410.

62. Engel I, Seumois G, Chavez L, et al. Innate-like functions of natural killer T cell subsets result from highly divergent gene programs. *Nat Immunol*. 2016;17(6):728-739. doi:10.1038/ni.3437.

63. Simon C, Chagraoui J, Krosl J, et al. A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia. *Genes & Development*. 2012;26(7):651-656. doi:10.1101/gad.186411.111.

64. Puda A, Milosevic JD, Berg T, et al. Frequent deletions of JARID2 in leukemic transformation of chronic myeloid malignancies. *Am J Hematol*. 2012;87(3):245-250. doi:10.1002/ajh.22257.

Figures Legends

Figure 1: *Borrelia* infection increases the frequency of PTCL arising from NKT cells.

A) *p53*$^{-/-}$ mice develop PTCLs. Survival curves of *p53*$^{-/-}$ mice infected with 5.10^4 spirochetes (black box, n=33) or control medium (white box, n=39). Histograms show the tumor spectrums developed in infected and control *p53*$^{-/-}$ mice. Other tumors include solid tumors and thymic lymphomas.

B) PTCLs are characterized by large hepatosplenomegaly. Macroscopic aspect of organs (spleen and liver) representative of PTCL-bearing *p53*$^{-/-}$ mice compared to organs from healthy *p53*$^{-/-}$ mouse. PTCL show a significant cell expansion in liver and spleen ($p<0.0001$). P-values were determined by Mann-Whitney *U* tests. Data show mean ± SD.

C) Histological aspect of PTCL. HPS staining of paraffin-embedded organs sections from healthy and PTCL-bearing *p53*$^{-/-}$ mice. Arrows from middle panel show perivascular infiltrates of lymphoma cells. Arrow in right panel shows intra-sinusoïdal infiltrate of lymphoma cells.

D) Morphological aspect of PTCL cells. MGG staining of cytospin from PTCL liver cells.

E) *p53*$^{-/-}$ mice develop two types of PTCLs. Flow cytometry analysis of PTCL by staining with αGalCer-loaded CD1d-tetramers. Left histograms are representative of two different PTCL types: CD1d-tetramer negative PTCLs in grey (PTCL-T) and CD1d tetramer positive PTCLs in red (PTCL-NKT). Right histogram shows CD1d-tetramer staining of all PTCLs compared to normal T and NKT cells.

F) Borrelia infection increases PTCL-NKT frequency. PTCL-T and PTCL-NKT frequency among all PTCLs in control and infected *p53*$^{-/-}$ mice, showing a significantly different PTCL spectrum ($p<0.02$). P value was determined by χ^2 test.

Figure 2: PTCL-NKT are driven by chronic TCR activation.

A) Borrelia induces chronic infection in *p53*$^{-/-}$ mice. Follow-up of anti-*Bb* IgG in *p53*$^{-/-}$ mice sera by ELISA test. Mice (n=5) were intradermaly injected with control medium (white line), heat-killed (HK)-*Bb* (gray line), or live *Bb*, treated (blue line) or not (red line) with antibiotics (ATB) at day 10 post-infection to eradicate the bacteria after short-term infection. P value was determined by Mann-Whitney *U* test. Data show mean ± SEM.

B) Chronic infection is mandatory for PTCL-NKT induction. Lymphoma spectrum developed in control medium-, live *Bb*-, HK-*Bb*- or live *Bb*+ATB-injected *p53*$^{-/-}$ mice. Only live *Bb* injection induces significantly higher PTCL-NKT frequency compared to control mice (p=0.023). HK-*Bb* and live *Bb*+ATB induce significantly lower PTCL-NKT frequencies that live *Bb*. Of note, number of tumors exceeded the total number of mice due to animals bearing several tumors (ie., a solid tumor and a lymphoma). P-values were determined by χ^2 test (PTCL-NKT vs all other lymphomas). Values in middle represent the effectives. TL represents thymic lymphomas.

C) PTCL-NKT show features of chronically activated NKT cells. Flow cytometric analyses of NK1.1 and PD-1 expression on PTCL-NKT, showing a significant loss of NK1.1 ($p<0.0001$) and overexpression of PD-1 (p=0.0002). P values were determined by Mann-Whitney *U* tests.

D) NKT-activating glycolipids drive PTCL-NKT. Lymphoma spectrum developed in PBS- or αGalCer-injected *p53*$^{-/-}$ mice. Mice were intraperitonealy injected every week with PBS or 4μg of αGalCer. αGalCer injection induces significantly higher PTCL-NKT frequency compared to control mice (p=0.044). P-value was determined by χ^2 test.

E) PTCL-NKT depend on TCR-CD1d interaction for engraftment and survival *in vivo*. Survival curves of WT and *CD1d*$^{-/-}$ mice (n=5) iv-injected with 10^6 PTCL-NKT cells, showing absence of development in *CD1d*$^{-/-}$ recipient mice. All mice alive at day 100 were sacrificed. Histogram shows the number of total liver NKT cells at sacrifice. P value was determined by Mann-Whitney *U* test.

Figure 3: PTCL-NKT have a mixed NKT subtype phenotype, closer to NKT2 subset.

A) Phenotypic analysis of PTCL-NKT using classic NKT subsets defining markers. Surface (top panel) and transcription factors (bottom panel) expression are measured by flow cytometry. CD49a and T-bet are NKT1 markers, CCR6 and RORγT are NKT17 markers, PLZF a marker of NKT2, and ICOS a common marker of NKT2 and NKT17.

B) Cytokine production by PTCL-NKT cells. Lymphoma cells were cultivated and activated with anti-CD3/CD28 beads 24h *in vitro*. Culture supernatants were tested for cytokine production by ELISA test. Histogram shows results from 13 PTCL-NKT for all 3 cytokines tested, IFNγ, IL-4 and IL17, representative of a NKT1, NKT2 or NKT17 profile, respectively. Data represent duplicates with mean ± SD.

C) PTCL-NKT have a phenotypic profile close to NKT2. Unsupervised hierarchical clustering of PTCL-NKT with normal NKT1, NKT2 and NKT17 cells. Clustering is based on the 6 markers studied in A.

Figure 4: PTCL-NKT present recurrent loss of chromosome 13 region containing *Jarid2*.

A) Whole Exome Sequencing reveals frequent partial chromosome 13 monosomy. WES was performed on 6 PTCL-NKT and matched constitutive genomic DNAs. Analyses reveal recurrent CNVs, most importantly the loss in the chromosome 13. No CNV are in grey and copy number losses are represented in yellow. The minimal deletion region indicated by the green frame contains around 150 genes, among which is *Jarid2*.

B) Jarid2 loss is found in most of PTCL-NKT. Jarid2 loss was confirmed in a larger group of PTCL-NKT (n=24) by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), mapping the chromosome 13 with 4 other genes (*Exoc2*, *Rik*, *Dtnbp1* and *Kif27*) surrounding *Jarid2*.

Their localization on chromosome 13 illustrated on the left. Samples are displayed as columns and genes as lines. Copy number gains are in red and losses in green. Gene loss is considered by a z-score ≤-2. *Jarid2* is the most frequently deleted gene tested.

C) Summary of genetic alterations detected in the 6 PTCL-NKT analyzed by WES. Samples are displayed as columns and mutations as lines, organized by involved pathways. Mutations are colored by the type of alteration. Double mutations are represented as triangles, single mutations as full colored squares.

Figure 5: Jarid2 loss in PTCL-NKT is confirmed at a functional level.

A) *Jarid2* loss is confirmed at transcript and protein levels. Jarid2 transcript was measured by RT-qPCR and normalized on HRPT. Jarid2 level is significantly decreased in PTCL-NKT compared to resting (p=0.0007) and activated (p=0.015) normal NKT cells. P values were determined by Mann-Whitney *U* tests. Jarid2 loss is shown at protein level by Western Blot analysis.

B) PTCL-NKT show global H3K9 hypomethylation. H3K9 methylation was measured by flow cytometry intranuclear staining using anti-H3K9me1, H3K9me2 and H3K9me3 antibodies. Methylation ratios were calculated. Histogram shows the ratio H3K9me3/H3K9me1, revealing a significantly decreased H3K9 methylation in PTCL-NKT compared to normal liver NKT cells (p=0.023). P value was determined by Mann-Whitney *U* test.

Supplementary Figure 1: Illustration of the mixed NKT subtype profile of PTCL-NKT.

A) Histogram shows expression in 13 PTCL-NKT of 3 main transcription factors defining NKT subtypes, measured by flow cytometry (ΔMFI). Some lymphomas express the 3 markers (ie. #3).

B) Graphic representation of the correlation between the transcription factors and associated cytokine production defining NKT subsets (IFNγ/T-bet for NKT1, IL-4/PLZF for NKT2 and RORγT/IL-17 for NKT17).

Tables

Table 1: Characteristics of PTCL-NKT from *Bb*-infected and control mice

PTCL-NKT #	Group	αGalCer CD1d-Tet staining	Vα14 chain qPCR	Vβ chain sequencing
1	Borrelia	+	nd	nd
2	Borrelia	+	+	Vβ7
3	Borrelia	+	nd	nd
4	Borrelia	+	+	Vβ8.2
5	Borrelia	+	+	Vβ8.2
6	Borrelia	+	+	Vβ8.3
7	Borrelia	+	nd	nd
8	Borrelia	+	-*	Vβ7
9	Borrelia	+	+	Vβ8.3
10	Borrelia	+	nd	nd
11	Borrelia	+	+	Vβ8.2
12	Borrelia	+	+	Vβ8.2
13	Borrelia	+	+	Vβ8.3
14	Borrelia	+	+	Vβ8.3
15	Borrelia	+	+	Vβ8.2
16	Borrelia	+	+	Vβ8.2
17	Borrelia	+	+	Vβ7
18	Control	+	+	Vβ7
19	Control	+	+	Vβ7
20	Control	+	+	Vβ8.2 + Vβ7★
21	Control	+	+	Vβ8.2 + Vβ2★
22	Control	+	-*	Vβ8.3
23	Control	+	+	Vβ8.2
24	Control	+	+	Vβ8.2
25	Control	+	+	Vβ8.2 + Vβ6❖
26	Control	+	+	Vβ8.2
27	Control	+	+	Vβ8.2
28	Control	+	+	Vβ8.2

*negative qPCR explained by weak tumoral infiltrate
★presence of two clones
❖coexistence with PTCL-T

Supplementary table 1: List of genes identified within 3 minimal deletion regions of chromosome 13.

13qA4-A5				13qB3-C1	13qC1-C3
Arl10	*Fam120a*	*Mirlet7d*	*Ror2*	*Adamts16*	*AK136039*
Aspn	*Fam120aos*	*Mirlet7f-1*	*S1pr3*	*Adcy2*	*Adgrv1*
Atxn1	*Fam193b*	*Msx2*	*Secisbp2*	*Clptm1l*	*Arrdc3*
Auh	*Fam8a1*	*Mxd3*	*Secisbp2*	*Fastkd3*	*Cetn3*
B4galt7	*Fbxl21*	*Mylip*	*Secisbp2*	*Ice1*	*Lysmd3*
Barx1	*Fbxw17*	*Neurog1*	*Sema4d*	*Lpcat1*	*Mblac2*
BB123696	*Fgd3*	*Nfil3*	*Sfxn1*	*Mrpl36*	*Mctp1*
Bicd2	*Fgfr4*	*Nhlrc1*	*Shc3*	*Mtrr*	*Mef2c*
Caml	*Gadd45g*	*Ninj1*	*Simc1*	*Ndufs6*	*Mir3961*
Cap2	*Gmpr*	*Nol8*	*Slc34a1*	*Slc6a3*	*Mir9-2*
Card19	*Gprin1*	*Nop16*	*Smad5*	*Tert*	*Polr3g*
Catsper3	*Grk6*	*Nsd1*	*Sncb*		
Cdhr2	*H2afy*	*Nup153*	*Spock1*		
Cenpp	*Higd2a*	*Nutm2*	*Sptlc1*		
Cenpp	*Hk3*	*Ogn*	*Stmnd1*		
Cks2	*Hrh2*	*Omd*	*Susd3*		
Cltb	*Iars*	*Pcbd2*	*Syk*		
Cplx2	*Id4*	*Pdlim7*	*Tgfbi*		
Cxcl14	*Il9*	*Pfn3*	*Thoc3*		
Dbn1	*Ippk*	*Phactr1*	*Tifab*		
Ddx41	*Jarid2*	*Phf2*	*Tmed9*		
Ddx46	*Kdm1b*	*Pitx1*	*Tpmt*		
Dek	*Kif13a*	*Prelid1*	*Tpmt*		
Diras2	*Lect2*	*Prr7*	*Trpc7*		
Dok3	*Lman2*	*Ptpdc1*	*Tspan17*		
Drd1	*Mir683-2*	*Rab24*	*Txndc15*		
Dtnbp1	*Mir683-2*	*Rbm24*	*Uimc1*		
Ecm2	*Mir6943*	*Rgs14*	*Unc5a*		
Eif4e1b	*Mir6944*	*Rnf144b*	*Wnk2*		
F12	*Mir6945*	*Rnf144b*	*Zfp169*		
Faf2	*Mirlet7a-1*	*Rnf44*	*Zfp346*		

Figures

Figure 1

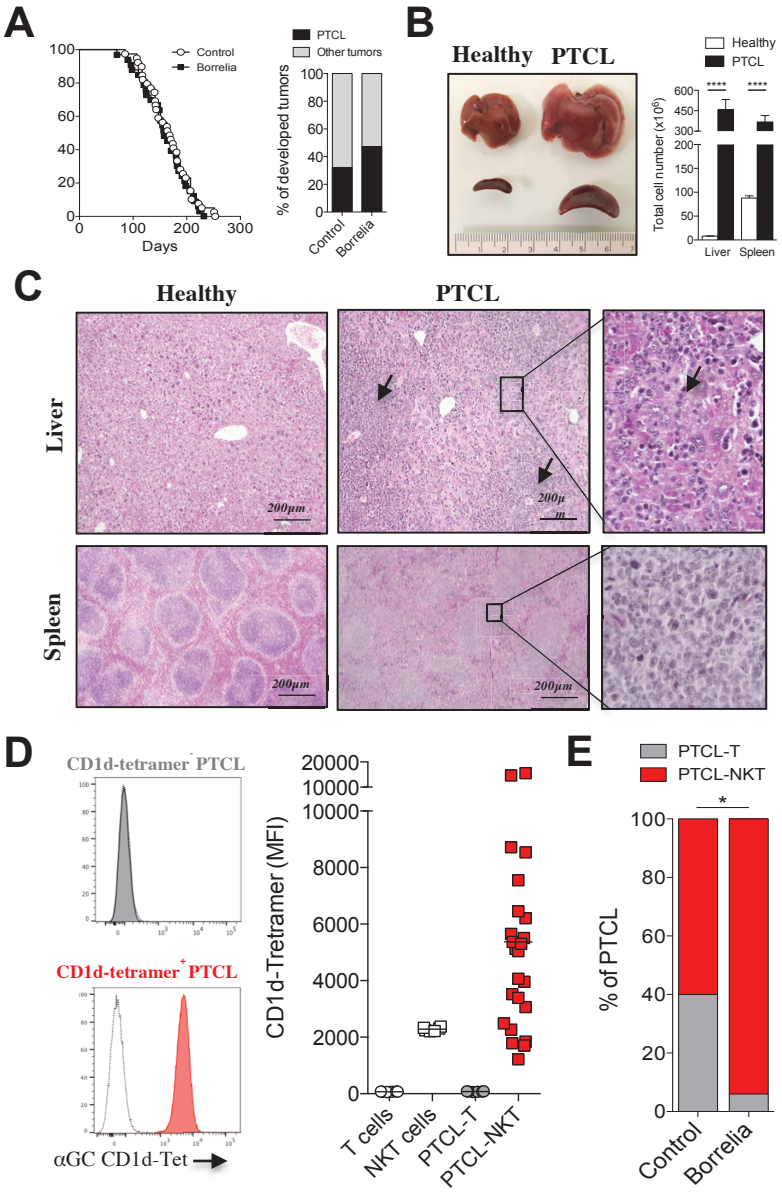


Figure 2

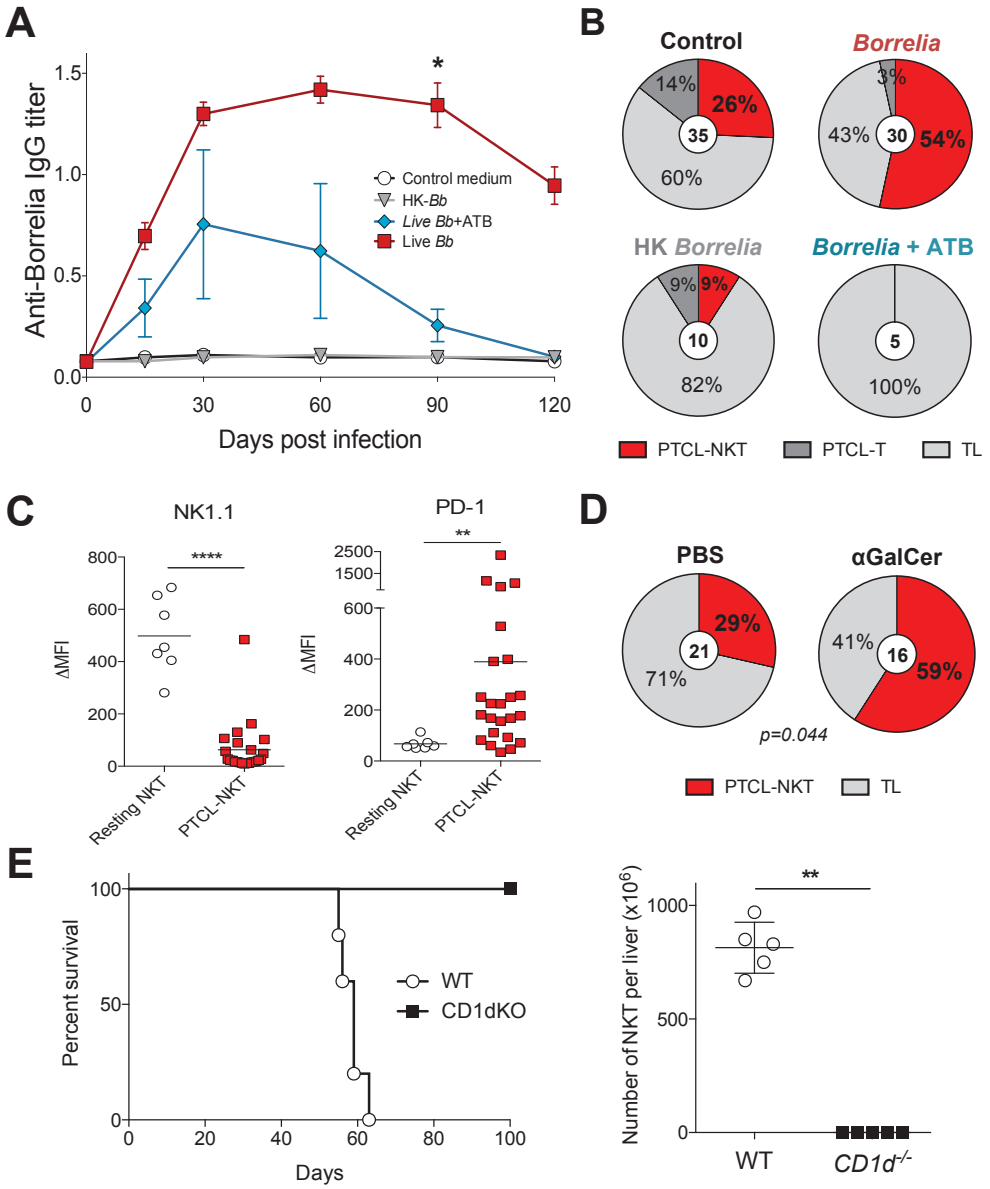

A
Anti-Borrelia IgG titer
Days post infection
Control medium
HK-Bb
Live Bb+ATB
Live Bb
B
Control
Borrelia
HK Borrelia
Borrelia + ATB
PTCL-NKT
PTCL-T
TL
C
NK1.1
PD-1
ΔMFI
Resting NKT
PTCL-NKT
D
PBS
αGalCer
p=0.044
PTCL-NKT
TL
E
Percent survival
Days
WT
CD1dKO
Number of NKT per liver (x10^6)
WT
CD1d-/-

Figure 3

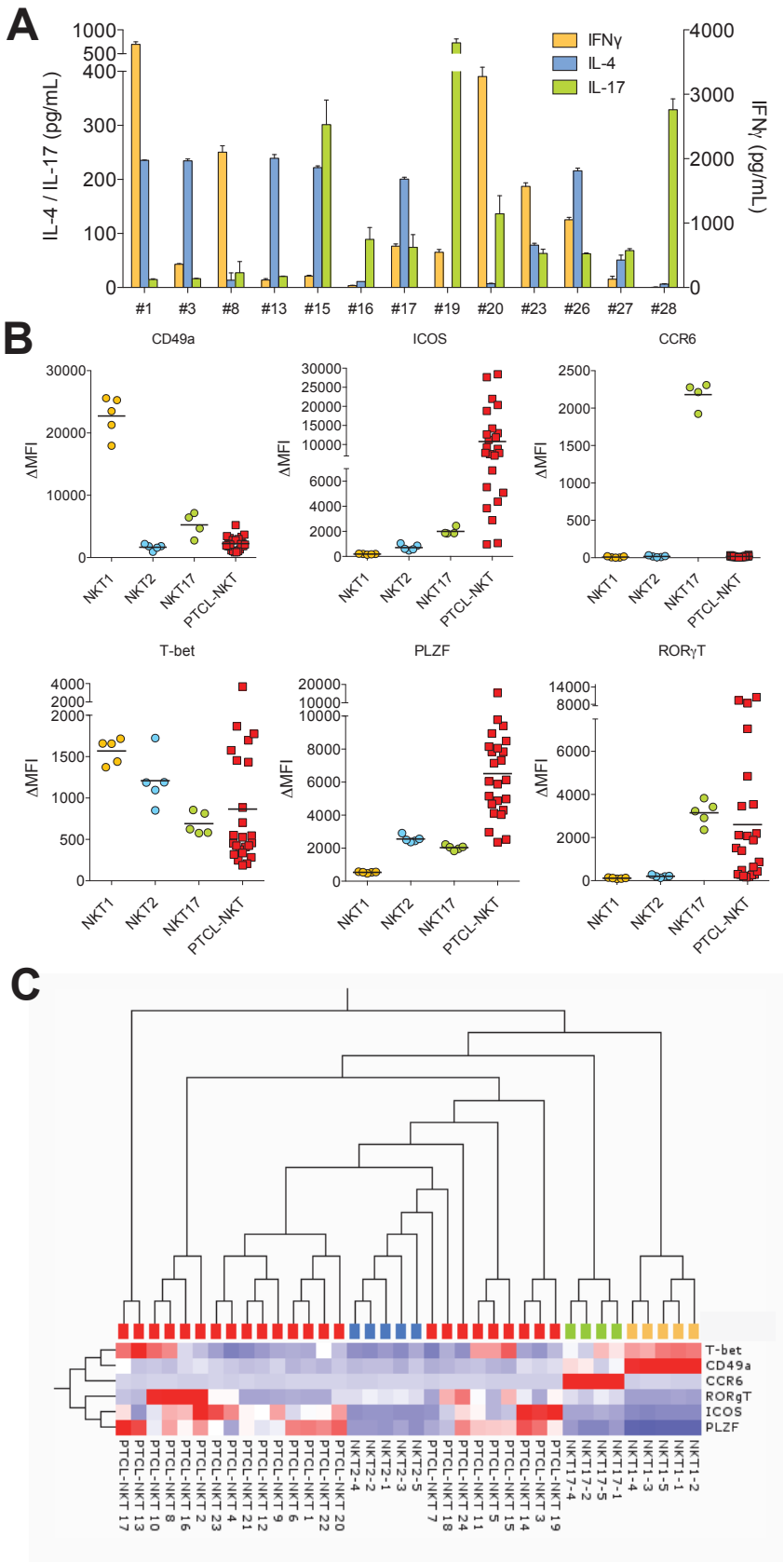

A
IFNγ
IL-4
IL-17
IL-4 / IL-17 (pg/mL)
IFNγ (pg/mL)
#1 #3 #8 #13 #15 #16 #17 #19 #20 #23 #26 #27 #28
CD49a
ICOS
CCR6
B
ΔMFI
NKT1 NKT2 NKT17 PTCL-NKT
T-bet
PLZF
RORγT
C
T-bet
CD49a
CCR6
RORgT
ICOS
PLZF

Figure 4

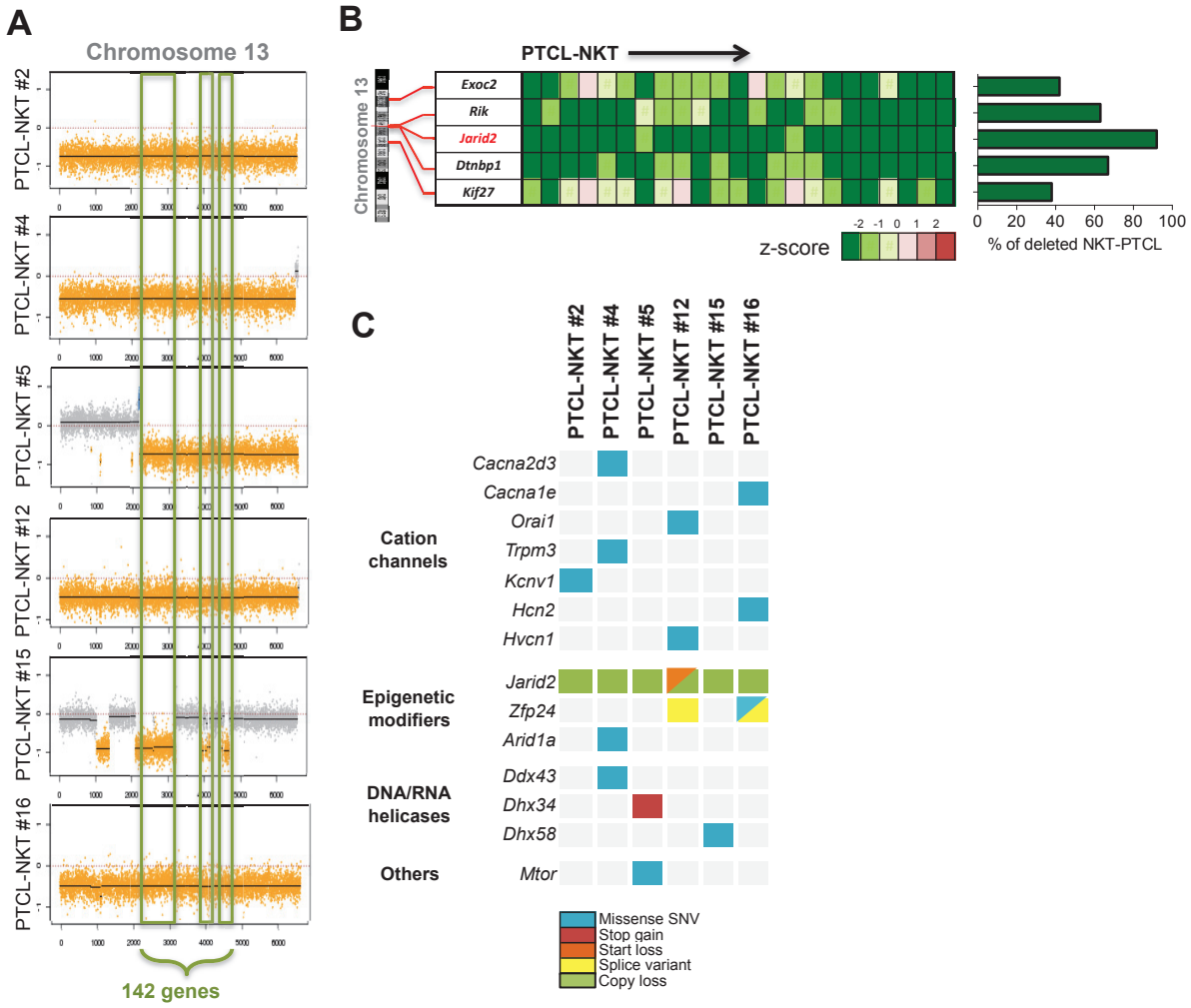
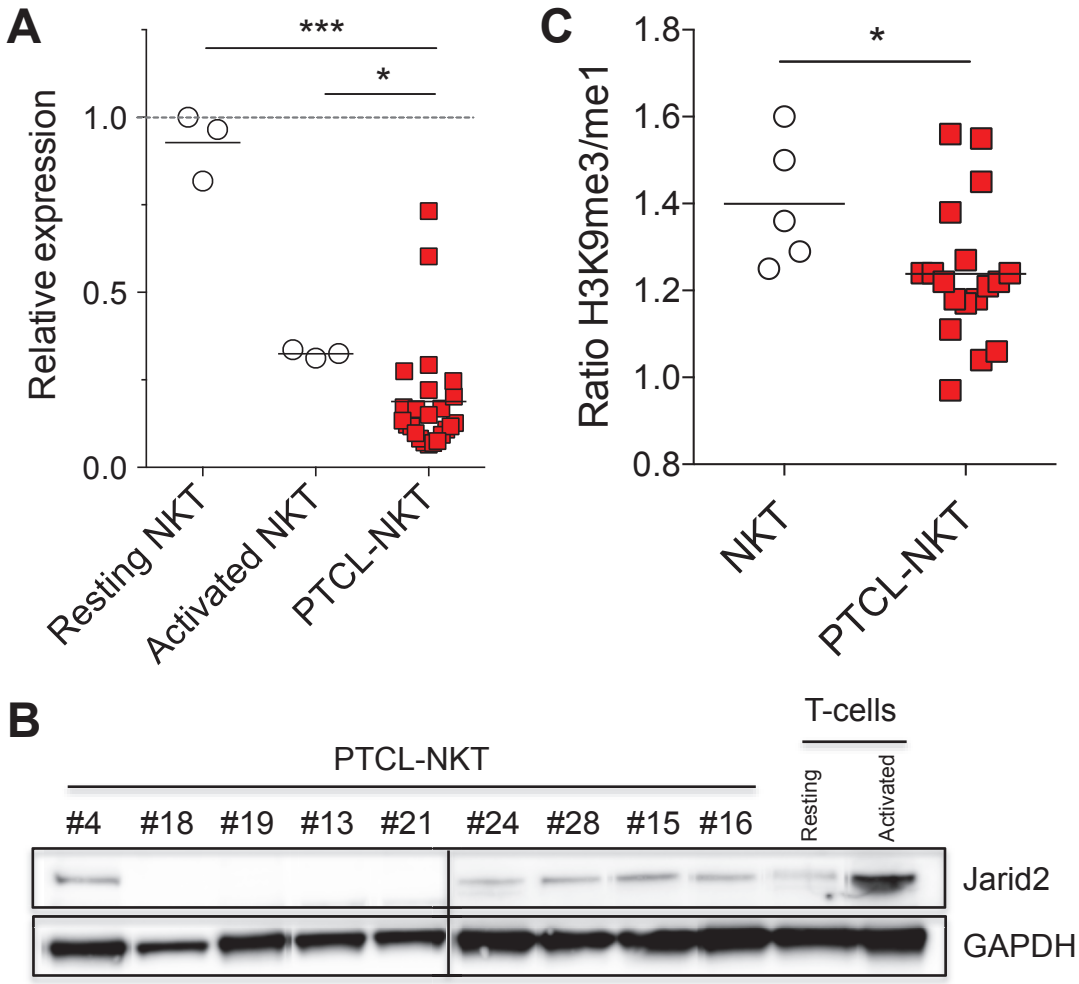
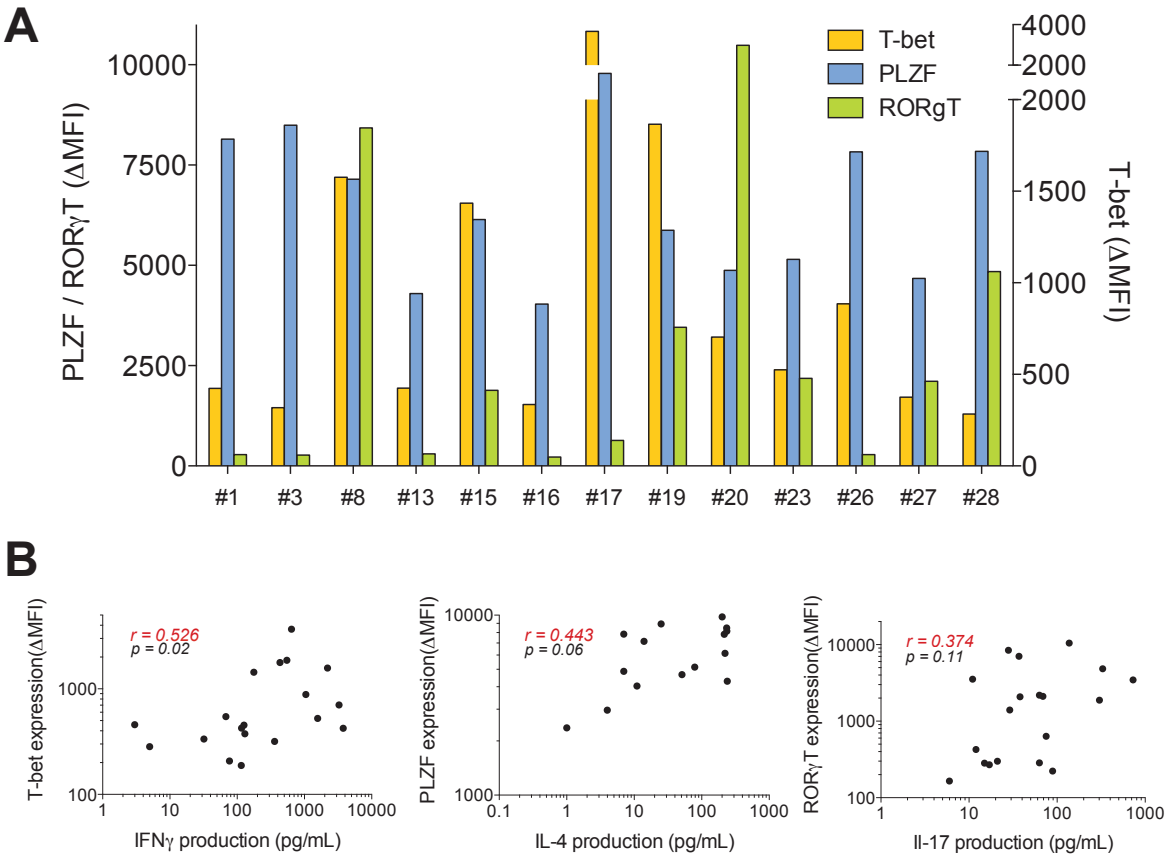

A
Chromosome 13
PTCL-NKT #2
PTCL-NKT #4
PTCL-NKT #5
PTCL-NKT #12
PTCL-NKT #15
PTCL-NKT #16
142 genes
B
PTCL-NKT
Chromosome 13
Exoc2
Rik
Jarid2
Dtnbp1
Kif27
z-score
-2 -1 0 1 2
0 20 40 60 80 100
% of deleted NKT-PTCL
C
PTCL-NKT #2
PTCL-NKT #4
PTCL-NKT #5
PTCL-NKT #12
PTCL-NKT #15
PTCL-NKT #16
Cation channels
Cacna2d3
Cacna1e
Orai1
Trpm3
Kcnv1
Hcn2
Hvcn1
Epigenetic modifiers
Jarid2
Zfp24
Arid1a
DNA/RNA helicases
Ddx43
Dhx34
Dhx58
Others
Mtor
Missense SNV
Stop gain
Start loss
Splice variant
Copy loss

Figure 5


A
***
*
Relative expression
1.0
0.5
0.0
Resting NKT
Activated NKT
PTCL-NKT
C
*
Ratio H3K9me3/me1
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
NKT
PTCL-NKT
B
PTCL-NKT
T-cells
#4
#18
#19
#13
#21
#24
#28
#15
#16
Resting
Activated
Jarid2
GAPDH

Supplementary figure 1



Supplementary methods

MLPA hybridation probes

Gene	Gene localization	Probe side	Probes sequences	Size (bp)	Ligation product size (bp)
Jarid2	*Chr13*	LPO	CACGGTCGTTCTAGGTTAGATCTCTGGCAGGAGCAGATCATCAGTTTGGTCAACCAGA	58	112
		RPO	TATGTGGCAAAGTGTCTGGCAAACACGGTGGCATCTCCAACCCTTAGGGAACCC	54	
1700029N11Rik	*Chr13*	LPO	CACGGTCGTTCTAGGTTAGATCTCCTTTGGCCTCTGCTGAGACTGTTGAAGTTCCAAGAC	60	116
		RPO	CAGTGTGAGTCAGCATTTGCTTCCTGGCATGGAACTATCCAACCCTTAGGGAACCC	56	
Exoc2	*Chr13*	LPO	CACGGTCGTTCTAGGTTAGATCTGGAGTTATCAGGTTAGACAGCAGAAGAACTGGCGAGAGT	62	120
		RPO	GGCCATCAGACAGGAGTAGTGCAGAAGTTTAGCGATTTGTCCAACCCTTAGGGAACCC	58	
Dtnbp1	*Chr13*	LPO	CACGGTCGTTCTAGGTTAGATCTCAGGTGTCAGTGATGACAGTGACCAGTGTGACTCAACTCAG	64	124
		RPO	GACATTTAAGTGACTTGTCAGCTGTGCGCAGAATCCTCCTGTCCAACCCTTAGGGAACCC	60	
Kif27	*Chr13*	LPO	CACGGTCGTTCTAGGTTAGATCTGTATCAGCCAAGCTAGCCAGGCATCTTCAGAGAATGTTCCTGA	66	128
		RPO	CCAGAATCGAATCCATTCTCTGGAGGAACAGGTAGCTCAGCTCTCCAACCCTTAGGGAACCC	62	
Tmem200a	*Chr10*	LPO	CACGGTCGTTCTAGGTTAGATCTTCCATCTGGCTTTTTCCTCATTCTGGGAGTGC	55	103
		RPO	TGGTGTCCATCATAGGAATCGCCATGGCATCCAACCCTTAGGGAACCC	48	
Abat	*Chr16*	LPO	CACGGTCGTTCTAGGTTAGATCTTACTAGTCAAGACTAGACATCTCATCTCACTGCAGCAGAGCAGAACACA	72	140
		RPO	GCAAACATGGTGGCTGCCTTCACAGAGCTCATATGTGCAAGTAGTACTATCCAACCCTTAGGGAACCC	68	
Zebt2	*Chr2*	LPO	CACGGTCGTTCTAGGTTAGATCTTACTACTACGGTTCACGTTTGCTTACTCTGATTGGATGCCTAAAGAGGAGTGG	76	148
		RPO	GTGCACTTAATTATCTGAGGCATCTCCTCGGTACTTAGCAGAGCTACTACTACTCCAACCCTTAGGGAACCC	72	
Gin1	*Chr1*	LPO	CACGGTCGTTCTAGGTTAGATCTTACGCAGTGATGCTCCTATTTTCACCTGGCATGGAGTGAGAAAGAGC	70	136
		RPO	ACGTGAGCATGTGAGCCAGGAGTTAGCACAGAGGAAAATACTCTTACTCCAACCCTTAGGGAACCC	66	

Red : PCR primer binding sequences
Blue : Target gene hybridizing sequences
Green : Spacers

MLPA PCR primers

Forward	CACGGTCGTTCTAGGTTAGATCT
Reverse	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA

Sanger sequencing PCR primers

Target	Sens	Primer sequence
5'UTR + Exon 1	Forward	GACACGTCCAAGCGTTTGTT
	Reverse	GAGCTTTATCGGACGCTGTTT
Exon 2	Forward	GCACCCAGTAGGAATTTTACAGT
	Reverse	CTTGTGCCCAGGTCAGAACA
Exon 3	Forward	GGGCACAGGGTAGAAGGAAAA
	Reverse	CCATGTGGCAAGCATTAGCA
Exon 4	Forward	CTGCTGCATGAGGTCCTGTATT
	Reverse	GCCCTATATAGTGGGGCACTT
Exon 5	Forward	AGGGTCCTACCTTTATAAGCCTC
	Reverse	TCTGGCTGAAACGCTTCAAATG
Exon 6	Forward	GCTGGCCATTTATTTCCCTGG
	Reverse	GCTCTACTTTTCCAGCTCGGT
Exon 7	Forward	AACTCGTCATTCAGCTAGCAC
	Reverse	GAGAGGTTCTACAAGAGCAGGG
Exon 8	Forward	CTGGCTGCTGGCTGCTTTAG
	Reverse	AGTCTCCTCTGTGATATTTGGTCAC
Exon 9	Forward	GGGTGTTGTCACCTATTGAGC
	Reverse	CGGAACAACCTCTGCCTTTG
Exon 10	Forward	GTTGCCTTACGTTCTGAGGG
	Reverse	TGGGAGGACAGTGAGGTTCC
Exon 11	Forward	GGTTCCCGGTGGGAAAATCA
	Reverse	GGGGGTCCACAGTTTTCAGA
Exon 12	Forward	TATGTAGCAAGTGGGGAGGG
	Reverse	ACCTACAGAGTCAGGCCCTATT
Exon 13	Forward	GAAGCAGCCAACAGCAACAG
	Reverse	CCTCCTTAGGCCCAAAAGACC
Exon 14	Forward	CCCCATAACCTGGATGGTGTCC
	Reverse	CTCCAGCACCGAATGACAGC
Exon 15	Forward	AATGGCCACTTTAGAAACTCACAC
	Reverse	AGTCCTTAATGAGCTGCAGGTGG
Exon 16	Forward	TCCTTTTTAGTGGGAGCAGGTA
	Reverse	ACCATAGTGAGAGGAGGCTGG
Exon 17	Forward	GTTGCAGGGTTTCTTACCCC
	Reverse	AATGGACAGCATCCACTTAGAG
Exon 18 + 3'UTR	Forward	AAGCCTGCTAATGTCCAGTGA
	Reverse	ATGCCTCTGTAGCTCCGCTC

DISCUSSION

Les travaux menés dans notre équipe sur le modèle murin *p53*$^{-/-}$ ont permis de mettre en évidence en 2012 une nouvelle entité de lymphome T périphérique, ayant pour origine des cellules NKT. Le but de ce travail de thèse fût principalement de caractériser cette entité particulière de lymphome T « non conventionnel », et plus particulièrement d'étudier le rôle des stimulations antigéniques chroniques sur la lymphomagenèse NKT. Notre article paru en 2016 dans *J Exp Med,* décrivant pour la première fois ces lymphomes, nous a permis d'affirmer que la stimulation antigénique chronique des NKT est l'élément responsable de la lymphomagenèse. Nous avons en effet montré que ces lymphomes présentent de nombreuses caractéristiques de lymphocytes NKT activés chroniquement : perte d'expression de NK1.1, expression élevée de PD-1, *down*-régulation de la voie du TCR au niveau transcriptomique et dépendance vis-à-vis de l'interaction TCR/CD1d. Nous avons également identifié un certain nombre d'entités de PTCL humains CD1d-restreints, plus particulièrement des lymphomes γδ exprimant la chaine Vδ1 tels que les T-LGL γδ et les HSTL que nous avons développé plus amplement dans le chapitre C de la partie introductive, notamment sur son lien avec des mutations du régulateur épigénétique SETD2.

De la découverte de ces lymphomes NKT dans le modèle *p53*$^{-/-}$ ont émergé plusieurs questionnements :

QUELLE EST LA SOURCE ANTIGENIQUE A L'ORIGINE DES LYMPHOMES NKT DANS NOS GROUPES « CONTROLES » ?

N'observant pas de différences phénotypiques ou transcriptomiques marquantes entre les lymphomes NKT développés par 25-30% des souris *p53*$^{-/-}$ des groupes « contrôles » et les lymphomes NKT développés par 70% des souris injectées avec *Spn*, il semblerait que l'ensemble de ces lymphomes émergent de mécanismes physiopathologiques similaires, et donc d'une stimulation antigénique chronique. Deux hypothèses sont possibles quand à la source antigénique à l'origine des lymphomes NKT dans nos groupes « contrôles » :

- Soit il s'agit de glycolipides activateurs endogènes comme nous en avons décrit dans la partie introductive de ce manuscrit.
- Soit il s'agit de glycolipides exogènes provenant du microbiote, intestinal notamment.

Connaissant l'importance du lien entre certaines bactéries commensales et l'éducation/activation des NKT, c'est cette dernière hypothèse que nous avons voulu tester en premier lieu. Nous avons d'abord tenté de traiter des souris *p53*$^{-/-}$ par un cocktail d'antibiotiques administré par voie orale afin de dépléter la flore intestinale, et ainsi voir si

l'absence de microbiote pouvait réduire, voire éliminer le développement de lymphomes NKT. Cependant nous avons remarqué que le traitement antibiotique induisait à long terme une prolifération de germes résistants, se traduisant par une hyperplasie caecale. Pour contrer ce problème, nous avons donc voulu générer des souris *p53*$^{-/-}$ axéniques. Pour des raisons techniques, la génération de ces souris s'est révélée très longue et est toujours en cours. Lorsque nous aurons généré ces souris, il sera intéressant de savoir si certains commensaux intestinaux, notamment *Bacteroïdes fragilis*, sont capables d'induire des lymphomes NKT dans ce modèle. Si oui par quel mécanisme ? Par translocation d'Ag bactériens activateurs dans la circulation porte vers le foie où ils activeraient les NKT résidents ? Nous pourrons tester cette hypothèse en traitant des souris *p53*$^{-/-}$ avec des molécules augmentant la perméabilité intestinale (DSS, alcool…) et observer l'impact sur la génération de lymphomes NKT.

ROLE DE P53 DANS LA LYMPHOMAGENESE T ASSOCIEE A DES STIMULATIONS ANTIGENIQUES CHRONIQUES ?

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le rôle de p53 dans la lymphomagenèse T associée à des stimulations antigéniques chroniques : 1) p53 joue un rôle dans le contrôle de la prolifération et l'apoptose des lymphocytes T et NKT soumis à une activation répétée du TCR ; 2) p53 contrôle l'apparition d'évènements oncogéniques de façon indépendante à la stimulation antigénique. Comme nous l'avons imaginé pour les CTCL (hémopathie dans laquelle p53 est retrouvée très fréquemment altérée) dans la figure 11 de la partie introductive, la perte de p53 pourrait en effet être un évènement très précoce de la lymphomagenèse, installant un contexte permissif à l'émergence d'un ensemble de mutations apportant un avantage proliératif ou de survie (ZEB1, facteurs épigénétiques, JAK/STAT…). La découverte dans ce travail de thèse de la perte récurrente de *Jarid2*, un régulateur épigénétique important dans la biologie des NKT, nous laisse penser qu'un mécanisme oncogénique similaire pourrait avoir lieu dans les lymphomes NKT. Nous développerons le rôle hypothétique de Jarid2 dans la lymphomagenèse dans une partie qui lui sera consacrée.

Au delà du caractère permissif aux évènements mutationnels qu'apporterait la perte de p53, nous avons voulu adresser la question du rôle direct de p53 dans le contrôle de lymphocytes NKT activés chroniquement via leur TCR *in vitro*. En effet, l'importance de p53 dans la régulation des réponses immunitaires est de plus en plus considérée[564]. Les études actuelles montrent que l'AICD (*Activation Induced Cell Death*), observée après une seconde activation des lymphocytes T, est un mécanisme p53-indépendant[565], mais le rôle de p53 n'a jamais été

étudié dans un contexte de stimulation chronique du TCR. Nos expériences *in vitro*, basée sur des activations successives du TCR par des billes anti-CD3/CD28, montrent que l'activation répétée de NKT WT induit une apoptose de plus en plus importante au fur et à mesure des stimulations, ce qui n'est pas le cas des NKT *p53*$^{-/-}$ (**Figure 12**). Ceci est également vrai pour les lymphocytes T conventionnels. L'activation chronique du TCR semble donc enclencher des mécanismes d'apoptose p53-dépendants. Ceci pourrait ainsi contribuer à la lymphomagenèse *in vivo*, par un manque de contrôle prolifératif des cellules T/NKT dans un contexte d'infection chronique. Le fait que l'ensemble des tumeurs développées spontanément dans les souris *p53*$^{-/-}$ soient majoritairement d'origine T est pour nous révélateur que p53 est particulièrement important dans la biologie de ces cellules.

En conclusion, il est envisageable que la perte de p53 agisse à 2 niveaux dans la

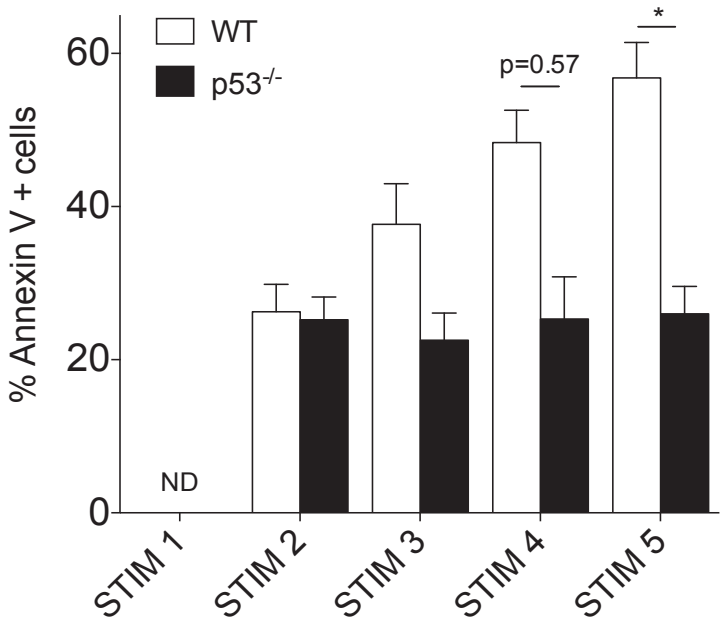


Figure 12 : Rôle de p53 sur l'apoptose des NKT activés chroniquement Des NKT isolé de souris WR ou p53$^{-/-}$ ont été activés chroniquement *in vitro* avec des billes anti-CD3/CD28. L'apoptose a été mesurée par marquage Annexine V.

lymphomagenèse T et NKT :

- Précocement, permettant l'apparition (probablement stochastique), la sélection et enfin l'émergence d'autres mutations *driver,* telles que la perte de facteurs épigénétiques
- Tardivement, provoquant une perte de contrôle de la prolifération et de l'apoptose des lymphocytes T et NKT activés chroniquement.

Nous avons évoqué dans l'introduction le potentiel rôle pro-oncogénique indirect de l'activation lymphocytaire. En effet, en favorisant la prolifération et la survie, c'est

mécanismes, bien que physiologiques, pourraient favoriser l'émergence de mutations. En revanche, nous n'avons pas évoqué l'hypothèse selon laquelle l'activation lymphocytaire par le TCR pourrait avoir un potentiel directement transformant. Nous avons émis cette hypothèse par la découverte des travaux menés par Gabriel Ichim et al, parus dans *Molecular Cell* en 2015[566]. Ces travaux montrent que des conditions d'apoptose sub-optimales (ici de faibles concentrations d'un inhibiteur de Bcl-2) peuvent enclencher un processus clé de l'apoptose appelée MOMP (*Mitochondrial outer membrane permeabilization*) de manière incomplète. A l'origine considéré comme un mécanisme « tout ou rien », leurs travaux effectués sur des lignées ont démontré que la MOMP peut être activée dans une faible proportion de mitochondries dans une même cellule (ce qu'ils nomment « minority MOMP » ou « miMOMP »). Bien que n'induisant pas l'apoptose, ceci enclenche tout de même certains processus de l'apoptose, et plus particulièrement l'activation de DNases activées par les caspases (CAD). Ainsi les cellules cultivées sous de telles conditions survivent, mais présentent une instabilité génomique, favorisant la tumorigenèse. Des mécanismes similaires ont également été étudiés dans un article de 2012[567]. Cette observation pour le moins originale montre le potentiel oncogénique d'une apoptose incomplète. De ces travaux, nous nous sommes demandés si l'activation répétée du TCR pouvait être elle aussi considérée comme un signal sub-optimal d'apoptose, induisant par conséquent une miMOMP et donc une instabilité génomique (**Figure 13**). En effet, comme nous venons de le discuter, l'activation chronique du TCR de lymphocytes T ou de NKT *in vitro* induit l'apoptose d'une majeure partie des lymphocytes. Mais qu'en est t'il des cellules « survivantes » ? Accumulent t'elles des anomalies génétiques ? Un certains nombre d'éléments dans la littérature nous laissent penser que c'est le cas. En effet plusieurs articles ont reporté l'activation de caspases CAD suite à l'activation du TCR[568,569].

Pour répondre à cette question, nous avons entamé une collaboration avec Gabriel Ichim. Grace à notre modèle de stimulation *in vitro* sur cellules T primaires, nous chercherons d'abord à mettre en évidence la présence de dommages à l'ADN dans les cellules activée (marquages γH2AX et 53BP1), pour ensuite tenter de mettre en évidence la miMOMP grâce au modèle rapporteur de Gabriel Ichim. Cela serait une preuve remarquable du rôle directement pro-oncogénique du TCR.

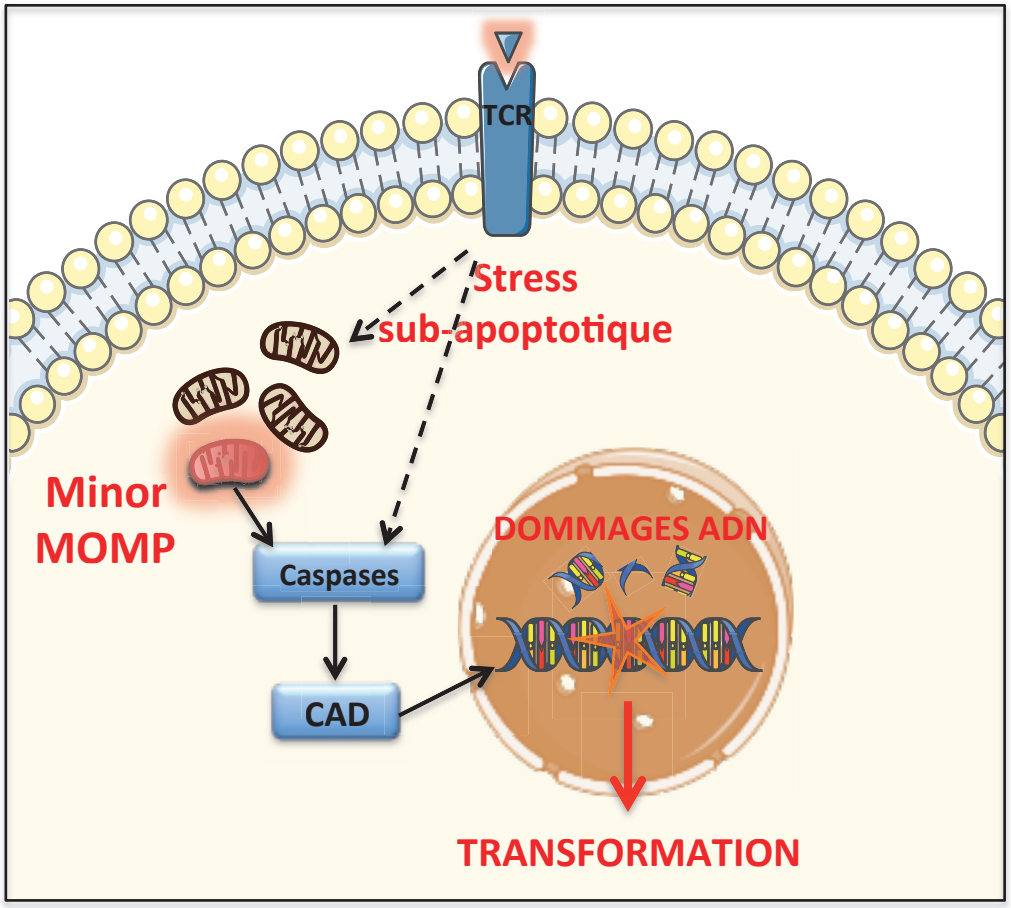


Figure 13 : Proposition de modèle selon lequel l'activation du TCR pourrait induire des dommages à l'ADN.

UN LIEN ENTRE BORRELIA ET PTCL ?

Cette question est à la base du projet principal de ce travail de thèse, qui fût de démontrer grâce au modèle *p53*$^{-/-}$ le lien entre *Borrelia burgdorferri* et le développement de PTCL. Nous avons porté notre attention sur cette bactérie pour plusieurs raisons : i) *Borrelia* est responsable d'une pathologie chronique émergente, la maladie de Lyme, transmise par les piqures de tiques, ii) *Borrelia* semble associée à certains CTCL (MF et SS), cependant ces résultats demeurent controversés et manquent d'arguments cliniques et expérimentaux, et iii) *Borrelia* exprime des glycolipides activateurs des NKT.

Notre hypothèse était donc que l'infection par *Borrelia* dans les souris p53$^{-/-}$ serait capable d'induire des PTCL d'origine NKT, hypothèse que nous avons confirmé dans ce travail, renforçant l'idée selon laquelle *Borrelia* pourrait induire des PTCL. Nous n'avons pour le moment aucune preuve que certains CTCL chez l'homme puissent être d'origine NKT, ou du moins T non conventionnel. Si un lien tel de causalité venait à être montré, notamment par des études épidémiologiques plus larges, il serait envisageable d'utiliser des traitements antibiotiques appropriés afin d'éradiquer la bactérie chez les patients, dans l'espoir d'observer

une régression de la maladie avant ou en addition des traitements conventionnels, comme c'est le cas pour les lymphomes du MALT gastrique associés à *Helicobacter pylori*. L'association lymphome/*Borrelia* est pour le moment floue pour les PTCL, mais plus claire pour d'autres lymphomes non-Hodgkiniens, principalement les lymphomes B cutanés[389,532,533]. Une étude scandinave a rapporté une association avec le lymphome du manteau (OR=3.6)[531]. Plusieurs cas de régression de lymphomes B associés à *Borrelia* et traités par antibiotiques ont déjà été rapportés dans la littérature[390,557,558].

ETUDE SEROLOGIQUE DU LIEN ENTRE PTCL ET INFECTIONS

Un aspect de ce travail de thèse fut de mettre en évidence certaines associations entre PTCL et infections bactériennes chez l'homme. Pour cela nous avons mis en place une collaboration avec James Cerhan (La Mayo Clinic, US) nous donnant accès à une large collection de sérums de patients PTCL (n=108), représentant différentes entités récapitulées dans le tableau 4, ainsi que des sérums contrôles appareillés sur l'âge, le sexe et la localisation géographique (n=108).

Tableau 4 : Tableau des différentes entités de PTCL composant la collection de sérums fournis par J.Cerhan ; PTCL n=108 ; contrôles sains n=108.

Extranodal NK/T - nasal	4
Large Granular T-cell	7
Mycosis fungoides	12
Other T-cell - specify	8
Peripheral T unspecified	39
Precursor T lymphoblastic	4
Sézary syndrome	5
Subcutaneous panniculitis T	5
Cut T-cell non-mycosis fungoides	6
Anaplastic large cell cutaneous	3
Anaplastic large cell systemic	20
Angioimmunoblastic T	18
Enteropathy-type T	6

Nous avons donc réalisé une étude sérologique afin d'étudier l'historique d'infection chez ces patients, en nous focalisant sur 4 pathogènes, identifiés comme exprimant des glycolipides

activateurs des NKT et dont l'implication dans certains lymphomes est connue ou soupçonnée. Pour la recherche d'Ac anti-*Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae* et *Borrelia burgdorferi*, nous avons fait appel à Biomnis, une entreprise spécialisée dans les analyses médicales, qui a réalisé l'ensemble des tests sur des automates. Malheureusement, ces analyses n'ont révélé aucune association entre PTCL et infection, tout du moins lorsque l'on considère l'ensemble des entités (**Tableau 5**). En effet, il n'est néanmoins pas exclu que certaines infections soient associées à des entités pour lesquelles nous n'avions pas assez d'échantillons pour réaliser une analyse robuste.

De plus, il est possible que seulement certaines espèces de *Borrelia* soient associées aux PTCL. En effet, les principales espèces pathogènes pour l'homme (*B.burgdorferi* sensu stricto, *B.afzelii* et *B.garini*) présentent des répartitions géographiques ainsi que des manifestations cliniques distinctes. En l'occurrence, *B.afzelii* est l'espèce principalement responsable de manifestations cutanées telles que le lymphocytome (stades précoces) et l'acrodermatite chronique atrophiante (stades tardifs), 2 signes cliniques distincts retrouvés en Europe seulement[527,528]. Ces atteintes cutanées correspondent à des lymphoproliférations principalement de nature B, mais parfois T[394,570,571] pouvant parfois être confondus avec des CTCL. *B.afzelii* est l'espèce la plus fréquente en Europe, dont l'Italie[572], pays dans lequel ont été menées les 2 études montrant une association en CTCL et *Borrelia*[391,392]. Or notre étude a été menée sur une cohorte américaine. Peut-être n'existe t'il aucun lien entre *B.burgdorferi* sensu stricto (l'espèce endémique en Amérique du Nord) et CTCL. Etant donné le lien fort entre *B.afzelii* et les manifestations cutanées de la maladie de Lyme, il serait intéressant de réaliser une autre étude sérologique sur une cohorte européenne.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des résultats de notre étude sérologique sur le lien entre PTCL et infections. PTCL n=108 ; contrôles sains n=108.

Logistic Models by Case-control status			**Adjusted Results**		
Whole cohort	N	Adjustment variables	OR	95% CI	P-value
Chlamydia spp	191	age, sex	3.55	1.92-6.56	0.0009
Borrelia burgdorferi	210	age, sex	1.33	0.29-6.11	0.715
Helicobacter Pylori	202	age, sex	0.35	0.09-1.36	0.130
Streptococcus pneumoniae	216	age, sex	0.64	0.37-1.13	0.124
Anaplastic large cell (systemic and cutaneous)	N	Adjustment variables	OR	95% CI	P-value
Chlamydia spp	117	age, sex	1.55	0.58-4.17	0.477
Streptococcus pneumoniae	130	age, sex	0.74	0.30-1.86	0.763
Angioimmunoblastic T	N	Adjustment variables	OR	95% CI	P-value
Chlamydia spp	108	age, sex	2.33	0.71-7.65	0.584
Streptococcus pneumoniae	123	age, sex	0.64	0.37-1.13	0.024
Peripheral T unspecified	N	Adjustment variables	OR	95% CI	P-value
Chlamydia spp	120	age, sex	5.81	2.20-15.38	0.005
Streptococcus pneumoniae	136	age, sex	1.50	0.60-3.75	0.388

En collaboration avec Orbio, nous avons également recherché la présence d'Ac anti-*Chalmydia* spp par test ELISA (Vircell). Les analyses ont révélé un taux d'infection 2 fois supérieur chez les patients PTCL comparés aux patients sains contrôles. L'infection par Chlamydia semble un facteur de risque important de développement de PTCL (OR=3.55 ; P-value=0.0009) et en particulier de PTCL-NOS (OR=5.81; P-value=0.005) (**Tableau 5**). Sachant qu'il existe plusieurs souches de *Chlamydia* (*pneumoniae*, *trachomatis* et *psittaci*), nous étudions actuellement la souche responsable de cet effet. Nos résultats préliminaires montrent une séropositivité majoritairement envers *Chlamydia pneumoniae*.

L'association entre *Chlamydia pneumoniae* et lymphomes fut étudiée dans une étude sérologique menée sur une collection de sérums de 53 patients présentant un lymphome non-Hodgkinien. Les résultats alors obtenus sont du même ordre que ceux de notre étude, à savoir une positivité d'Ac anti-*C.pneumoniae* de 63% chez les patients NHL contre 22% chez les contrôles sains (OR=7.3)[573]. Cependant cette étude ne décrit pas les types de NHL testés. *C.pneumoniae* a également été détectée dans une petite cohorte de lymphomes du MALT pulmonaire[574] et quelques cas de lymphomes du MALT oculaire[575,576] ou encore 1 cas d'ALCL cutané[577], mais aucune étude n'a rapporté une association forte, ni un lien de causalité. L'association avec les CTCL semble en revanche plus plausible. En effet, comme développé dans l'introduction, *C.pneumoniae* semble produire un super-Ag appelé *Sézary Activating Factor*[397,398], et la bactérie étant détectée dans 100% (5/5) des échantillons de CTCL testés, des résultats cependant non reproduits par une étude ultérieure réalisée sur 24 cas de MF, tous s'étant révélés négatifs en PCR[396]. Des résultats d'une étude récente menée sur 57 échantillons sanguins de patients CTCL reporte néanmoins la présence de la bactérie (détectée par qPCR) dans 24% des cas, contre 2,5% dans des psoriasis, 13% dans des dermatites atopiques et 0% dans les patients sains. De plus, la fréquence de *C.pneumoniae* est plus fréquente à des stades avancés de la maladie[578]. Ces résultats suggèrent fortement que *C.pneumoniae* n'est pas un agent causal des CTCL, mais sa présence plutôt une conséquence des dysfonctions immunitaires observées dans les CTCL.

Afin d'établir un éventuel lien causal entre cette infection et les PTCL dans notre étude, nous devons montrer l'antériorité de la séropositivité par rapport au PTCL. Nous avons pour cela accès aux sérums des même patients, prélevés plusieurs années avant le diagnostic, que nous allons tester selon les mêmes conditions que précédemment.

DES LYMPHOMES NKT CHEZ L'HOMME ?

Il s'agit là d'un chainon manquant important pour faire le parallèle entre notre modèle et la clinique. Plusieurs évidences nous laissent cependant supposer qu'au moins certains PTCL et en particulier une partie de SS et / ou MF peuvent provenir de cellules T non conventionnelles telles que des cellules NKT. Tout d'abord, des données récentes ont indiqué que le facteur de transcription PLFZ, le « master gene » de la différenciation des cellules T non conventionnelles, serait surexprimé dans les MF et SS[548]. Plus récemment, Jeon *et al*. évoquent clairement la possibilité que certains PTCL-NOS ou CTCL puissent dériver de cellules T non-conventionnelles sur la base de l'expression du facteur de transcription PLZF[549]. Sur une série de 588 hémopathies lymphoïdes, Jeon *et al*. ont donc retrouvé une expression de PLZF par immunohistochimie dans 27/54 cas de leucémie/lymphome lymphoblastique T, 1/51 cas de PTCL-NOS et 1/13 cas de CTCL (dont 9 cas exprimant une chaîne ß du TCR). Dans l'ensemble des autres hémopathies (B toutes entités confondues, AITL (n=46), EATL (n=6), NK/T nasal (n=80), ALCL ALK+ ou ALK- (n=34)) le marquage était négatif. Afin d'identifier une population iNKT, des PCR V α 24 ont été réalisées dans le cas du PTCL-NOS du CTCL (MF) PLZF^{+} en immunohistochimie et se sont avérées négatives. Nous avons retrouvé dans les bases de données publiques Oncomine (Compendia Bioscience, https://www.oncomine.com) l'expression de PLZF dans 3 lignées de syndrome de Sézary (SS). En plus des données transcriptomiques publiques de lignées de SS, une analyse de profils d'expression génique rapportée dans la littérature, comparant les cellules tumorales circulantes triées d'un patient atteint de SS aux cellules T normales de ce même patient (sur la base de la clonalité Vß5.1), a montré que le gène le plus significativement surexprimé dans les cellules de SS était PLZF[548]. Ces éléments, associés à l'inhibition de la voie p53 dans une vaste majorité des SS[501,502], aux rôles de l'IL-7 et de l'IL-15 dans la survie des cellules de SS[579], et à la délétion de Jarid2 dans 20% des SS[333], nous ont conduit à considérer le SS et/ou le mycosis fongoïde comme des lymphoproliférations de nature potentiellement NKT, et suivant des processus de lymphomagenèse similaires aux lymphomes NKT.

En étudiant les données transcriptomiques de la collection Tenomic, nous avons sélectionné une série de 13 PTCLs (AITL et PTCL-NOS) (**Figure 14**) présentant des niveaux élevés d'ARNm de PLZF, et séquencé leur chaine α du TCR. Les analyses n'ont révélé aucun lymphome exprimant une chaine Vα24. Cependant, nous avons identifié 1 PTCL-NOS exprimant un réarrangement TRAV1-TRAJ12, réarrangement retrouvé dans une faible proportion de cellules MAIT[232] avec une séquence protéique du CDR3 similaire (CAV***RPA***DSSYKLIF) à celles décrites dans la littérature[580]. La nature MAIT de ce PTCL nécessiterait d'être confirmée par marquage avec des tétramères MR1, mais il n'existe pas de cellules congelées de cet échantillon.

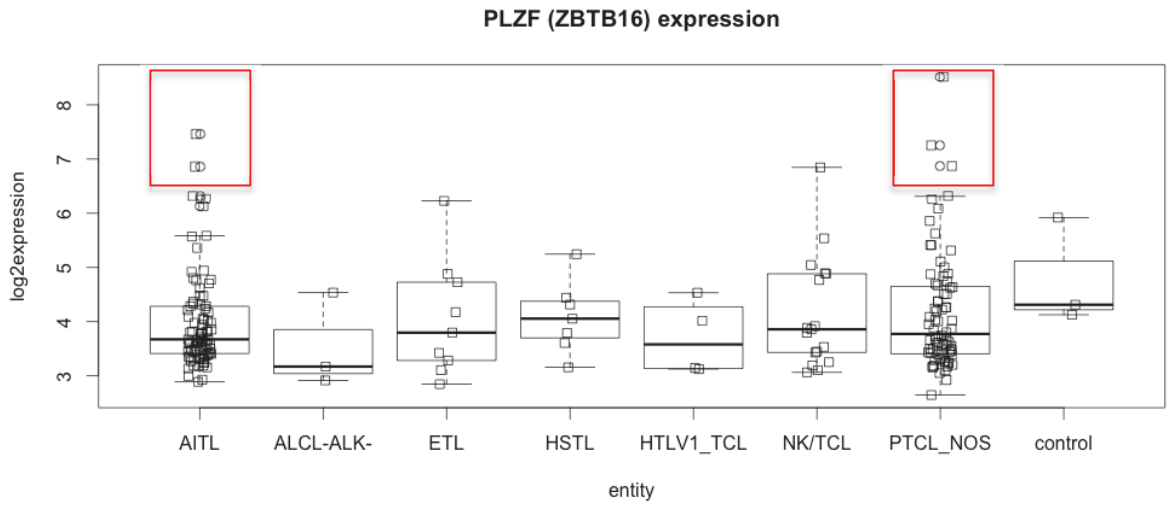


Figure 14 : Screening de lymphomes PLZF$^+$ sur la base des données transcriptomiques du projet Tenomic. Les lymphomes encadrés ont été sélectionnés pour un séquençage des chaines Vα et Vβ afin de mettre en évidence l'expression potentielle de chaines invariantes typiques de iNKT et des MAIT

Cependant il nous paraît important de relever que PLZF n'est pas restreint aux lymphocytes T non-conventionnels et est retrouvé dans un grand nombres de cellules souches (spermatogonies, progéniteurs neuronaux, cellules souches hématopoïétiques…), ainsi que de manière aberrante dans un certain nombre de tumeurs solides[581]. Ceci pourrait également être le cas dans certains lymphomes, rendant inapproprié la recherche de lymphomes T non conventionnel sur la base de l'expression de PLZF.

Chez l'homme, l'existence d'une entité à part entière dérivant de lymphocytes NKT invariants est a priori exclue puisque l'analyse du répertoire Vα mais surtout Vβ est clairement documentée dans la plupart des néoplasies lymphoïdes T et aucune restriction massive en faveur de Vα24 ou de Vβ11 (chaînes semi-invariantes exprimées chez l'homme) n'a été décrite. L'hypothèse du développement de lymphomes T à partir d'une population NKT de

type II apparaît largement plus plausible, d'une part car ils sont non invariants et d'autre part parce que leur fréquence semble plus importante chez l'homme que celle des NKT de type I[19].

ROLE DE JARID2 DANS LA LYMPHOMAGENESE

L'analyse de nos lymphomes par WES a permis de révéler des altérations génétiques récurrentes, et plus particulièrement une perte totale ou partielle d'une copie du chromosome 13. Parmi les 142 gènes contenus dans les régions minimales de délétion retrouvées dans tous les lymphomes NKT, un a particulièrement attiré notre attention : *Jarid2*. En effet il s'agit d'un gène particulièrement important dans la biologie des lymphocytes NKT.

Cette découverte est pour le moins surprenante puisque de telles altérations chromosomiques n'avaient pas été détectées en FISH multi-couleur dans ces mêmes lymphomes NKT de notre premier article[413]. De plus, aucun lymphome ne semblait produire d'IL-4. Il semblerait donc qu'il y ait une certaine divergence dans nos résultats, pour des raisons que nous ignorons. Il parait par exemple assez peu probable que les lymphomes NKT de nos 2 études soient des entités distinctes, ces 2 études contenant un groupe « contrôle » (PBS, ou milieu de culture), et qu'aucune distinction phénotypique, transcriptomique ou génotypique n'a été observé entre les lymphomes NKT des groupes « contrôles » et ceux des groupes infectés (*S.pneumoniae* et *B.burgdorferi*), suggérant des processus de lymphomagenèse semblables.

L'article de l'équipe de Rao (également auteur de l'article sur les souris *Tet2*/*Tet3*$^{-/-}$) publié dans *Nature Communication* en 2014[42] montre une expansion des lymphocytes NKT en périphérie dans les souris *Jarid2*$^{-/-}$ dans le compartiment T. Cet article montre que Jarid2 exerce un rôle répresseur sur le promoteur de *Zbtb16* (gene codant PLZF) via la méthylation en H3K9, et que les NKT *Jarid2*$^{-/-}$ présentent un profil type NKT2 (NK1.1^{-}, CD44^{+}, PLZF^{hi}), tout comme nos lymphomes NKT. La répression de PLZF par Jarid2 semble ainsi cruciale pour la génération de NKT1, la perte de Jarid2 provoquant sans doute une accumulation de NKT type NKT2. Nous avions jusqu'ici conclu que l'absence d'expression de NK1.1 dans les lymphomes NKT était une marque d'activation[539]. Or il n'est pas exclu que les lymphomes NKT soient en fait des entités au profil NKT2, profil provoqué par la perte de Jarid2 à un stade immature.

Ainsi, si Jarid2 est effectivement impliqué dans la lymphomagenèse NKT, à quel niveau sa délétion intervient-elle ? Est-ce :

- i) un événement précoce, ayant potentiellement lieu au niveau thymique dans des NKT immatures, provoquant une persistance de l'expression de PLZF, responsable alors d'un fort biais de développement vers la voie NKT2.

- ii) un événement mutationnel tardif, potentiellement induit par la stimulation antigénique chronique, imposant un profil NKT2-*like* à des NKT matures en périphérie.

Considérant le rôle important de Jarid2 dans le développement, et que jusqu'à maintenant son rôle n'est pas connu dans les NKT en périphérie, nous aurions tendance à favoriser la première hypothèse. De plus, ce type de mécanisme rappelle le modèle de lymphomes NKT dans les souris *Id2*/*Id3*$^{-/-}$, montrant que la perte de ces facteurs épigénétiques confère aux cellules NKT néonatales un profil pré-néoplasique, avec un grand nombre de voies dérégulées (*down*-régulation de voies pro-apoptotiques et antiprolifératives avec *up*-régulation de voies de progression du cycle cellulaire et pro-métastatiques) induisant une instabilité génomique[522]. Dans ce modèle, la stimulation chronique aurait un rôle « terminal » dans la lymphomagenèse NKT, peut-être favorisant simplement la prolifération des NKT pré-néoplasiques et initiant potentiellement d'autres mutations *passengers*. Ce modèle tel que nous l'imaginons actuellement est résumé dans la figure 15.

A l'inverse, la deuxième hypothèse permettrait d'expliquer le profil « mixte » observé dans les lymphomes NKT. En effet, un certain nombre des lymphomes NKT analysés expriment des marqueurs NKT1 et/ou NKT17, en plus d'un profil NKT2-*like*. Ces profils aberrants pourraient alors être des vestiges du sous-type de la cellule NKT d'origine de chaque lymphome.

De manière intéressante, les NKT2, comparés aux NKT1 et 17 possèdent un profil transcriptomique enrichit en expression de gènes du cycle cellulaire, reflétant un caractère prolifératif élevé, potentiellement pro-oncogénique dans notre contexte.

Plusieurs éléments clés restent à montrer sur ce modèle, notamment est ce que cette hypométhylation est retrouvée spécifiquement au niveau du promoteur de PLZF. Nous avons mis au point des expériences de q-ChiP afin d'étudier la question. Cependant, nous ne pouvons pas, à l'heure actuelle, éliminer la possibilité que ce profil particulier n'est qu'un simple effet collatéral de la délétion partielle ou totale du chromosome 13 contenant Jarid2, et qu'elle n'ait en fait aucun impact sur la lymphomagenèse. Evidemment, la preuve formelle du rôle de Jarid2 dans la lymphomagenèse nous sera apportée par le croisement de souris *p53*$^{-/-}$ avec les souris *Jarid2*$^{-/-}$. Les croisements pour générer ces animaux sont actuellement en cours au laboratoire. Si Jarid2 est effectivement impliqué dans la lymphomagenèse NKT, ces souris présenteront une lymphomagenèse accélérée ainsi que des fréquences de lymphomes NKT plus élevées que les souris *p53*$^{-/-}$. Il n'est d'ailleurs pas impossible que les souris *Jarid2*$^{-/-}$ développent elles aussi des lymphomes NKT. En effet, les animaux utilisés dans l'étude de

Pereira ne sont que des animaux jeunes (8 semaines). Nous pouvons donc imaginer que des animaux plus âgés finiront par développer une hémopathie NKT maligne.

PLZF, que nous retrouvons exprimé de manière aberrante dans tous les PTCL-NKT, semble être une conséquence de la perte de Jarid2. Cependant il convient de relever ici le potentiel que pourrait avoir une telle surexpression dans la lymphomagenèse. En effet, comme mentionné plus haut, PLZF est un facteur de différenciation mais aussi d'auto-renouvellement (de *stemness*) impliqué dans de nombreux types cellulaires, mais aux fonctions bien distinctes selon les types cellulaires en question, dont la régulation reste pour l'instant mal connue[582].

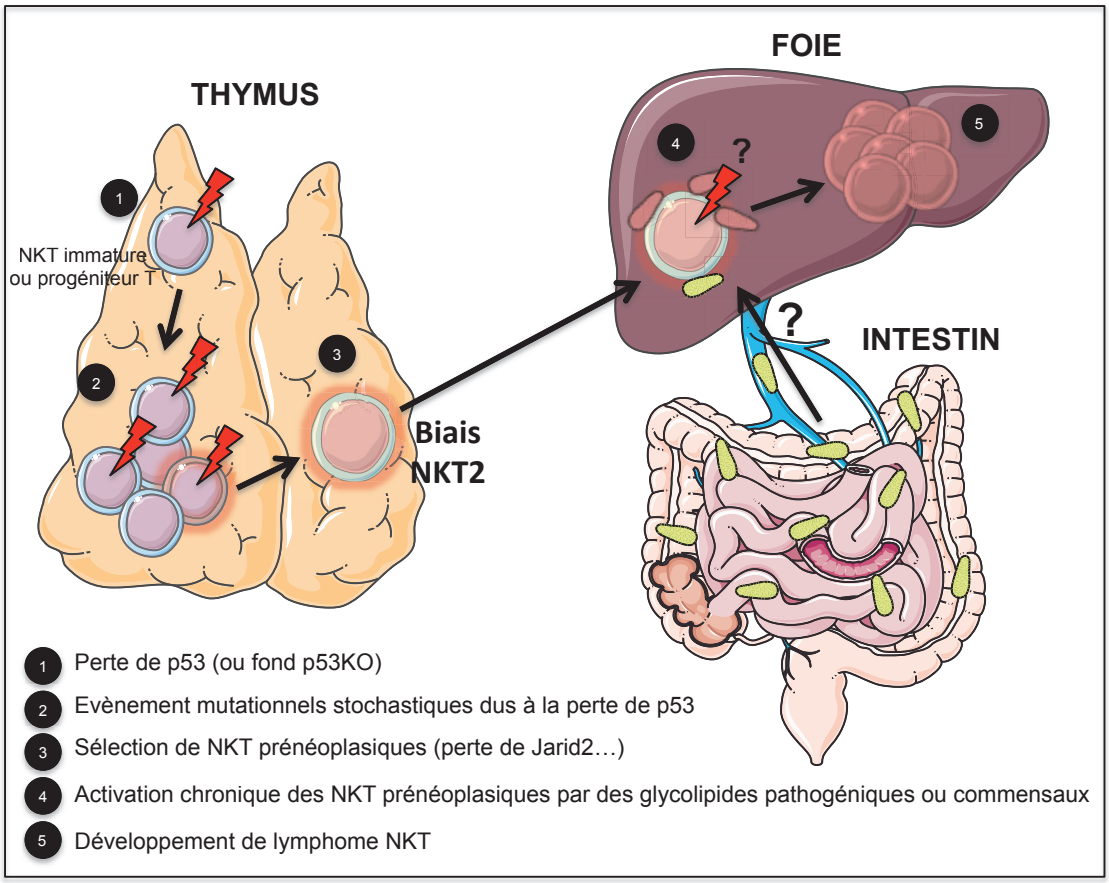


Figure 15 : Proposition de modèle de lymphomagenèse NKT associée à la perte de Jarid2 et la stimulation antigénique chroniques dans les souris *p53*$^{-/-}$.

Des résultats contradictoires ont ainsi été observés quand au rôle de PLZF dans l'apoptose et la prolifération. Bien que dans certains types cellulaires la surexpression de PLZF semble induire de l'apoptose, l'inverse a été observée dans les lymphocytes : des travaux ont en effet montré *in vitro* que la surexpression de PLZF dans des Jurkat leur conférait une résistance accrue à l'apoptose (induite par privation de sérum) via la répression de BID, un pro-apoptotique de la famille des Bcl-2[583]. Une autre étude menée dans différentes lignées

cellulaires a également montré un rôle pro-oncogénique de PLZF, notamment par des modèles de xénogreffe, via la répression de p53[581]. Ces résultats sont en contradiction avec des travaux de 2013, que nous estimons plus robuste, et sans doute plus applicable à notre modèle de lymphome NKT, puisque réalisée dans des NKT primaires et non pas des lignées T. Ici, PLZF confère un profil pro-apoptotique dans les iNKT et les MAIT humains (expression et activation basale de caspases 3 et 7), profil contrebalancé par expression de l'anti-apoptotique XIAP. L'inhibition de PLZF dans les NKT et les MAIT réduit ce profil pro-apoptotique, alors que la surexpression de PLZF dans des lymphocytes T conventionnels induit un phénotype pro-apoptotique. Les auteurs émettent alors l'hypothèse que ce phénomène pourrait être un moyen de contrôler ces lymphocytes T non conventionnels qui, de part leur fonction, sont facilement activables et nécessitent une régulation fine[584]. Ces résultats démontrant le rôle pro-apoptotique de PLZF paraissent assez peu conciliables avec nos données. Cependant, cette étude n'a pas adressé le rôle de p53 dans l'apoptose induite par PLZF. S'il s'agissait d'une apoptose p53-dépendante, alors l'expression de PLZF dans notre modèle serait incapable d'induire la mort des cellules NKT (*p53*$^{-/-}$), n'empêchant ainsi pas la progression des cellules (pré-)néoplasiques.

De manière intéressante, PLZF a été décrit comme inducteur de l'expression d'ICOS[54,546], que nous retrouvons très fortement exprimé dans les lymphomes NKT. Considérant l'importance d'ICOS dans la biologie des NKT, notamment dans leur survie[545], cette expression élevée dans les lymphomes pourrait potentiellement participer à leur progression. PLZF induit également l'expression d'Id2, un facteur épigénétique qui semble crucial dans la survie des NKT hépatiques (NKT1 principalement)[585]. Bien que ces résultats soutiennent un rôle de PLZF dans la lymphomagenèse, ils semblent en contradiction avec le modèle murin *Id2*/*Id3*$^{-/-}$ développant des lymphomes NKT[522]. Cela peut s'expliquer par des fonctions bien distinctes d'Id2 en fonction du stade de développement, puisque Id2 est également un répresseur de la prolifération NKT aux stades immatures (stade 1) [586,587].

Afin d'étudier plus largement l'effet d'une délétion de Jarid2 sur la biologie NKT, nous prévoyons également de réaliser des expériences d'ATAC-Seq sur des NKT *Jarid2*$^{-/-}$ en comparaison à des NKT WT. Cela nous permettra d'observer les modifications induites par cette délétion au niveau chromatinien et d'identifier des voies potentielles pouvant être impliqués dans la lymphomagenèse associée à Jarid2 par l'acquisition d'un profil pré-néoplasique.

Conclusion

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse a donc permis de mieux caractériser une nouvelle entité de PTCL découverte au laboratoire, ayant pour origine les lymphocytes NKT. Nous avons montré dans un premier temps que c'est l'activation directe du TCR NKT par des glycolipides microbiens qui est responsable de la lymphomagenèse NKT. Nous n'avons cependant pas pu répondre à la question du rôle du microbiote. Par la suite, nos travaux menés sur *Borrelia* sont venus renforcer le concept selon lequel certaines infections chroniques peuvent induire des lymphomes, et en particulier l'implication de *Borrelia* dans la lymphomagenèse T, fait encore controversé. Cette étude a également permis de mettre en évidence certains aspects des lymphomes NKT que nous n'avions pas identifié dans notre article de 2016, tels qu'un profil plutôt NKT2, ainsi que des aberrations chromosomiques récurrentes, dont des pertes du chromosome 13 contenant *Jarid2*. Compte tenu de la considération grandissante de tels facteurs dans la lymphomagenèse, nous pensons que la perte de *Jarid2* pourrait être un élément important de la transformation NKT. D'autre part, nos données sérologiques obtenues chez l'homme semblent suggérer une forte association entre *Chlamydia pneumoniae* et certains sous-types de PTCL.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Bendelac A, Killeen N, Littman DR, Schwartz RH. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science*. 1994;263(5154):1774-1778.

2. Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature*. 1994;372(6507):691-694. doi:10.1038/372691a0.

3. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science*. 1995;268(5212):863-865.

4. Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med*. 1993;178(1):1-16.

5. Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med*. 1994;180(3):1171-1176.

6. Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med*. 1994;180(3):1097-1106.

7. Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, et al. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature*. 1987;329(6136):251-254. doi:10.1038/329251a0.

8. Ohteki T, Seki S, Abo T, Kumagai K. Liver is a possible site for the proliferation of abnormal CD3+4-8- double-negative lymphocytes in autoimmune MRL-lpr/lpr mice. *J Exp Med*. 1990;172(1):7-12.

9. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*. 1997;278(5343):1626-1629.

10. Benlagha K, Weiss A, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J Exp Med*. 2000;191(11):1895-1903.

11. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, et al. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med*. 2000;192(5):741-754.

12. Lee YJ, Holzapfel KL, Zhu J, Jameson SC, Hogquist KA. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nat Immunol*. 2013;14(11):1146-1154. doi:10.1038/ni.2731.

13. Constantinides MG, Bendelac A. Transcriptional regulation of the NKT cell lineage. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(2):161-167. doi:10.1016/j.coi.2013.01.003.

14. Lee YJ, Wang H, Starrett GJ, Phuong V, Jameson SC, Hogquist KA. Tissue-Specific

Distribution of iNKT Cells Impacts Their Cytokine Response. *Immunity*. 2015;43(3):566-578. doi:10.1016/j.immuni.2015.06.025.

15. Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med*. 2002;195(5):637-641. doi:10.1084/jem.20011908.

16. Chang P-P, Barral P, Fitch J, et al. Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. *Nat Immunol*. 2011;13(1):35-43. doi:10.1038/ni.2166.

17. Lynch L, Michelet X, Zhang S, et al. Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. *Nat Immunol*. 2015;16(1):85-95. doi:10.1038/ni.3047.

18. Arrenberg P, Halder R, Kumar V. Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J Cell Physiol*. 2009;218(2):246-250. doi:10.1002/jcp.21597.

19. Exley MA, Tahir SM, Cheng O, et al. A major fraction of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can suppress mixed lymphocyte responses. *J Immunol*. 2001;167(10):5531-5534.

20. Jahng A, Maricic I, Aguilera C, Cardell S, Halder RC, Kumar V. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med*. 2004;199(7):947-957. doi:10.1084/jem.20031389.

21. Chen YH, Chiu NM, Mandal M, Wang N, Wang CR. Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity*. 1997;6(4):459-467.

22. Cui J, Shin T, Kawano T, et al. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science*. 1997;278(5343):1623-1626.

23. Bedel R, Matsuda JL, Brigl M, et al. Lower TCR repertoire diversity in Traj18-deficient mice. *Nat Immunol*. 2012;13(8):705-706. doi:10.1038/ni.2347.

24. Chandra S, Zhao M, Budelsky A, et al. A new mouse strain for the analysis of invariant NKT cell function. *Nat Immunol*. June 2015. doi:10.1038/ni.3203.

25. Zhang J, Bedel R, Krovi SH, et al. Mutation of the Traj18 gene segment using TALENs to generate Natural Killer T cell deficient mice. *Sci Rep*. 2016;6:27375. doi:10.1038/srep27375.

26. Roy S, Ly D, Castro CD, et al. Molecular Analysis of Lipid-Reactive Vδ1 γδ T Cells Identified by CD1c Tetramers. *The Journal of Immunology*. 2016;196(4):1933-1942. doi:10.4049/jimmunol.1502202.

27. Rhost S, Löfbom L, Rynmark B-M, et al. Identification of novel glycolipid ligands activating a sulfatide-reactive, CD1d-restricted, type II natural killer T lymphocyte. *Eur J Immunol*. 2012;42(11):2851-2860. doi:10.1002/eji.201142350.

28. Chang DH, Deng H, Matthews P, et al. Inflammation-associated lysophospholipids as ligands for CD1d-restricted T cells in human cancer. *Blood*. 2008;112(4):1308-1316. doi:10.1182/blood-2008-04-149831.

29. Tatituri RVV, Watts GFM, Bhowruth V, et al. Recognition of microbial and mammalian phospholipid antigens by NKT cells with diverse TCRs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(5):1827-1832. doi:10.1073/pnas.1220601110.

30. Speiser DE, Valmori D, Rimoldi D, et al. CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients. *Eur J Immunol*. 1999;29(6):1990-1999. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199906)29:06<1990::AID-IMMU1990>3.0.CO;2-9.

31. Pittet MJ, Speiser DE, Valmori D, Cerottini JC, Romero P. Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+ T cells closely correlates with CD56 surface expression. *J Immunol*. 2000;164(3):1148-1152.

32. McNerlan SE, Rea IM, Alexander HD, Morris TC. Changes in natural killer cells, the CD57CD8 subset, and related cytokines in healthy aging. *J Clin Immunol*. 1998;18(1):31-38.

33. Seyda M, Elkhal A, Quante M, Falk CS, Tullius SG. T Cells Going Innate. *Trends Immunol*. July 2016. doi:10.1016/j.it.2016.06.004.

34. Vallejo AN, Brandes JC, Weyand CM, Goronzy JJ. Modulation of CD28 expression: distinct regulatory pathways during activation and replicative senescence. *J Immunol*. 1999;162(11):6572-6579.

35. Gapin L, Matsuda JL, Surh CD, Kronenberg M. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol*. 2001;2(10):971-978. doi:10.1038/ni710.

36. Egawa T, Eberl G, Taniuchi I, et al. Genetic evidence supporting selection of the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity*. 2005;22(6):705-716. doi:10.1016/j.immuni.2005.03.011.

37. Griewank K, Borowski C, Rietdijk S, et al. Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity*. 2007;27(5):751-762. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.020.

38. Moran AE, Holzapfel KL, Xing Y, et al. T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(6):1279-1289. doi:10.1084/jem.20110308.

39. Bedel R, Berry R, Mallevaey T, et al. Effective functional maturation of invariant natural killer T cells is constrained by negative selection and T-cell antigen receptor affinity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(1):E119-E128. doi:10.1073/pnas.1320777110.

40. Zhao J, Weng X, Bagchi S, Wang CR. Polyclonal type II natural killer T cells require PLZF and SAP for their development and contribute to CpG-mediated antitumor

response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(7):2674-2679. doi:10.1073/pnas.1323845111.

41. Weng X, Liao C-M, Bagchi S, Cardell SL, Stein PL, Wang C-R. The adaptor protein SAP regulates type II NKT-cell development, cytokine production, and cytotoxicity against lymphoma. *Eur J Immunol*. 2014;44(12):3646-3657. doi:10.1002/eji.201444848.

42. Pereira RM, Martinez GJ, Engel I, et al. Jarid2 is induced by TCR signalling and controls iNKT cell maturation. *Nat Commun*. 2014;5:4540. doi:10.1038/ncomms5540.

43. Dobenecker M-W, Kim JK, Marcello J, et al. Coupling of T cell receptor specificity to natural killer T cell development by bivalent histone H3 methylation. *Journal of Experimental Medicine*. 2015;212(3):297-306. doi:10.1084/jem.20141499.

44. Tsagaratou A, González-Avalos E, Rautio S, et al. TET proteins regulate the lineage specification and TCR-mediated expansion of iNKT cells. *Nat Immunol*. 2017;18(1):45-53. doi:10.1038/ni.3630.

45. Northrup D, Yagi R, Cui K, et al. Histone demethylases UTX and JMJD3 are required for NKT cell development in mice. *Cell Biosci*. 2017;7(1):25. doi:10.1186/s13578-017-0152-8.

46. Lazarevic V, Zullo AJ, Schweitzer MN, et al. The gene encoding early growth response 2, a target of the transcription factor NFAT, is required for the development and maturation of natural killer T cells. *Nat Immunol*. 2009;10(3):306-313. doi:10.1038/ni.1696.

47. Seiler MP, Mathew R, Liszewski MK, et al. Elevated and sustained expression of the transcription factors Egr1 and Egr2 controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling. *Nat Immunol*. 2012;13(3):264-271. doi:10.1038/ni.2230.

48. Dutta M, Kraus ZJ, Gomez-Rodriguez J, et al. A role for Ly108 in the induction of promyelocytic zinc finger transcription factor in developing thymocytes. *The Journal of Immunology*. 2013;190(5):2121-2128. doi:10.4049/jimmunol.1202145.

49. Castillo EF, Acero LF, Stonier SW, Zhou D, Schluns KS. Thymic and peripheral microenvironments differentially mediate development and maturation of iNKT cells by IL-15 transpresentation. *Blood*. 2010;116(14):2494-2503. doi:10.1182/blood-2010-03-277103.

50. Vasanthakumar A, Xu D, Lun AT, et al. A non-canonical function of Ezh2 preserves immune homeostasis. *EMBO Rep*. 2017;18(4):619-631. doi:10.15252/embr.201643237.

51. Kovalovsky D, Alonzo ES, Uche OU, Eidson M, Nichols KE, Sant'Angelo DB. PLZF induces the spontaneous acquisition of memory/effector functions in T cells independently of NKT cell-related signals. *The Journal of Immunology*. 2010;184(12):6746-6755. doi:10.4049/jimmunol.1000776.

52. Savage AK, Constantinides MG, Han J, et al. The transcription factor PLZF directs

the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity*. 2008;29(3):391-403. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.011.

53. Kovalovsky D, Uche OU, Eladad S, et al. The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat Immunol*. 2008;9(9):1055-1064. doi:10.1038/ni.1641.

54. Mao A-P, Constantinides MG, Mathew R, et al. Multiple layers of transcriptional regulation by PLZF in NKT-cell development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(27):7602-7607. doi:10.1073/pnas.1601504113.

55. Benlagha K, Kyin T, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science*. 2002;296(5567):553-555.

56. Georgiev H, Ravens I, Benarafa C, Förster R, Bernhardt G. Distinct gene expression patterns correlate with developmental and functional traits of iNKT subsets. *Nat Commun*. 2016;7:13116. doi:10.1038/ncomms13116.

57. Michel M-L, Lenoir C, Massot B, et al. SLAM-associated protein favors the development of iNKT2 over iNKT17 cells. *Eur J Immunol*. 2016;46(9):2162-2174. doi:10.1002/eji.201646313.

58. Gapin L. Development of invariant natural killer T cells. *Curr Opin Immunol*. 2016;39:68-74. doi:10.1016/j.coi.2016.01.001.

59. Stanic AK, De Silva AD, Park J-J, et al. Defective presentation of the CD1d1-restricted natural Va14Ja18 NKT lymphocyte antigen caused by beta-D-glucosylceramide synthase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(4):1849-1854. doi:10.1073/pnas.0430327100.

60. Zhou D, Mattner J, Cantu C, et al. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science*. 2004;306(5702):1786-1789. doi:10.1126/science.1103440.

61. Porubsky S, Speak AO, Luckow B, Cerundolo V, Platt FM, Gröne H-J. Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(14):5977-5982. doi:10.1073/pnas.0611139104.

62. Speak AO, Salio M, Neville DCA, et al. Implications for invariant natural killer T cell ligands due to the restricted presence of isoglobotrihexosylceramide in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(14):5971-5976. doi:10.1073/pnas.0607285104.

63. Pei B, Speak AO, Shepherd D, et al. Diverse endogenous antigens for mouse NKT cells: self-antigens that are not glycosphingolipids. *The Journal of Immunology*. 2011;186(3):1348-1360. doi:10.4049/jimmunol.1001008.

64. Kain L, Webb B, Anderson BL, et al. The Identification of the Endogenous Ligands of Natural Killer T Cells Reveals the Presence of Mammalian α-Linked Glycosylceramides. *Immunity*. 2014;41(4):543-554. doi:10.1016/j.immuni.2014.08.017.

65. Pellicci DG, Uldrich AP, Kyparissoudis K, et al. Intrathymic NKT cell development

is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol*. 2003;33(7):1816-1823. doi:10.1002/eji.200323894.

66. Schümann J, Pittoni P, Tonti E, Macdonald HR, Dellabona P, Casorati G. Targeted expression of human CD1d in transgenic mice reveals independent roles for thymocytes and thymic APCs in positive and negative selection of Valpha14i NKT cells. *J Immunol*. 2005;175(11):7303-7310.

67. van den Elzen P, Garg S, León L, et al. Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature*. 2005;437(7060):906-910. doi:10.1038/nature04001.

68. Barral DC, Brenner MB. CD1 antigen presentation: how it works. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(12):929-941. doi:10.1038/nri2191.

69. Salio M, Ghadbane H, Dushek O, et al. Saposins modulate human invariant Natural Killer T cells self-reactivity and facilitate lipid exchange with CD1d molecules during antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(49):E4753-E4761. doi:10.1073/pnas.1310050110.

70. Kang S-J, Cresswell P. Saposins facilitate CD1d-restricted presentation of an exogenous lipid antigen to T cells. *Nat Immunol*. 2004;5(2):175-181. doi:10.1038/ni1034.

71. Torreno-Pina JA, Manzo C, Salio M, et al. The actin cytoskeleton modulates the activation of iNKT cells by segregating CD1d nanoclusters on antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. January 2016:201514530. doi:10.1073/pnas.1514530113.

72. Zeng Z. Crystal Structure of Mouse CD1: An MHC-Like Fold with a Large Hydrophobic Binding Groove. *Science*. 1997;277(5324):339-345. doi:10.1126/science.277.5324.339.

73. Koch M, Stronge VS, Shepherd D, et al. The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide. *Nat Immunol*. 2005;6(8):819-826. doi:10.1038/ni1225.

74. Moody DB, Zajonc DM, Wilson IA. Anatomy of CD1-lipid antigen complexes. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(5):387-399. doi:10.1038/nri1605.

75. Pellicci DG, Clarke AJ, Patel O, et al. Recognition of β-linked self glycolipids mediated by natural killer T cell antigen receptors. *Nat Immunol*. 2011;12(9):827-833. doi:10.1038/ni.2076.

76. Yu ED, Girardi E, Wang J, Zajonc DM. Cutting edge: structural basis for the recognition of β-linked glycolipid antigens by invariant NKT cells. *The Journal of Immunology*. 2011;187(5):2079-2083. doi:10.4049/jimmunol.1101636.

77. Chamoto K, Guo T, Scally SW, et al. Key Residues at Third CDR3β Position Impact Structure and Antigen Recognition of Human Invariant NK TCRs. *The Journal of Immunology*. December 2016:1601556. doi:10.4049/jimmunol.1601556.

78. Matsuda JL, Gapin L, Fazilleau N, Warren K, Naidenko OV, Kronenberg M. Natural

killer T cells reactive to a single glycolipid exhibit a highly diverse T cell receptor beta repertoire and small clone size. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(22):12636-12641. doi:10.1073/pnas.221445298.

79. Borg NA, Wun KS, Kjer-Nielsen L, et al. CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. *Nature*. 2007;448(7149):44-49. doi:10.1038/nature05907.

80. Adams JJ, Narayanan S, Liu B, et al. T cell receptor signaling is limited by docking geometry to peptide-major histocompatibility complex. *Immunity*. 2011;35(5):681-693. doi:10.1016/j.immuni.2011.09.013.

81. Girardi E, Maricic I, Wang J, et al. Type II natural killer T cells use features of both innate-like and conventional T cells to recognize sulfatide self antigens. *Nat Immunol*. 2012;13(9):851-856. doi:10.1038/ni.2371.

82. Thedrez A, de Lalla C, Allain S, et al. CD4 engagement by CD1d potentiates activation of CD4+ invariant NKT cells. *Blood*. 2007;110(1):251-258. doi:10.1182/blood-2007-01-066217.

83. Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Developing NKT cells need their calcium. *Nat Immunol*. 2009;10(3):231-233. doi:10.1038/ni0309-231.

84. Shen S, Chen Y, Gorentla BK, Lu J, Stone JC, Zhong X-P. Critical roles of RasGRP1 for invariant NKT cell development. *The Journal of Immunology*. 2011;187(9):4467-4473. doi:10.4049/jimmunol.1003798.

85. Shen S, Wu J, Srivatsan S, et al. Tight regulation of diacylglycerol-mediated signaling is critical for proper invariant NKT cell development. *The Journal of Immunology*. 2011;187(5):2122-2129. doi:10.4049/jimmunol.1100495.

86. Stanic AK, Bezbradica JS, Park J-J, Van Kaer L, Boothby MR, Joyce S. Cutting edge: the ontogeny and function of Va14Ja18 natural T lymphocytes require signal processing by protein kinase C theta and NF-kappa B. *J Immunol*. 2004;172(8):4667-4671.

87. Sivakumar V, Hammond KJL, Howells N, Pfeffer K, Weih F. Differential requirement for Rel/nuclear factor kappa B family members in natural killer T cell development. *J Exp Med*. 2003;197(12):1613-1621. doi:10.1084/jem.20022234.

88. Leite-De-Moraes MC, Hameg A, Arnould A, et al. A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J Immunol*. 1999;163(11):5871-5876.

89. Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, et al. The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med*. 1999;189(7):1121-1128.

90. Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol*. 2003;4(12):1230-1237. doi:10.1038/ni1002.

91. Brigl M, Tatituri RVV, Watts GFM, et al. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(6):1163-1177. doi:10.1084/jem.20102555.

92. Szatmari I, Gogolak P, Im JS, Dezso B, Rajnavolgyi E, Nagy L. Activation of PPARgamma specifies a dendritic cell subtype capable of enhanced induction of iNKT cell expansion. *Immunity*. 2004;21(1):95-106. doi:10.1016/j.immuni.2004.06.003.

93. Szatmari I, Pap A, Rühl R, et al. PPARgamma controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *J Exp Med*. 2006;203(10):2351-2362. doi:10.1084/jem.20060141.

94. Zeissig S, Murata K, Sweet L, et al. Hepatitis B virus-induced lipid alterations contribute to natural killer T cell-dependent protective immunity. *Nat Med*. 2012;18(7):1060-1068. doi:10.1038/nm.2811.

95. Nagarajan NA, Kronenberg M. Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2007;178(5):2706-2713.

96. Holzapfel KL, Tyznik AJ, Kronenberg M, Hogquist KA. Antigen-dependent versus -independent activation of invariant NKT cells during infection. *The Journal of Immunology*. 2014;192(12):5490-5498. doi:10.4049/jimmunol.1400722.

97. Kulkarni RR, Villanueva AI, Elawadli I, et al. Costimulatory activation of murine invariant natural killer T cells by toll-like receptor agonists. *Cell Immunol*. 2012;277(1-2):33-43. doi:10.1016/j.cellimm.2012.06.002.

98. Kim HY, Kim S, Chung DH. FcgammaRIII engagement provides activating signals to NKT cells in antibody-induced joint inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(9):2484-2492. doi:10.1172/JCI27219.

99. Kuylenstierna C, Björkström NK, Andersson SK, et al. NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytolysis and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur J Immunol*. 2011;41(7):1913-1923. doi:10.1002/eji.200940278.

100. Fujii S-I, Shimizu K, Hemmi H, Steinman RM. Innate Valpha14(+) natural killer T cells mature dendritic cells, leading to strong adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2007;220(1):183-198. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00561.x.

101. Carnaud C, Lee D, Donnars O, et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol*. 1999;163(9):4647-4650.

102. Stetson DB, Mohrs M, Reinhardt RL, et al. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med*. 2003;198(7):1069-1076. doi:10.1084/jem.20030630.

103. Oh SJ, Ahn JY, Chung DH. Comparison of Invariant NKT Cells with Conventional T Cells by Using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). *Immune Netw*.

2011;11(6):406-411. doi:10.4110/in.2011.11.6.406.

104. Schmieg J, Yang G, Franck RW, Tsuji M. Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide. *J Exp Med*. 2003;198(11):1631-1641. doi:10.1084/jem.20031192.

105. Padte NN, Li X, Tsuji M, Vasan S. Clinical development of a novel CD1d-binding NKT cell ligand as a vaccine adjuvant. *Clin Immunol*. 2011;140(2):142-151. doi:10.1016/j.clim.2010.11.009.

106. Chang Y-J, Huang J-R, Tsai Y-C, et al. Potent immune-modulating and anticancer effects of NKT cell stimulatory glycolipids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(25):10299-10304. doi:10.1073/pnas.0703824104.

107. Carreño LJ, Kharkwal SS, Porcelli SA. Optimizing NKT cell ligands as vaccine adjuvants. *Immunotherapy*. 2014;6(3):309-320. doi:10.2217/imt.13.175.

108. Hung J-T, Huang J-R, Yu AL. Tailored design of NKT-stimulatory glycolipids for polarization of immune responses. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):22. doi:10.1186/s12929-017-0325-0.

109. Kinjo Y, Wu D, Kim G, et al. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature*. 2005;434(7032):520-525. doi:10.1038/nature03407.

110. Mattner J, Debord KL, Ismail N, et al. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature*. 2005;434(7032):525-529. doi:10.1038/nature03408.

111. Kawakami K, Yamamoto N, Kinjo Y, et al. Critical role of Valpha14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against Streptococcus pneumoniae infection. *Eur J Immunol*. 2003;33(12):3322-3330. doi:10.1002/eji.200324254.

112. Kinjo Y, Illarionov P, Vela JL, et al. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol*. 2011;12(10):966-974. doi:10.1038/ni.2096.

113. Kumar H, Belperron A, Barthold SW, Bockenstedt LK. Cutting edge: CD1d deficiency impairs murine host defense against the spirochete, Borrelia burgdorferi. *J Immunol*. 2000;165(9):4797-4801.

114. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, et al. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol*. 2006;7(9):978-986. doi:10.1038/ni1380.

115. Chackerian A, Alt J, Perera V, Behar SM. Activation of NKT cells protects mice from tuberculosis. *Infection and Immunity*. 2002;70(11):6302-6309. doi:10.1128/IAI.70.11.6302-6309.2002.

116. Ito Y, Vela JL, Matsumura F, et al. Helicobacter pylori cholesteryl α-glucosides contribute to its pathogenicity and immune response by natural killer T cells. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e78191. doi:10.1371/journal.pone.0078191.

117. Peng Y, Zhao L, Shekhar S, et al. The glycolipid exoantigen derived from Chlamydia muridarum activates invariant natural killer T cells. *Cell Mol Immunol*. 2012;9(4):361-366. doi:10.1038/cmi.2012.19.

118. Shekhar S, Joyee AG, Yang X. Dynamics of NKT-Cell Responses to Chlamydial Infection. *Front Immunol*. 2015;6:233. doi:10.3389/fimmu.2015.00233.

119. Tupin E, Benhnia MR-E-I, Kinjo Y, et al. NKT cells prevent chronic joint inflammation after infection with Borrelia burgdorferi. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(50):19863-19868. doi:10.1073/pnas.0810519105.

120. Olson CM, Bates TC, Izadi H, et al. Local production of IFN-gamma by invariant NKT cells modulates acute Lyme carditis. *The Journal of Immunology*. 2009;182(6):3728-3734. doi:10.4049/jimmunol.0804111.

121. Lee W-Y, Moriarty TJ, Wong CHY, et al. An intravascular immune response to Borrelia burgdorferi involves Kupffer cells and iNKT cells. *Nat Immunol*. 2010;11(4):295-302. doi:10.1038/ni.1855.

122. Lee W-Y, Sanz M-J, Wong CHY, et al. Invariant natural killer T cells act as an extravascular cytotoxic barrier for joint-invading Lyme Borrelia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(38):13936-13941. doi:10.1073/pnas.1404769111.

123. Katchar K, Drouin EE, Steere AC. Natural killer cells and natural killer T cells in Lyme arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(6):R183. doi:10.1186/ar4373.

124. Cavallari M, Stallforth P, Kalinichenko A, et al. A semisynthetic carbohydrate-lipid vaccine that protects against S. pneumoniae in mice. *Nat Chem Biol*. 2014;10(11):950-956. doi:10.1038/nchembio.1650.

125. Grubor-Bauk B, Simmons A, Mayrhofer G, Speck PG. Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J Immunol*. 2003;170(3):1430-1434.

126. Petro C, González PA, Cheshenko N, et al. Herpes simplex type 2 virus deleted in glycoprotein D protects against vaginal, skin and neural disease. *Elife*. 2015;4:e06054. doi:10.7554/eLife.06054.

127. Tyznik AJ, Tupin E, Nagarajan NA, Her MJ, Benedict CA, Kronenberg M. Cutting edge: the mechanism of invariant NKT cell responses to viral danger signals. *The Journal of Immunology*. 2008;181(7):4452-4456.

128. Wesley JD, Tessmer MS, Chaukos D, Brossay L. NK cell-like behavior of Valpha14i NK T cells during MCMV infection. *PLoS Pathog*. 2008;4(7):e1000106. doi:10.1371/journal.ppat.1000106.

129. Pasquier B, Yin L, Fondanèche M-C, et al. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med*. 2005;201(5):695-701. doi:10.1084/jem.20042432.

130. Banovic T, Yanilla M, Simmons R, et al. Disseminated varicella infection caused by varicella vaccine strain in a child with low invariant natural killer T cells and

diminished CD1d expression. *J Infect Dis*. 2011;204(12):1893-1901. doi:10.1093/infdis/jir660.

131. Levy O, Orange JS, Hibberd P, et al. Disseminated varicella infection due to the vaccine strain of varicella-zoster virus, in a patient with a novel deficiency in natural killer T cells. *J Infect Dis*. 2003;188(7):948-953. doi:10.1086/378503.

132. Raftery MJ, Winau F, Kaufmann SHE, Schaible UE, Schönrich G. CD1 antigen presentation by human dendritic cells as a target for herpes simplex virus immune evasion. *J Immunol*. 2006;177(9):6207-6214.

133. Yuan W, Dasgupta A, Cresswell P. Herpes simplex virus evades natural killer T cell recognition by suppressing CD1d recycling. *Nat Immunol*. 2006;7(8):835-842. doi:10.1038/ni1364.

134. Sanchez DJ, Gumperz JE, Ganem D. Regulation of CD1d expression and function by a herpesvirus infection. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(5):1369-1378. doi:10.1172/JCI24041.

135. Hage CA, Kohli LL, Cho S, Brutkiewicz RR, Twigg HL, Knox KS. Human immunodeficiency virus gp120 downregulates CD1d cell surface expression. *Immunol Lett*. 2005;98(1):131-135. doi:10.1016/j.imlet.2004.10.025.

136. Renukaradhya GJ, Webb TJR, Khan MA, et al. Virus-induced inhibition of CD1d1-mediated antigen presentation: reciprocal regulation by p38 and ERK. *J Immunol*. 2005;175(7):4301-4308.

137. Miura S, Kawana K, Schust DJ, et al. CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *J Virol*. 2010;84(22):11614-11623. doi:10.1128/JVI.01053-10.

138. Motsinger A, Haas DW, Stanic AK, Van Kaer L, Joyce S, Unutmaz D. CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med*. 2002;195(7):869-879.

139. van der Vliet HJJ, Blomberg von BME, Hazenberg MD, et al. Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol*. 2002;168(3):1490-1495.

140. Ibarrondo FJ, Wilson SB, Hultin LE, et al. Preferential depletion of gut CD4-expressing iNKT cells contributes to systemic immune activation in HIV-1 infection. *Mucosal Immunol*. 2013;6(3):591-600. doi:10.1038/mi.2012.101.

141. Ronet C, Darche S, Leite de Moraes M, et al. NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against Toxoplasma gondii. *J Immunol*. 2005;175(2):899-908.

142. Karmakar S, Bhaumik SK, Paul J, De T. TLR4 and NKT cell synergy in immunotherapy against visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002646. doi:10.1371/journal.ppat.1002646.

143. Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, et al. Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V alpha 14 NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. *J Immunol*. 2001;167(11):6525-6532.

144. Albacker LA, Chaudhary V, Chang Y-J, et al. Invariant natural killer T cells recognize a fungal glycosphingolipid that can induce airway hyperreactivity. *Nat Med*. 2013;19(10):1297-1304. doi:10.1038/nm.3321.

145. Olszak T, An D, Zeissig S, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*. 2012;336(6080):489-493. doi:10.1126/science.1219328.

146. Wingender G, Stepniak D, Krebs P, et al. Intestinal microbes affect phenotypes and functions of invariant natural killer T cells in mice. *Gastroenterology*. 2012;143(2):418-428. doi:10.1053/j.gastro.2012.04.017.

147. Selvanantham T, Lin Q, Guo CX, et al. NKT Cell-Deficient Mice Harbor an Altered Microbiota That Fuels Intestinal Inflammation during Chemically Induced Colitis. *The Journal of Immunology*. 2016;197(11):4464-4472. doi:10.4049/jimmunol.1601410.

148. Wieland Brown LC, Penaranda C, Kashyap PC, et al. Production of α-galactosylceramide by a prominent member of the human gut microbiota. *PLoS Biol*. 2013;11(7):e1001610. doi:10.1371/journal.pbio.1001610.

149. An D, Oh SF, Olszak T, et al. Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. *Cell*. 2014;156(1-2):123-133. doi:10.1016/j.cell.2013.11.042.

150. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(7):467-478. doi:10.1038/nri2781.

151. Schmolka N, Serre K, Grosso AR, et al. Epigenetic and transcriptional signatures of stable versus plastic differentiation of proinflammatory γδ T cell subsets. *Nat Immunol*. 2013;14(10):1093-1100. doi:10.1038/ni.2702.

152. Prinz I, Silva-Santos B, Pennington DJ. Functional development of γδ T cells. *Eur J Immunol*. 2013;43(8):1988-1994. doi:10.1002/eji.201343759.

153. Deusch K, Lüling F, Reich K, Classen M, Wagner H, Pfeffer K. A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma/delta T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V delta 1 gene segment. *Eur J Immunol*. 1991;21(4):1053-1059. doi:10.1002/eji.1830210429.

154. Sumaria N, Roediger B, Ng LG, et al. Cutaneous immunosurveillance by self-renewing dermal gammadelta T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(3):505-518. doi:10.1084/jem.20101824.

155. Candéias S, Peschon JJ, Muegge K, Durum SK. Defective T-cell receptor gamma gene rearrangement in interleukin-7 receptor knockout mice. *Immunol Lett*. 1997;57(1-3):9-14.

156. Dudley EC, Girardi M, Owen MJ, Hayday AC. Alpha beta and gamma delta T cells can share a late common precursor. *Curr Biol*. 1995;5(6):659-669.

157. Melichar HJ, Narayan K, Der SD, et al. Regulation of gammadelta versus alphabeta T lymphocyte differentiation by the transcription factor SOX13. *Science*. 2007;315(5809):230-233. doi:10.1126/science.1135344.

158. Silva-Santos B, Pennington DJ, Hayday AC. Lymphotoxin-mediated regulation of gammadelta cell differentiation by alphabeta T cell progenitors. *Science*. 2005;307(5711):925-928. doi:10.1126/science.1103978.

159. Pennington DJ, Silva-Santos B, Shires J, et al. The inter-relatedness and interdependence of mouse T cell receptor gammadelta+ and alphabeta+ cells. *Nat Immunol*. 2003;4(10):991-998. doi:10.1038/ni979.

160. Powolny-Budnicka I, Riemann M, Tänzer S, Schmid RM, Hehlgans T, Weih F. RelA and RelB transcription factors in distinct thymocyte populations control lymphotoxin-dependent interleukin-17 production in γδ T cells. *Immunity*. 2011;34(3):364-374. doi:10.1016/j.immuni.2011.02.019.

161. Kang J, Volkmann A, Raulet DH. Evidence that gammadelta versus alphabeta T cell fate determination is initiated independently of T cell receptor signaling. *J Exp Med*. 2001;193(6):689-698.

162. Haks MC, Lefebvre JM, Lauritsen JPH, et al. Attenuation of gammadeltaTCR signaling efficiently diverts thymocytes to the alphabeta lineage. *Immunity*. 2005;22(5):595-606. doi:10.1016/j.immuni.2005.04.003.

163. Hayes SM, Li L, Love PE. TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate. *Immunity*. 2005;22(5):583-593. doi:10.1016/j.immuni.2005.03.014.

164. Kreslavsky T, Garbe AI, Krueger A, Boehmer von H. T cell receptor-instructed alphabeta versus gammadelta lineage commitment revealed by single-cell analysis. *Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(5):1173-1186. doi:10.1084/jem.20072425.

165. Boyden LM, Lewis JM, Barbee SD, et al. Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal gammadelta T cells. *Nat Genet*. 2008;40(5):656-662. doi:10.1038/ng.108.

166. Turchinovich G, Hayday AC. Skint-1 identifies a common molecular mechanism for the development of interferon-γ-secreting versus interleukin-17-secreting γδ T cells. *Immunity*. 2011;35(1):59-68. doi:10.1016/j.immuni.2011.04.018.

167. Barbee SD, Woodward MJ, Turchinovich G, et al. Skint-1 is a highly specific, unique selecting component for epidermal T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(8):3330-3335. doi:10.1073/pnas.1010890108.

168. Chien Y-H, Meyer C, Bonneville M. γδ T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol*. 2014;32(1):121-155. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120216.

169. Rock EP, Sibbald PR, Davis MM, Chien YH. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J Exp Med*. 1994;179(1):323-328.

170. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988;334(6181):395-402. doi:10.1038/334395a0.

171. Porcelli S, Brenner MB, Greenstein JL, Balk SP, Terhorst C, Bleicher PA. Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4-CD8-cytolytic T lymphocytes. *Nature*. 1989;341(6241):447-450. doi:10.1038/341447a0.

172. Mangan BA, Dunne MR, O'Reilly VP, et al. Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human Vδ3 T cells. *The Journal of Immunology*. 2013;191(1):30-34. doi:10.4049/jimmunol.1300121.

173. Russano AM, Agea E, Corazzi L, et al. Recognition of pollen-derived phosphatidyl-ethanolamine by human CD1d-restricted gamma delta T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(5):1178-1184. doi:10.1016/j.jaci.2006.01.001.

174. Bai L, Picard D, Anderson B, et al. The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant Vδ1 TCR. *Eur J Immunol*. 2012;42(9):2505-2510. doi:10.1002/eji.201242531.

175. Luoma AM, Castro CD, Mayassi T, et al. Crystal structure of Vδ1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human γδ T cells. *Immunity*. 2013;39(6):1032-1042. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.001.

176. Uldrich AP, Le Nours J, Pellicci DG, et al. CD1d-lipid antigen recognition by the γδ TCR. *Nat Immunol*. 2013;14(11):1137-1145. doi:10.1038/ni.2713.

177. Pellicci DG, Uldrich AP, Le Nours J, et al. The molecular bases of δ/αβ T cell-mediated antigen recognition. *Journal of Experimental Medicine*. 2014;211(13):2599-2615. doi:10.1084/jem.20141764.

178. Agea E, Russano A, Bistoni O, et al. Human CD1-restricted T cell recognition of lipids from pollens. *J Exp Med*. 2005;202(2):295-308. doi:10.1084/jem.20050773.

179. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, et al. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science*. 1994;264(5156):267-270.

180. Hintz M, Reichenberg A, Altincicek B, et al. Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in Escherichia coli. *FEBS Lett*. 2001;509(2):317-322.

181. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human γδ T-cell subset. *Blood*. 2012;120(11):2269-2279. doi:10.1182/blood-2012-05-430470.

182. Vavassori S, Kumar A, Wan GS, et al. Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human γδ T cells. *Nat Immunol*. 2013;14(9):908-916. doi:10.1038/ni.2665.

183. Sandstrom A, Peigné C-M, Léger A, et al. The intracellular B30.2 domain of

butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human Vγ9Vδ2 T cells. *Immunity*. 2014;40(4):490-500. doi:10.1016/j.immuni.2014.03.003.

184. Marlin R, Pappalardo A, Kaminski H, et al. Sensing of cell stress by human γδ TCR-dependent recognition of annexin A2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(12):3163-3168. doi:10.1073/pnas.1621052114.

185. Brandes M, Willimann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science*. 2005;309(5732):264-268. doi:10.1126/science.1110267.

186. Havran WL, Chien YH, Allison JP. Recognition of self antigens by skin-derived T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Science*. 1991;252(5011):1430-1432.

187. Jameson JM, Cauvi G, Witherden DA, Havran WL. A keratinocyte-responsive gamma delta TCR is necessary for dendritic epidermal T cell activation by damaged keratinocytes and maintenance in the epidermis. *J Immunol*. 2004;172(6):3573-3579.

188. Komori HK, Witherden DA, Kelly R, et al. Cutting edge: dendritic epidermal γδ T cell ligands are rapidly and locally expressed by keratinocytes following cutaneous wounding. *The Journal of Immunology*. 2012;188(7):2972-2976. doi:10.4049/jimmunol.1100887.

189. Witherden DA, Watanabe M, Garijo O, et al. The CD100 receptor interacts with its plexin B2 ligand to regulate epidermal γδ T cell function. *Immunity*. 2012;37(2):314-325. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.026.

190. Witherden DA, Verdino P, Rieder SE, et al. The junctional adhesion molecule JAML is a costimulatory receptor for epithelial gammadelta T cell activation. *Science*. 2010;329(5996):1205-1210. doi:10.1126/science.1192698.

191. Jameson J, Ugarte K, Chen N, et al. A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science*. 2002;296(5568):747-749. doi:10.1126/science.1069639.

192. Jameson JM, Cauvi G, Sharp LL, Witherden DA, Havran WL. Gammadelta T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J Exp Med*. 2005;201(8):1269-1279. doi:10.1084/jem.20042057.

193. Edelblum KL, Shen L, Weber CR, et al. Dynamic migration of γδ intraepithelial lymphocytes requires occludin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(18):7097-7102. doi:10.1073/pnas.1112519109.

194. Yang H, Antony PA, Wildhaber BE, Teitelbaum DH. Intestinal intraepithelial lymphocyte gamma delta-T cell-derived keratinocyte growth factor modulates epithelial growth in the mouse. *J Immunol*. 2004;172(7):4151-4158.

195. Kober OI, Ahl D, Pin C, Holm L, Carding SR, Juge N. γδ T-cell-deficient mice show alterations in mucin expression, glycosylation, and goblet cells but maintain an intact mucus layer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;306(7):G582-G593. doi:10.1152/ajpgi.00218.2013.

196. Misiak A, Wilk MM, Raverdeau M, Mills KHG. IL-17-Producing Innate and Pathogen-Specific Tissue Resident Memory γδ T Cells Expand in the Lungs of Bordetella pertussis-Infected Mice. *The Journal of Immunology*. 2017;198(1):363-374. doi:10.4049/jimmunol.1601024.

197. Dodd J, Riffault S, Kodituwakku JS, Hayday AC, Openshaw PJM. Pulmonary V gamma 4+ gamma delta T cells have proinflammatory and antiviral effects in viral lung disease. *The Journal of Immunology*. 2009;182(2):1174-1181.

198. Born WK, Lahn M, Takeda K, Kanehiro A, O'Brien RL, Gelfand EW. Role of gammadelta T cells in protecting normal airway function. *Respir Res*. 2000;1(3):151-158. doi:10.1186/rr26.

199. Rani M, Zhang Q, Oppeltz RF, Schwacha MG. Gamma delta T cells regulate inflammatory cell infiltration of the lung after trauma-hemorrhage. *Shock*. 2015;43(6):589-597. doi:10.1097/SHK.0000000000000358.

200. Patil RS, Bhat SA, Dar AA, Chiplunkar SV. The Jekyll and Hyde story of IL17-Producing γδT Cells. *Front Immunol*. 2015;6:37. doi:10.3389/fimmu.2015.00037.

201. Cheng M, Qian L, Shen G, et al. Microbiota modulate tumoral immune surveillance in lung through a γδT17 immune cell-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2014;74(15):4030-4041. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2462.

202. Duan J, Chung H, Troy E, Kasper DL. Microbial colonization drives expansion of IL-1 receptor 1-expressing and IL-17-producing gamma/delta T cells. *Cell Host Microbe*. 2010;7(2):140-150. doi:10.1016/j.chom.2010.01.005.

203. Itohara S, Farr AG, Lafaille JJ, et al. Homing of a gamma delta thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature*. 1990;343(6260):754-757. doi:10.1038/343754a0.

204. Alcaide ML, Strbo N, Romero L, et al. Bacterial Vaginosis Is Associated with Loss of Gamma Delta T Cells in the Female Reproductive Tract in Women in the Miami Women Interagency HIV Study (WIHS): A Cross Sectional Study. Fredricks DN, ed. *PLoS ONE*. 2016;11(4):e0153045. doi:10.1371/journal.pone.0153045.

205. Bertotto A, Spinozzi F, Gerli R, et al. Gamma delta T-cell subset distribution in human semen from fertile donors. *Am J Reprod Immunol*. 1995;34(3):176-178.

206. Spada FM, Grant EP, Peters PJ, et al. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med*. 2000;191(6):937-948.

207. Wrobel P, Shojaei H, Schittek B, et al. Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scand J Immunol*. 2007;66(2-3):320-328. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01963.x.

208. Todaro M, D'Asaro M, Caccamo N, et al. Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 2009;182(11):7287-7296. doi:10.4049/jimmunol.0804288.

209. Costa G, Loizon S, Guenot M, et al. Control of Plasmodium falciparum erythrocytic cycle: γδ T cells target the red blood cell-invasive merozoites. *Blood*. 2011;118(26):6952-6962. doi:10.1182/blood-2011-08-376111.

210. Dokouhaki P, Schuh NW, Joe B, et al. NKG2D regulates production of soluble TRAIL by ex vivo expanded human γδ T cells. *Eur J Immunol*. 2013;43(12):3175-3182. doi:10.1002/eji.201243150.

211. Couzi L, Pitard V, Sicard X, et al. Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human γδ T cells expressing CD16 (FcγRIIIa). *Blood*. 2012;119(6):1418-1427. doi:10.1182/blood-2011-06-363655.

212. Chen ZW, Letvin NL. Vgamma2Vdelta2+ T cells and anti-microbial immune responses. *Microbes Infect*. 2003;5(6):491-498.

213. Wang L, Kamath A, Das H, Li L, Bukowski JF. Antibacterial effect of human V gamma 2V delta 2 T cells in vivo. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(9):1349-1357. doi:10.1172/JCI13584.

214. Belmant C, Espinosa E, Poupot R, et al. 3-Formyl-1-butyl pyrophosphate A novel mycobacterial metabolite-activating human gammadelta T cells. *J Biol Chem*. 1999;274(45):32079-32084.

215. Spencer CT, Abate G, Sakala IG, et al. Granzyme A produced by γ(9)δ(2) T cells induces human macrophages to inhibit growth of an intracellular pathogen. *PLoS Pathog*. 2013;9(1):e1003119. doi:10.1371/journal.ppat.1003119.

216. Kabelitz D, Bender A, Schondelmaier S, Schoel B, Kaufmann SH. A large fraction of human peripheral blood gamma/delta + T cells is activated by Mycobacterium tuberculosis but not by its 65-kD heat shock protein. *J Exp Med*. 1990;171(3):667-679.

217. Déchanet J, Merville P, Lim A, et al. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;103(10):1437-1449. doi:10.1172/JCI5409.

218. Ehl S, Schwarz K, Enders A, et al. A variant of SCID with specific immune responses and predominance of gamma delta T cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(11):3140-3148. doi:10.1172/JCI25221.

219. Knight A, Madrigal AJ, Grace S, et al. The role of Vδ2-negative γδ T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2010;116(12):2164-2172. doi:10.1182/blood-2010-01-255166.

220. Willcox CR, Pitard V, Netzer S, et al. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human γδ T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol*. 2012;13(9):872-879. doi:10.1038/ni.2394.

221. Agrati C, D'Offizi G, Narciso P, et al. Vdelta1 T lymphocytes expressing a Th1 phenotype are the major gammadelta T cell subset infiltrating the liver of HCV-infected persons. *Mol Med*. 2001;7(1):11-19.

222. De Paoli P, Gennari D, Martelli P, et al. A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol*. 1991;83(2):187-191.

223. Poccia F, Battistini L, Cipriani B, et al. Phosphoantigen-reactive Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes suppress in vitro human immunodeficiency virus type 1 replication by cell-released antiviral factors including CC chemokines. *J Infect Dis*. 1999;180(3):858-861. doi:10.1086/314925.

224. Hudspeth K, Fogli M, Correia DV, et al. Engagement of NKp30 on Vδ1 T cells induces the production of CCL3, CCL4, and CCL5 and suppresses HIV-1 replication. *Blood*. 2012;119(17):4013-4016. doi:10.1182/blood-2011-11-390153.

225. Tilloy F, Treiner E, Park SH, et al. An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J Exp Med*. 1999;189(12):1907-1921.

226. Treiner E, Duban L, Bahram S, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature*. 2003;422(6928):164-169. doi:10.1038/nature01433.

227. Huang S, Gilfillan S, Cella M, et al. Evidence for MR1 antigen presentation to mucosal-associated invariant T cells. *J Biol Chem*. 2005;280(22):21183-21193. doi:10.1074/jbc.M501087200.

228. Hashimoto K, Hirai M, Kurosawa Y. A gene outside the human MHC related to classical HLA class I genes. *Science*. 1995;269(5224):693-695.

229. Riegert P, Wanner V, Bahram S. Genomics, isoforms, expression, and phylogeny of the MHC class I-related MR1 gene. *J Immunol*. 1998;161(8):4066-4077.

230. Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature*. 2012;491(7426):717-723. doi:10.1038/nature11605.

231. Patel O, Kjer-Nielsen L, Le Nours J, et al. Recognition of vitamin B metabolites by mucosal-associated invariant T cells. *Nat Commun*. 2013;4:2142. doi:10.1038/ncomms3142.

232. Reantragoon R, Corbett AJ, Sakala IG, et al. Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(11):2305-2320. doi:10.1084/jem.20130958.

233. Dusseaux M, Martin E, Serriari N, et al. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood*. 2011;117(4):1250-1259. doi:10.1182/blood-2010-08-303339.

234. Leeansyah E, Loh L, Nixon DF, Sandberg JK. Acquisition of innate-like microbial reactivity in mucosal tissues during human fetal MAIT-cell development. *Nat Commun*. 2014;5:3143. doi:10.1038/ncomms4143.

235. Leeansyah E, Ganesh A, Quigley MF, et al. Activation, exhaustion, and persistent decline of the antimicrobial MR1-restricted MAIT-cell population in chronic HIV-1

infection. *Blood*. 2013;121(7):1124-1135. doi:10.1182/blood-2012-07-445429.

236. Ussher JE, Bilton M, Attwod E, et al. CD161++ CD8+ T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *Eur J Immunol*. 2014;44(1):195-203. doi:10.1002/eji.201343509.

237. Dias J, Leeansyah E, Sandberg JK. Multiple layers of heterogeneity and subset diversity in human MAIT cell responses to distinct microorganisms and to innate cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(27):E5434-E5443. doi:10.1073/pnas.1705759114.

238. Seach N, Guerri L, Le Bourhis L, et al. Double-positive thymocytes select mucosal-associated invariant T cells. *The Journal of Immunology*. 2013;191(12):6002-6009. doi:10.4049/jimmunol.1301212.

239. Martin E, Treiner E, Duban L, et al. Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. *PLoS Biol*. 2009;7(3):e54. doi:10.1371/journal.pbio.1000054.

240. Koay H-F, Gherardin NA, Enders A, et al. A three-stage intrathymic development pathway for the mucosal-associated invariant T cell lineage. *Nat Immunol*. 2016;17(11):1300-1311. doi:10.1038/ni.3565.

241. Salerno-Goncalves R, Rezwan T, Sztein MB. B cells modulate mucosal associated invariant T cell immune responses. *Front Immunol*. 2014;4:511. doi:10.3389/fimmu.2013.00511.

242. Young MH, U'Ren L, Huang S, et al. MAIT cell recognition of MR1 on bacterially infected and uninfected cells. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e53789. doi:10.1371/journal.pone.0053789.

243. Keller AN, Eckle SBG, Xu W, et al. Drugs and drug-like molecules can modulate the function of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol*. 2017;18(4):402-411. doi:10.1038/ni.3679.

244. Garcia KC, Degano M, Pease LR, et al. Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science*. 1998;279(5354):1166-1172.

245. Reantragoon R, Kjer-Nielsen L, Patel O, et al. Structural insight into MR1-mediated recognition of the mucosal associated invariant T cell receptor. *Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(4):761-774. doi:10.1084/jem.20112095.

246. Gherardin NA, Keller AN, Woolley RE, et al. Diversity of T Cells Restricted by the MHC Class I-Related Molecule MR1 Facilitates Differential Antigen Recognition. *Immunity*. 2016;44(1):32-45. doi:10.1016/j.immuni.2015.12.005.

247. Eckle SBG, Birkinshaw RW, Kostenko L, et al. A molecular basis underpinning the T cell receptor heterogeneity of mucosal-associated invariant T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2014;211(8):1585-1600. doi:10.1084/jem.20140484.

248. McWilliam HEG, Eckle SBG, Theodossis A, et al. The intracellular pathway for the presentation of vitamin B-related antigens by the antigen-presenting molecule MR1. *Nat Immunol*. 2016;17(5):531-537. doi:10.1038/ni.3416.

249. Huang S, Gilfillan S, Kim S, et al. MR1 uses an endocytic pathway to activate mucosal-associated invariant T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(5):1201-1211. doi:10.1084/jem.20072579.

250. Grimaldi D, Le Bourhis L, Sauneuf B, et al. Specific MAIT cell behaviour among innate-like T lymphocytes in critically ill patients with severe infections. *Intensive Care Med*. 2014;40(2):192-201. doi:10.1007/s00134-013-3163-x.

251. Booth JS, Salerno-Goncalves R, Blanchard TG, et al. Mucosal-Associated Invariant T Cells in the Human Gastric Mucosa and Blood: Role in Helicobacter pylori Infection. *Front Immunol*. 2015;6:466. doi:10.3389/fimmu.2015.00466.

252. Le Bourhis L, Martin E, Péguillet I, et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol*. 2010;11(8):701-708. doi:10.1038/ni.1890.

253. Gold MC, Cerri S, Smyk-Pearson S, et al. Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol*. 2010;8(6):e1000407. doi:10.1371/journal.pbio.1000407.

254. Chua W-J, Truscott SM, Eickhoff CS, Blazevic A, Hoft DF, Hansen TH. Polyclonal mucosa-associated invariant T cells have unique innate functions in bacterial infection. *Infection and Immunity*. 2012;80(9):3256-3267. doi:10.1128/IAI.00279-12.

255. Meierovics A, Yankelevich W-JC, Cowley SC. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(33):E3119-E3128. doi:10.1073/pnas.1302799110.

256. Georgel P, Radosavljevic M, Macquin C, Bahram S. The non-conventional MHC class I MR1 molecule controls infection by Klebsiella pneumoniae in mice. *Mol Immunol*. 2011;48(5):769-775. doi:10.1016/j.molimm.2010.12.002.

257. Kwon Y-S, Cho Y-N, Kim M-J, et al. Mucosal-associated invariant T cells are numerically and functionally deficient in patients with mycobacterial infection and reflect disease activity. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015;95(3):267-274. doi:10.1016/j.tube.2015.03.004.

258. Gold MC, Napier RJ, Lewinsohn DM. MR1-restricted mucosal associated invariant T (MAIT) cells in the immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Immunol Rev*. 2015;264(1):154-166. doi:10.1111/imr.12271.

259. Le Bourhis L, Dusseaux M, Bohineust A, et al. MAIT cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003681. doi:10.1371/journal.ppat.1003681.

260. van Wilgenburg B, Scherwitzl I, Hutchinson EC, et al. MAIT cells are activated during human viral infections. *Nat Commun*. 2016;7:11653. doi:10.1038/ncomms11653.

261. Billerbeck E, Kang Y-H, Walker L, et al. Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(7):3006-3011. doi:10.1073/pnas.0914839107.

262. Ashare A, Stanford C, Hancock P, et al. Chronic liver disease impairs bacterial clearance in a human model of induced bacteremia. *Clin Transl Sci*. 2009;2(3):199-205. doi:10.1111/j.1752-8062.2009.00122.x.

263. Cosgrove C, Ussher JE, Rauch A, et al. Early and nonreversible decrease of CD161++ /MAIT cells in HIV infection. *Blood*. 2013;121(6):951-961. doi:10.1182/blood-2012-06-436436.

264. Eberhard JM, Hartjen P, Kummer S, et al. CD161+ MAIT cells are severely reduced in peripheral blood and lymph nodes of HIV-infected individuals independently of disease progression. *PLoS ONE*. 2014;9(11):e111323. doi:10.1371/journal.pone.0111323.

265. Serriari N-E, Eoche M, Lamotte L, et al. Innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are activated in inflammatory bowel diseases. *Clin Exp Immunol*. 2014;176(2):266-274. doi:10.1111/cei.12277.

266. Teunissen MBM, Yeremenko NG, Baeten DLP, et al. The IL-17A-producing CD8+ T-cell population in psoriatic lesional skin comprises mucosa-associated invariant T cells and conventional T cells. *J Invest Dermatol*. 2014;134(12):2898-2907. doi:10.1038/jid.2014.261.

267. Chiba A, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, Yamamura T, Miyake S. Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(1):153-161. doi:10.1002/art.33314.

268. Miyazaki Y, Miyake S, Chiba A, Lantz O, Yamamura T. Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol*. 2011;23(9):529-535. doi:10.1093/intimm/dxr047.

269. Croxford JL, Miyake S, Huang Y-Y, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V(alpha)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol*. 2006;7(9):987-994. doi:10.1038/ni1370.

270. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390. doi:10.1182/blood-2016-01-643569.

271. Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans*. 1832;17:68-114.

272. Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*. 1996;184(4):1495-1505.

273. de Leval L, Gaulard P. Pathology and biology of peripheral T-cell lymphomas. *Histopathology*. 2011;58(1):49-68. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03704.x.

274. Vose J, Armitage J, Weisenburger D, International T-Cell Lymphoma Project. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol*. 2008;26(25):4124-4130. doi:10.1200/JCO.2008.16.4558.

275. de Leval L, Parrens M, Le Bras F, et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma is the most common T-cell lymphoma in two distinct French information data sets. *Haematologica*. 2015;100(9):e361-e364. doi:10.3324/haematol.2015.126300.

276. de Leval L, Rickman DS, Thielen C, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood*. 2007;109(11):4952-4963. doi:10.1182/blood-2006-10-055145.

277. Coiffier B, Lepage E, Brière J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(4):235-242. doi:10.1056/NEJMoa011795.

278. Broussais-Guillaumot F, Coso D, Belmecheri N, et al. Peripheral T-cell lymphomas: analysis of histology, staging and response to treatment of 208 cases at a single institution. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(11):2392-2398. doi:10.3109/10428194.2013.776680.

279. Schmitz N, Trümper L, Ziepert M, et al. Treatment and prognosis of mature T-cell and NK-cell lymphoma: an analysis of patients with T-cell lymphoma treated in studies of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood*. 2010;116(18):3418-3425. doi:10.1182/blood-2010-02-270785.

280. Skarbnik AP, Burki M, Pro B. Peripheral T-cell lymphomas: a review of current approaches and hopes for the future. *Front Oncol*. 2013;3:138. doi:10.3389/fonc.2013.00138.

281. Marron TU, Kalac M, Brody J. An Update on the Use of Immunotherapy in the Treatment of Lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep*. July 2017:1-8. doi:10.1007/s11899-017-0396-8.

282. Adamson P, Bray F, Costantini AS, Tao M-H, Weiderpass E, Roman E. Time trends in the registration of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas in Europe. *Eur J Cancer*. 2007;43(2):391-401. doi:10.1016/j.ejca.2006.10.008.

283. Abouyabis AN, Shenoy PJ, Lechowicz MJ, Flowers CR. Incidence and outcomes of the peripheral T-cell lymphoma subtypes in the United States. *Leuk Lymphoma*. 2008;49(11):2099-2107. doi:10.1080/10428190802455867.

284. Perry AM, Diebold J, Nathwani BN, et al. Non-Hodgkin lymphoma in the developing world: review of 4539 cases from the International Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project. *Haematologica*. 2016;101(10):1244-1250. doi:10.3324/haematol.2016.148809.

285. Adams SV, Newcomb PA, Shustov AR. Racial Patterns of Peripheral T-Cell Lymphoma Incidence and Survival in the United States. *J Clin Oncol*. 2016;34(9):963-971. doi:10.1200/JCO.2015.63.5540.

286. Wang SS, Flowers CR, Kadin ME, et al. Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for peripheral T-cell lymphomas: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monographs*. 2014;2014(48):66-75. doi:10.1093/jncimonographs/lgu012.

287. Phan A, Veldman R, Lechowicz MJ. T-cell Lymphoma Epidemiology: the Known and Unknown. *Curr Hematol Malig Rep*. 2016;11(6):492-503. doi:10.1007/s11899-016-0353-y.

288. Kundu JK, Surh Y-J. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res*. 2008;659(1-2):15-30. doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.002.

289. Masopust D, Schenkel JM. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(5):309-320. doi:10.1038/nri3442.

290. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(11):749-761. doi:10.1038/nri3307.

291. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011;131(6):492-499. doi:10.1038/ni.2035.

292. Doering TA, Crawford A, Angelosanto JM, Paley MA, Ziegler CG, Wherry EJ. Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory. *Immunity*. 2012;37(6):1130-1144. doi:10.1016/j.immuni.2012.08.021.

293. Wherry EJ, Barber DL, Kaech SM, Blattman JN, Ahmed R. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(45):16004-16009. doi:10.1073/pnas.0407192101.

294. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(8):486-499. doi:10.1038/nri3862.

295. Shin H, Blackburn SD, Blattman JN, Wherry EJ. Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J Exp Med*. 2007;204(4):941-949. doi:10.1084/jem.20061937.

296. Jamieson BD, Yang OO, Hultin L, et al. Epitope escape mutation and decay of human immunodeficiency virus type 1-specific CTL responses. *J Immunol*. 2003;171(10):5372-5379.

297. Wieland D, Kemming J, Schuch A, et al. TCF1(+) hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells are maintained after cessation of chronic antigen stimulation. *Nat Commun*. 2017;8:15050. doi:10.1038/ncomms15050.

298. Delabie J, Holte H, Vose JM, et al. Enteropathy-associated T-cell lymphoma: clinical and histological findings from the international peripheral T-cell lymphoma project. *Blood*. 2011;118(1):148-155. doi:10.1182/blood-2011-02-335216.

299. Gale J, Simmonds PD, Mead GM, Sweetenham JW, Wright DH. Enteropathy-type intestinal T-cell lymphoma: clinical features and treatment of 31 patients in a single center. *J Clin Oncol*. 2000;18(4):795-803. doi:10.1200/JCO.2000.18.4.795.

300. Karanam PK, Al-Hamadani M, Go RS. Enteropathy-associated T-cell lymphoma in the US: higher incidence and poorer survival among Asians. *Br J Haematol*. 2016;172(6):990-992. doi:10.1111/bjh.13555.

301. Tse E, Gill H, Loong F, et al. Type II enteropathy-associated T-cell lymphoma: a multicenter analysis from the Asia Lymphoma Study Group. *Am J Hematol*. 2012;87(7):663-668. doi:10.1002/ajh.23213.

302. Chan JKC, Chan ACL, Cheuk W, et al. Type II enteropathy-associated T-cell lymphoma: a distinct aggressive lymphoma with frequent γδ T-cell receptor expression. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(10):1557-1569. doi:10.1097/PAS.0b013e318222dfcd.

303. Sun J, Lu Z, Yang D, Chen J. Primary intestinal T-cell and NK-cell lymphomas: a clinicopathological and molecular study from China focused on type II enteropathy-associated T-cell lymphoma and primary intestinal NK-cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2011;24(7):983-992. doi:10.1038/modpathol.2011.45.

304. Fairley NH, Mackie FP. Clinical and Biochemical Syndrome in Lymphadenoma. *Br Med J*. 1937;1(3972):375–404.4.

305. Isaacson P, Wright DH. Intestinal lymphoma associated with malabsorption. *Lancet*. 1978;1(8055):67-70.

306. Isaacson PG, O'Connor NT, Spencer J, et al. Malignant histiocytosis of the intestine: a T-cell lymphoma. *Lancet*. 1985;2(8457):688-691.

307. Escudero-Hernández C, Plaza-Izurieta L, Garrote JA, Bilbao JR, CEGEC, Arranz E. Association of the IL-15 and IL-15Rα genes with celiac disease. *Cytokine*. 2017;99:73-79. doi:10.1016/j.cyto.2017.07.009.

308. Silano M, Volta U, Vincenzi AD, Dessì M, Vincenzi MD, Collaborating Centers of the Italian Registry of the Complications of Coeliac Disease. Effect of a gluten-free diet on the risk of enteropathy-associated T-cell lymphoma in celiac disease. *Dig Dis Sci*. 2008;53(4):972-976. doi:10.1007/s10620-007-9952-8.

309. Olén O, Askling J, Ludvigsson JF, Hildebrand H, Ekbom A, Smedby KE. Coeliac disease characteristics, compliance to a gluten free diet and risk of lymphoma by subtype. *Dig Liver Dis*. 2011;43(11):862-868. doi:10.1016/j.dld.2011.07.012.

310. Lebwohl B, Granath F, Ekbom A, et al. Mucosal healing and risk for lymphoproliferative malignancy in celiac disease: a population-based cohort study. *Ann Intern Med*. 2013;159(3):169-175. doi:10.7326/0003-4819-159-3-201308060-00006.

311. Silano M, Volta U, Mecchia AM, et al. Delayed diagnosis of coeliac disease increases cancer risk. *BMC Gastroenterol*. 2007;7(1):8. doi:10.1186/1471-230X-7-8.

312. Malamut G, Afchain P, Verkarre V, et al. Presentation and long-term follow-up of refractory celiac disease: comparison of type I with type II. *Gastroenterology*. 2009;136(1):81-90. doi:10.1053/j.gastro.2008.09.069.

313. de Mascarel A, Belleannée G, Stanislas S, et al. Mucosal intraepithelial T-lymphocytes in refractory celiac disease: a neoplastic population with a variable CD8 phenotype. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(5):744-751. doi:10.1097/PAS.0b013e318159b478.

314. Cellier C, Delabesse E, Helmer C, et al. Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. French Coeliac Disease Study Group. *Lancet*. 2000;356(9225):203-208.

315. Malamut G, Machhour El R, Montcuquet N, et al. IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J Clin Invest*. 2010;120(6):2131-2143. doi:10.1172/JCI41344.

316. Ye W, Young JD, Liu CC. Interleukin-15 induces the expression of mRNAs of cytolytic mediators and augments cytotoxic activities in primary murine lymphocytes. *Cell Immunol*. 1996;174(1):54-62. doi:10.1006/cimm.1996.0293.

317. Hüe S, Mention J-J, Monteiro RC, et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*. 2004;21(3):367-377. doi:10.1016/j.immuni.2004.06.018.

318. Benahmed M, Meresse B, Arnulf B, et al. Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology*. 2007;132(3):994-1008. doi:10.1053/j.gastro.2006.12.025.

319. Ben Ahmed M, Belhadj Hmida N, Moes N, et al. IL-15 renders conventional lymphocytes resistant to suppressive functions of regulatory T cells through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *The Journal of Immunology*. 2009;182(11):6763-6770. doi:10.4049/jimmunol.0801792.

320. Zanzi D, Stefanile R, Santagata S, et al. IL-15 interferes with suppressive activity of intestinal regulatory T cells expanded in Celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(7):1308-1317. doi:10.1038/ajg.2011.80.

321. Ritter J, Zimmermann K, Jöhrens K, et al. T-cell repertoires in refractory coeliac disease. *Gut*. February 2017:gutjnl–2016–311816. doi:10.1136/gutjnl-2016-311816.

322. Kooy-Winkelaar YMC, Bouwer D, Janssen GMC, et al. CD4 T-cell cytokines synergize to induce proliferation of malignant and nonmalignant innate intraepithelial lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(6):E980-E989. doi:10.1073/pnas.1620036114.

323. Wilkinson PC, Liew FY. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *J Exp Med*. 1995;181(3):1255-1259.

324. Aderhold K, Carpenter L, Brown K, Donato A. Primary Cutaneous Peripheral T-Cell Lymphoma Not Otherwise Specified: A Rapidly Progressive Variant of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Case Rep Oncol Med*. 2015;2015(11):429068–3. doi:10.1155/2015/429068.

325. Bagherani N, Smoller BR. An overview of cutaneous T cell lymphomas. *F1000Res*. 2016;5:1882. doi:10.12688/f1000research.8829.1.

326. Guenova E, Watanabe R, Teague JE, et al. TH2 cytokines from malignant cells suppress TH1 responses and enforce a global TH2 bias in leukemic cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(14):3755-3763. doi:10.1158/1078-0432.CCR-

12-3488.

327. Yamanaka K-I, Clark R, Rich B, et al. Skin-derived interleukin-7 contributes to the proliferation of lymphocytes in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2006;107(6):2440-2445. doi:10.1182/blood-2005-03-1139.

328. Geskin LJ, Viragova S, Stolz DB, Fuschiotti P. Interleukin-13 is overexpressed in cutaneous T-cell lymphoma cells and regulates their proliferation. *Blood*. 2015;125(18):2798-2805. doi:10.1182/blood-2014-07-590398.

329. Asadullah K, Haeussler-Quade A, Gellrich S, et al. IL-15 and IL-16 overexpression in cutaneous T-cell lymphomas: stage-dependent increase in mycosis fungoides progression. *Exp Dermatol*. 2000;9(4):248-251.

330. Krejsgaard T, Litvinov IV, Wang Y, et al. Elucidating the role of interleukin-17F in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2013;122(6):943-950. doi:10.1182/blood-2013-01-480889.

331. Singer EM, Shin DB, Nattkemper LA, et al. IL-31 is produced by the malignant T-cell population in cutaneous T-Cell lymphoma and correlates with CTCL pruritus. *J Invest Dermatol*. 2013;133(12):2783-2785. doi:10.1038/jid.2013.227.

332. Mishra A, La Perle K, Kwiatkowski S, et al. Mechanism, Consequences, and Therapeutic Targeting of Abnormal IL15 Signaling in Cutaneous T-cell Lymphoma. *Cancer Discov*. 2016;6(9):986-1005. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1297.

333. Kiel MJ, Sahasrabuddhe AA, Rolland DCM, et al. Genomic analyses reveal recurrent mutations in epigenetic modifiers and the JAK-STAT pathway in Sézary syndrome. *Nat Commun*. 2015;6:8470. doi:10.1038/ncomms9470.

334. Choi J, Goh G, Walradt T, et al. Genomic landscape of cutaneous T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2015;47(9):1011-1019. doi:10.1038/ng.3356.

335. Wang L, Ni X, Covington KR, et al. Genomic profiling of Sézary syndrome identifies alterations of key T cell signaling and differentiation genes. *Nat Genet*. 2015;47(12):1426-1434. doi:10.1038/ng.3444.

336. Aly RM, Taalab MM, Ghazy HF. Influence of interleukin-15 polymorphism on the survival of adult patients with acute lymphoblastic leukemia in Egypt. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(1):151-156. doi:10.3109/10428194.2014.910659.

337. Lin D, Liu C, Xue M, et al. The role of interleukin-15 polymorphisms in adult acute lymphoblastic leukemia. *PLoS ONE*. 2010;5(10):e13626. doi:10.1371/journal.pone.0013626.

338. Nedoszytko B, Olszewska B, Roszkiewicz J, et al. The role of polymorphism of interleukin-2, -10, -13 and TNF-α genes in cutaneous T-cell lymphoma pathogenesis. *Postepy Dermatol Alergol*. 2016;33(6):429-434. doi:10.5114/ada.2016.63881.

339. Ralfkiaer U, Hagedorn PH, Bangsgaard N, et al. Diagnostic microRNA profiling in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood*. 2011;118(22):5891-5900. doi:10.1182/blood-2011-06-358382.

340. Moyal L, Barzilai A, Gorovitz B, et al. miR-155 is involved in tumor progression of mycosis fungoides. *Exp Dermatol*. 2013;22(6):431-433. doi:10.1111/exd.12161.

341. Lindahl LM, Fredholm S, Joseph C, et al. STAT5 induces miR-21 expression in cutaneous T cell lymphoma. *Oncotarget*. 2016;7(29):45730-45744. doi:10.18632/oncotarget.10160.

342. Tesio M, Trinquand A, Macintyre E, Asnafi V. Oncogenic PTEN functions and models in T-cell malignancies. *Oncogene*. 2016;35(30):3887-3896. doi:10.1038/onc.2015.462.

343. Sibbesen NA, Kopp KL, Litvinov IV, et al. Jak3, STAT3, and STAT5 inhibit expression of miR-22, a novel tumor suppressor microRNA, in cutaneous T-Cell lymphoma. *Oncotarget*. 2015;6(24):20555-20569. doi:10.18632/oncotarget.4111.

344. Poszepczynska-Guigné E, Schiavon V, D'Incan M, et al. CD158k/KIR3DL2 is a new phenotypic marker of Sezary cells: relevance for the diagnosis and follow-up of Sezary syndrome. *J Invest Dermatol*. 2004;122(3):820-823. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22326.x.

345. Marie-Cardine A, Viaud N, Thonnart N, et al. IPH4102, a humanized KIR3DL2 antibody with potent activity against cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res*. 2014;74(21):6060-6070. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1456.

346. Fischer L, Hummel M, Burmeister T, Schwartz S, Thiel E. Skewed expression of natural-killer (NK)-associated antigens on lymphoproliferations of large granular lymphocytes (LGL). *Hematol Oncol*. 2006;24(2):78-85. doi:10.1002/hon.777.

347. Burks EJ, Loughran TP. Pathogenesis of neutropenia in large granular lymphocyte leukemia and Felty syndrome. *Blood Rev*. 2006;20(5):245-266. doi:10.1016/j.blre.2006.01.003.

348. Langerak AW, van Den Beemd R, Wolvers-Tettero IL, et al. Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalphabeta T-cell proliferations. *Blood*. 2001;98(1):165-173.

349. Zambello R, Trentin L, Facco M, et al. Analysis of the T cell receptor in the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: superantigen activation of clonal CD3+ granular lymphocytes. *Cancer Res*. 1995;55(24):6140-6145.

350. Davey MP, Starkebaum G, Loughran TP. CD3+ leukemic large granular lymphocytes utilize diverse T-cell receptor V beta genes. *Blood*. 1995;85(1):146-150.

351. Lima M, Almeida J, Santos AH, et al. Immunophenotypic analysis of the TCR-Vbeta repertoire in 98 persistent expansions of CD3(+)/TCR-alphabeta(+) large granular lymphocytes: utility in assessing clonality and insights into the pathogenesis of the disease. *Am J Pathol*. 2001;159(5):1861-1868.

352. O'Keefe CL, Plasilova M, Wlodarski M, et al. Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J Immunol*. 2004;172(3):1960-1969.

353. Clemente MJ, Przychodzen B, Jerez A, et al. Deep sequencing of the T-cell receptor repertoire in CD8+ T-large granular lymphocyte leukemia identifies signature landscapes. *Blood*. 2013;122(25):4077-4085. doi:10.1182/blood-2013-05-506386.

354. Sandberg Y, Kallemeijn MJ, Dik WA, et al. Lack of common TCRA and TCRB clonotypes in CD8(+)/TCRαβ(+) T-cell large granular lymphocyte leukemia: a review on the role of antigenic selection in the immunopathogenesis of CD8(+) T-LGL. *Blood Cancer J*. 2014;4:e172. doi:10.1038/bcj.2013.70.

355. Fehniger TA, Suzuki K, Ponnappan A, et al. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med*. 2001;193(2):219-231.

356. Mishra A, Liu S, Sams GH, et al. Aberrant overexpression of IL-15 initiates large granular lymphocyte leukemia through chromosomal instability and DNA hypermethylation. *Cancer Cell*. 2012;22(5):645-655. doi:10.1016/j.ccr.2012.09.009.

357. Ozaki M, Kawabe Y, Nakamura H, et al. Elevated serum cytokine levels in a rheumatoid arthritis patient with large granular lymphocyte syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2001;40(5):592-593.

358. de Totero D, Reato G, Mauro F, et al. IL4 production and increased CD30 expression by a unique CD8+ T-cell subset in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999;104(3):589-599.

359. Liu JH, Wei S, Lamy T, et al. Blockade of Fas-dependent apoptosis by soluble Fas in LGL leukemia. *Blood*. 2002;100(4):1449-1453.

360. Falini B, Bigerna B, Fizzotti M, et al. ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum. *Am J Pathol*. 1998;153(3):875-886. doi:10.1016/S0002-9440(10)65629-5.

361. Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, et al. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood*. 1998;91(6):2076-2084.

362. Kim B, Roth C, Chung KC, et al. Anaplastic large cell lymphoma and breast implants: a systematic review. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(6):2141-2150. doi:10.1097/PRS.0b013e3182172418.

363. Gidengil CA, Predmore Z, Mattke S, van Busum K, Kim B. Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma: a systematic review. *Plast Reconstr Surg*. 2015;135(3):713-720. doi:10.1097/PRS.0000000000001037.

364. de Jong D, Vasmel WLE, de Boer JP, et al. Anaplastic large-cell lymphoma in women with breast implants. *JAMA*. 2008;300(17):2030-2035. doi:10.1001/jama.2008.585.

365. Seyhan H, Kopp J, Beier JP, et al. Smooth and textured silicone surfaces of modified gel mammary prostheses cause a different impact on fibroproliferative properties of dermal fibroblasts. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2011;64(3):e60-e66. doi:10.1016/j.bjps.2010.08.016.

366. Miranda RN, Aladily TN, Prince HM, et al. Breast implant-associated anaplastic large-cell lymphoma: long-term follow-up of 60 patients. *J Clin Oncol*. 2014;32(2):114-120. doi:10.1200/JCO.2013.52.7911.

367. Laurent C, Delas A, Gaulard P, et al. Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma: two distinct clinicopathological variants with different outcomes. *Ann Oncol*. 2016;27(2):306-314. doi:10.1093/annonc/mdv575.

368. Yoshida SH, Swan S, Teuber SS, Gershwin ME. Silicone breast implants: immunotoxic and epidemiologic issues. *Life Sci*. 1995;56(16):1299-1310.

369. Swan SH, Teuber SS, Gershwin ME. Silicone implant controversy. *Lancet*. 1995;345(8945):319.

370. Busch H. Silicone toxicology. *Semin Arthritis Rheum*. 1994;24(1 Suppl 1):11-17.

371. Potter M, Morrison S, Miller F. Induction of plasmacytomas in genetically susceptible mice with silicone gels. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;194:83-91.

372. Katzin WE, Centeno JA, Feng L-J, Kiley M, Mullick FG. Pathology of lymph nodes from patients with breast implants: a histologic and spectroscopic evaluation. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(4):506-511.

373. Fleury E de FC, Rêgo MM, Ramalho LC, et al. Silicone-induced granuloma of breast implant capsule (SIGBIC): similarities and differences with anaplastic large cell lymphoma (ALCL) and their differential diagnosis. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2017;9:133-140. doi:10.2147/BCTT.S126003.

374. Naim JO, Ippolito KM, van Oss CJ. Adjuvancy effect of different types of silicone gel. *J Biomed Mater Res*. 1997;37(4):534-538.

375. Wolfram D, Rabensteiner E, Grundtman C, et al. T regulatory cells and TH17 cells in peri-silicone implant capsular fibrosis. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129(2):327e–337e. doi:10.1097/PRS.0b013e31823aeacf.

376. Orciani M, Sorgentoni G, Torresetti M, Di Primio R, Di Benedetto G. MSCs and inflammation: new insights into the potential association between ALCL and breast implants. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;156(1):65-72. doi:10.1007/s10549-016-3745-8.

377. Jacombs A, Tahir S, Hu H, et al. In vitro and in vivo investigation of the influence of implant surface on the formation of bacterial biofilm in mammary implants. *Plast Reconstr Surg*. 2014;133(4):471e–80e. doi:10.1097/PRS.0000000000000020.

378. Rieger UM, Mesina J, Kalbermatten DF, et al. Bacterial biofilms and capsular contracture in patients with breast implants. *Br J Surg*. 2013;100(6):768-774. doi:10.1002/bjs.9084.

379. Giordano S, Peltoniemi H, Lilius P, Salmi A. Povidone-iodine combined with antibiotic topical irrigation to reduce capsular contracture in cosmetic breast augmentation: a comparative study. *Aesthet Surg J*. 2013;33(5):675-680. doi:10.1177/1090820X13491490.

380. Hu H, Johani K, Almatroudi A, et al. Bacterial Biofilm Infection Detected in Breast Implant-Associated Anaplastic Large-Cell Lymphoma. *Plast Reconstr Surg*. 2016;137(6):1659-1669. doi:10.1097/PRS.0000000000002010.

381. Ryan MP, Adley CC. Ralstonia spp.: emerging global opportunistic pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(3):291-304. doi:10.1007/s10096-013-1975-9.

382. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori. *Lancet*. 1993;342(8871):575-577.

383. Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J. Helicobacter pylori-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *J Pathol*. 1996;178(2):122-127. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199602)178:2<122::AID-PATH486>3.0.CO;2-D.

384. Craig VJ, Arnold I, Gerke C, et al. Gastric MALT lymphoma B cells express polyreactive, somatically mutated immunoglobulins. *Blood*. 2010;115(3):581-591. doi:10.1182/blood-2009-06-228015.

385. Lee IO, Kim JH, Choi YJ, et al. Helicobacter pylori CagA phosphorylation status determines the gp130-activated SHP2/ERK and JAK/STAT signal transduction pathways in gastric epithelial cells. *J Biol Chem*. 2010;285(21):16042-16050. doi:10.1074/jbc.M110.111054.

386. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA. *Science*. 2003;300(5624):1430-1434. doi:10.1126/science.1081919.

387. Bariol C, Field A, Vickers CR, Ward R. Regression of gastric T cell lymphoma with eradication of Helicobacter pylori. *Gut*. 2001;48(2):269-271.

388. Kawamoto K, Nakamura S, Iwashita A, et al. Clinicopathological characteristics of primary gastric T-cell lymphoma. *Histopathology*. 2009;55(6):641-653. doi:10.1111/j.1365-2559.2009.03430.x.

389. Cerroni L, Zöchling N, Pütz B, Kerl H. Infection by Borrelia burgdorferi and cutaneous B-cell lymphoma. *J Cutan Pathol*. 1997;24(8):457-461.

390. Roggero E, Zucca E, Mainetti C, et al. Eradication of Borrelia burgdorferi infection in primary marginal zone B-cell lymphoma of the skin. *Hum Pathol*. 2000;31(2):263-268.

391. Tothova SM, Bonin S, Trevisan G, Stanta G. Mycosis fungoides: is it a Borrelia burgdorferi-associated disease? *Br J Cancer*. 2006;94(6):879-883. doi:10.1038/sj.bjc.6602997.

392. Bonin S, Tothova SM, Barbazza R, Brunetti D, Stanta G, Trevisan G. Evidence of multiple infectious agents in mycosis fungoides lesions. *Exp Mol Pathol*. 2010;89(1):46-50. doi:10.1016/j.yexmp.2010.05.001.

393. Ponzoni M, Ferreri AJM, Mappa S, et al. Prevalence of Borrelia burgdorferi infection in a series of 98 primary cutaneous lymphomas. *Oncologist*. 2011;16(11):1582-1588. doi:10.1634/theoncologist.2011-0108.

394. Kempf W, Kazakov DV, Hübscher E, et al. Cutaneous borreliosis associated with T cell-predominant infiltrates: a diagnostic challenge. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(4):683-689. doi:10.1016/j.jaad.2014.12.014.

395. Celebi Cherukuri N, Roth CG, Aggarwal N, Ho J, Gehris R, Akilov OE. Cutaneous Small/Medium CD4+ Pleomorphic T-Cell Lymphoma-Like Nodule in a Patient With Erythema Chronicum Migrans. *Am J Dermatopathol*. 2016;38(6):448-452. doi:10.1097/DAD.0000000000000596.

396. Rössler MJ, Rappl G, Muche M, et al. No evidence of skin infection with Chlamydia pneumoniae in patients with cutaneous T cell lymphoma. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(7):721-723.

397. Abrams JT, Vonderheid EC, Kolbe S, Appelt DM, Arking EJ, Balin BJ. Sézary T-cell activating factor is a Chlamydia pneumoniae-associated protein. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6(6):895-905.

398. Abrams JT, Balin BJ, Vonderheid EC. Association between Sézary T cell-activating factor, Chlamydia pneumoniae, and cutaneous T cell lymphoma. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;941:69-85.

399. Jackow CM, Cather JC, Hearne V, Asano AT, Musser JM, Duvic M. Association of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma, superantigen-positive Staphylococcus aureus, and oligoclonal T-cell receptor V beta gene expansion. *Blood*. 1997;89(1):32-40.

400. Linnemann T, Gellrich S, Lukowsky A, et al. Polyclonal expansion of T cells with the TCR V beta type of the tumour cell in lesions of cutaneous T-cell lymphoma: evidence for possible superantigen involvement. *Br J Dermatol*. 2004;150(5):1013-1017. doi:10.1111/j.1365-2133.2004.05970.x.

401. Woetmann A, Lovato P, Eriksen KW, et al. Nonmalignant T cells stimulate growth of T-cell lymphoma cells in the presence of bacterial toxins. *Blood*. 2007;109(8):3325-3332. doi:10.1182/blood-2006-04-017863.

402. Willerslev-Olsen A, Krejsgaard T, Lindahl LM, et al. Staphylococcal enterotoxin A (SEA) stimulates STAT3 activation and IL-17 expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2016;127(10):1287-1296. doi:10.1182/blood-2015-08-662353.

403. Talpur R, Bassett R, Duvic M. Prevalence and treatment of Staphylococcus aureus colonization in patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Br J Dermatol*. 2008;159(1):105-112. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08612.x.

404. van der Fits L, Sandberg Y, Darzentas N, et al. A restricted clonal T-cell receptor αβ repertoire in Sézary syndrome is indicative of superantigenic stimulation. *Br J Dermatol*. 2011;165(1):78-84. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10308.x.

405. Wu H, Wasik MA, Przybylski G, et al. Hepatosplenic gamma-delta T-cell lymphoma

as a late-onset posttransplant lymphoproliferative disorder in renal transplant recipients. *Am J Clin Pathol*. 2000;113(4):487-496. doi:10.1309/YTTC-F55W-K9CP-EPX5.

406. Khan WA, Yu L, Eisenbrey AB, et al. Hepatosplenic gamma/delta T-cell lymphoma in immunocompromised patients. Report of two cases and review of literature. *Am J Clin Pathol*. 2001;116(1):41-50. doi:10.1309/TC9U-FAV7-0QBW-6DFC.

407. Belhadj K, Reyes F, Farcet J-P, et al. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: report on a series of 21 patients. *Blood*. 2003;102(13):4261-4269. doi:10.1182/blood-2003-05-1675.

408. Hassan R, Franco SAL, Stefanoff CG, et al. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma following seven malaria infections. *Pathol Int*. 2006;56(11):668-673. doi:10.1111/j.1440-1827.2006.02027.x.

409. Chauvet E, Misslin C, Randrianjohany A, Gaulard P, Daigre J-L. [Gamma-delta T-cell lymphoma: outcome of a hyperactive malarial splenomegaly?]. *Rev Med Interne*. 2009;30(1):85-87. doi:10.1016/j.revmed.2008.03.369.

410. Ho M, Tongtawe P, Kriangkum J, et al. Polyclonal expansion of peripheral gamma delta T cells in human Plasmodium falciparum malaria. *Infection and Immunity*. 1994;62(3):855-862.

411. Ramsey JM, Tello A, Contreras CO, et al. Plasmodium falciparum and P. vivax gametocyte-specific exoantigens stimulate proliferation of TCR gammadelta+ lymphocytes. *J Parasitol*. 2002;88(1):59-68. doi:10.1645/0022-3395(2002)088[0059:PFAPVG]2.0.CO;2.

412. Travert M, Huang Y, de Leval L, et al. Molecular features of hepatosplenic T-cell lymphoma unravels potential novel therapeutic targets. *Blood*. 2012;119(24):5795-5806. doi:10.1182/blood-2011-12-396150.

413. Bachy E, Urb M, Chandra S, et al. CD1d-restricted peripheral T cell lymphoma in mice and humans. *Journal of Experimental Medicine*. 2016;213(5):841-857. doi:10.1084/jem.20150794.

414. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369(1):32-42. doi:10.1056/NEJMoa1215637.

415. Wang ML, Rule S, Martin P, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2013;369(6):507-516. doi:10.1056/NEJMoa1306220.

416. Wilcox RA. A three signal model of T-cell lymphoma pathogenesis. *Am J Hematol*. September 2015:n/a–n/a. doi:10.1002/ajh.24203.

417. Geissinger E, Sadler P, Roth S, et al. Disturbed expression of the T-cell receptor/CD3 complex and associated signaling molecules in CD30+ T-cell lymphoproliferations. *Haematologica*. 2010;95(10):1697-1704. doi:10.3324/haematol.2009.021428.

418. Tjon JML, Verbeek WHM, Kooy-Winkelaar YMC, et al. Defective synthesis or association of T-cell receptor chains underlies loss of surface T-cell receptor-CD3 expression in enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Blood*. 2008;112(13):5103-5110. doi:10.1182/blood-2008-04-150748.

419. Rodriguez-Pinilla SM, Sánchez MEC, Rodríguez J, et al. Loss of TCR-beta F1 and/or EZRIN expression is associated with unfavorable prognosis in nodal peripheral T-cell lymphomas. *Blood Cancer J*. 2013;3:e111. doi:10.1038/bcj.2013.10.

420. Berger CL, Hanlon D, Kanada D, et al. The growth of cutaneous T-cell lymphoma is stimulated by immature dendritic cells. *Blood*. 2002;99(8):2929-2939.

421. Wilcox RA, Wada DA, Ziesmer SC, et al. Monocytes promote tumor cell survival in T-cell lymphoproliferative disorders and are impaired in their ability to differentiate into mature dendritic cells. *Blood*. 2009;114(14):2936-2944. doi:10.1182/blood-2009-05-220111.

422. Wang X, Werneck MBF, Wilson BG, et al. TCR-dependent transformation of mature memory phenotype T cells in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3834-3845. doi:10.1172/JCI37210.

423. McCusker ME, Garifallou M, Bogen SA. Sezary lineage cells can be induced to proliferate via CD28-mediated costimulation. *J Immunol*. 1997;158(10):4984-4991.

424. Marafioti T, Paterson JC, Ballabio E, et al. The inducible T-cell co-stimulator molecule is expressed on subsets of T cells and is a new marker of lymphomas of T follicular helper cell-derivation. *Haematologica*. 2010;95(3):432-439. doi:10.3324/haematol.2009.010991.

425. Bisig B, de Reyniès A, Bonnet C, et al. CD30-positive peripheral T-cell lymphomas share molecular and phenotypic features. *Haematologica*. 2013;98(8):1250-1258. doi:10.3324/haematol.2012.081935.

426. Zhang Q, Wang H, Kantekure K, et al. Oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK induces expression of the growth-promoting receptor ICOS. *Blood*. 2011;118(11):3062-3071. doi:10.1182/blood-2011-01-332916.

427. Tsuchiya T, Ohshima K, Karube K, et al. Th1, Th2, and activated T-cell marker and clinical prognosis in peripheral T-cell lymphoma, unspecified: comparison with AILD, ALCL, lymphoblastic lymphoma, and ATLL. *Blood*. 2004;103(1):236-241. doi:10.1182/blood-2002-05-1352.

428. Waldmann TA, Conlon KC, Stewart DM, et al. Phase 1 trial of IL-15 trans presentation blockade using humanized Mikβ1 mAb in patients with T-cell large granular lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(3):476-484. doi:10.1182/blood-2012-08-450585.

429. Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, et al. The role of IL-32 in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*. 2014;134(5):1428-1435. doi:10.1038/jid.2013.488.

430. Streubel B, Vinatzer U, Willheim M, Raderer M, Chott A. Novel t(5;9)(q33;q22) fuses ITK to SYK in unspecified peripheral T-cell lymphoma. *Leukemia*.

2006;20(2):313-318. doi:10.1038/sj.leu.2404045.

431. Attygalle AD, Feldman AL, Dogan A. ITK/SYK translocation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(9):1456-1457. doi:10.1097/PAS.0b013e3182991415.

432. Feldman AL, Sun DX, Law ME, et al. Overexpression of Syk tyrosine kinase in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia*. 2008;22(6):1139-1143. doi:10.1038/leu.2008.77.

433. Pechloff K, Holch J, Ferch U, et al. The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma. *Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(5):1031-1044. doi:10.1084/jem.20092042.

434. Dierks C, Adrian F, Fisch P, et al. The ITK-SYK fusion oncogene induces a T-cell lymphoproliferative disease in mice mimicking human disease. *Cancer Res*. 2010;70(15):6193-6204. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3719.

435. Hussain A, Mohammad DK, Gustafsson MO, et al. Signaling of the ITK (interleukin 2-inducible T cell kinase)-SYK (spleen tyrosine kinase) fusion kinase is dependent on adapter SLP-76 and on the adapter function of the kinases SYK and ZAP70. *J Biol Chem*. 2013;288(10):7338-7350. doi:10.1074/jbc.M112.374967.

436. Boddicker RL, Razidlo GL, Dasari S, et al. Integrated mate-pair and RNA sequencing identifies novel, targetable gene fusions in peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2016;128(9):1234-1245. doi:10.1182/blood-2016-03-707141.

437. Scarfò I, Pellegrino E, Mereu E, et al. Identification of a new subclass of ALK-negative ALCL expressing aberrant levels of ERBB4 transcripts. *Blood*. 2016;127(2):221-232. doi:10.1182/blood-2014-12-614503.

438. Barreira M, Fabbiano S, Couceiro JR, et al. The C-terminal SH3 domain contributes to the intramolecular inhibition of Vav family proteins. *Sci Signal*. 2014;7(321):ra35. doi:10.1126/scisignal.2004993.

439. Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, et al. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet*. 2015;47(11):1304-1315. doi:10.1038/ng.3415.

440. Vallois D, Dobay MPD, Morin RD, et al. Activating mutations in genes related to TCR signaling in angioimmunoblastic and other follicular helper T-cell-derived lymphomas. *Blood*. July 2016:blood–2016–02–698977. doi:10.1182/blood-2016-02-698977.

441. Ruiz S, Santos E, Bustelo XR. The use of knockout mice reveals a synergistic role of the Vav1 and Rasgrf2 gene deficiencies in lymphomagenesis and metastasis. *PLoS ONE*. 2009;4(12):e8229. doi:10.1371/journal.pone.0008229.

442. Yoo HY, Sung MK, Lee SH, et al. A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2014;46(4):371-375. doi:10.1038/ng.2916.

443. Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, et al. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2014;46(2):171-175. doi:10.1038/ng.2872.

444. Palomero T, Couronné L, Khiabanian H, et al. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet*. 2014;46(2):166-170. doi:10.1038/ng.2873.

445. Manso R, Sánchez-Beato M, Monsalvo S, et al. The RHOA G17V gene mutation occurs frequently in peripheral T-cell lymphoma and is associated with a characteristic molecular signature. *Blood*. 2014;123(18):2893-2894. doi:10.1182/blood-2014-02-555946.

446. Fujisawa M, Sakata-Yanagimoto M, Nishizawa S, et al. Activation of RHOA-VAV1 signaling in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia*. August 2017. doi:10.1038/leu.2017.273.

447. Vaque JP, Gomez-Lopez G, Monsalvez V, et al. PLCG1 mutations in cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. February 2014:blood–2013–05–504308. doi:10.1182/blood-2013-05-504308.

448. Manso R, Rodríguez-Pinilla SM, González-Rincón J, et al. Recurrent presence of the PLCG1 S345F mutation in nodal peripheral T-cell lymphomas. *Haematologica*. 2015;100(1):e25-e27. doi:10.3324/haematol.2014.113696.

449. Moffitt AB, Ondrejka SL, McKinney M, et al. Enteropathy-associated T cell lymphoma subtypes are characterized by loss of function of SETD2. *J Exp Med*. 2017;214(5):1371-1386. doi:10.1084/jem.20160894.

450. McKinney M, Moffitt AB, Gaulard P, et al. The Genetic Basis of Hepatosplenic T-cell Lymphoma. *Cancer Discov*. 2017;7(4):369-379. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0330.

451. Rohr J, Guo S, Huo J, et al. Recurrent activating mutations of CD28 in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia*. December 2015. doi:10.1038/leu.2015.357.

452. Lee SH, Kim JS, Kim J, et al. A highly recurrent novel missense mutation in CD28 among angioimmunoblastic T-cell lymphoma patients. *Haematologica*. 2015;100(12):e505-e507. doi:10.3324/haematol.2015.133074.

453. Sekulic A, Liang WS, Tembe W, et al. Personalized treatment of Sézary syndrome by targeting a novel CTLA4:CD28 fusion. *Mol Genet Genomic Med*. 2015;3(2):130-136. doi:10.1002/mgg3.121.

454. Yoo HY, Kim P, Kim WS, et al. Frequent CTLA4-CD28 gene fusion in diverse types of T cell lymphoma. *Haematologica*. January 2016. doi:10.3324/haematol.2015.139253.

455. Bouchekioua A, Scourzic L, de Wever O, et al. JAK3 deregulation by activating mutations confers invasive growth advantage in extranodal nasal-type natural killer cell lymphoma. *Leukemia*. 2014;28(2):338-348. doi:10.1038/leu.2013.157.

456. Coppo P, Gouilleux-Gruart V, Huang Y, et al. STAT3 transcription factor is constitutively activated and is oncogenic in nasal-type NK/T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2009;23(9):1667-1678. doi:10.1038/leu.2009.91.

457. Koo GC, Tan SY, Tang T, et al. Janus kinase 3-activating mutations identified in natural killer/T-cell lymphoma. *Cancer Discov*. 2012;2(7):591-597. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0028.

458. Crescenzo R, Abate F, Lasorsa E, et al. Convergent mutations and kinase fusions lead to oncogenic STAT3 activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2015;27(4):516-532. doi:10.1016/j.ccell.2015.03.006.

459. Chiarle R, Simmons WJ, Cai H, et al. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat Med*. 2005;11(6):623-629. doi:10.1038/nm1249.

460. Koskela HLM, Eldfors S, Ellonen P, et al. Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(20):1905-1913. doi:10.1056/NEJMoa1114885.

461. Rajala HLM, Porkka K, Maciejewski JP, Loughran TP, Mustjoki S. Uncovering the pathogenesis of large granular lymphocytic leukemia-novel STAT3 and STAT5b mutations. *Ann Med*. 2014;46(3):114-122. doi:10.3109/07853890.2014.882105.

462. Kiel MJ, Velusamy T, Rolland D, et al. Integrated genomic sequencing reveals mutational landscape of T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;124(9):1460-1472. doi:10.1182/blood-2014-03-559542.

463. Bergmann AK, Schneppenheim S, Seifert M, et al. Recurrent mutation of JAK3 in T-cell prolymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53(4):309-316. doi:10.1002/gcc.22141.

464. Bellanger D, Jacquemin V, Chopin M, et al. Recurrent JAK1 and JAK3 somatic mutations in T-cell prolymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2014;28(2):417-419. doi:10.1038/leu.2013.271.

465. Zhang Q, Nowak I, Vonderheid EC, et al. Activation of Jak/STAT proteins involved in signal transduction pathway mediated by receptor for interleukin 2 in malignant T lymphocytes derived from cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma and Sezary syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(17):9148-9153.

466. Eriksen KW, Kaltoft K, Mikkelsen G, et al. Constitutive STAT3-activation in Sezary syndrome: tyrphostin AG490 inhibits STAT3-activation, interleukin-2 receptor expression and growth of leukemic Sezary cells. *Leukemia*. 2001;15(5):787-793.

467. Chen J, Petrus M, Bryant BR, et al. Induction of the IL-9 gene by HTLV-I Tax stimulates the spontaneous proliferation of primary adult T-cell leukemia cells by a paracrine mechanism. *Blood*. 2008;111(10):5163-5172. doi:10.1182/blood-2007-09-113654.

468. Chen J, Petrus M, Bryant BR, et al. Autocrine/paracrine cytokine stimulation of leukemic cell proliferation in smoldering and chronic adult T-cell leukemia. *Blood*.

2010;116(26):5948-5956. doi:10.1182/blood-2010-04-277418.

469. Ju W, Zhang M, Jiang J-K, et al. CP-690,550, a therapeutic agent, inhibits cytokine-mediated Jak3 activation and proliferation of T cells from patients with ATL and HAM/TSP. *Blood*. 2011;117(6):1938-1946. doi:10.1182/blood-2010-09-305425.

470. Elliott NE, Cleveland SM, Grann V, Janik J, Waldmann TA, Davé UP. FERM domain mutations induce gain of function in JAK3 in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2011;118(14):3911-3921. doi:10.1182/blood-2010-12-319467.

471. Roberti A, Dobay MP, Bisig B, et al. Type II enteropathy-associated T-cell lymphoma features a unique genomic profile with highly recurrent SETD2 alterations. *Nat Commun*. 2016;7:12602. doi:10.1038/ncomms12602.

472. Moffitt AB, Ondrejka SL, McKinney M, et al. Enteropathy-associated T cell lymphoma subtypes are characterized by loss of function of SETD2. *Journal of Experimental Medicine*. 2017;214(5):1371-1386. doi:10.1084/jem.20160894.

473. Nicolae A, Xi L, Pittaluga S, et al. Frequent STAT5B mutations in γδ hepatosplenic T-cell lymphomas. *Leukemia*. 2014;28(11):2244-2248. doi:10.1038/leu.2014.200.

474. Küçük C, Jiang B, Hu X, et al. Activating mutations of STAT5B and STAT3 in lymphomas derived from γδ-T or NK cells. *Nat Commun*. 2015;6:6025. doi:10.1038/ncomms7025.

475. da Silva Almeida AC, Abate F, Khiabanian H, et al. The mutational landscape of cutaneous T cell lymphoma and Sézary syndrome. *Nat Genet*. 2015;47(12):1465-1470. doi:10.1038/ng.3442.

476. Kleppe M, Lahortiga I, Chaar El T, et al. Deletion of the protein tyrosine phosphatase gene PTPN2 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2010;42(6):530-535. doi:10.1038/ng.587.

477. Kleppe M, Soulier J, Asnafi V, et al. PTPN2 negatively regulates oncogenic JAK1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;117(26):7090-7098. doi:10.1182/blood-2010-10-314286.

478. Ko M, Bandukwala HS, An J, et al. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(35):14566-14571. doi:10.1073/pnas.1112317108.

479. Couronné L, Bastard C, Bernard OA. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2012;366(1):95-96. doi:10.1056/NEJMc1111708.

480. Lemonnier F, Couronné L, Parrens M, et al. Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters. *Blood*. 2012;120(7):1466-1469. doi:10.1182/blood-2012-02-408542.

481. Odejide O, Weigert O, Lane AA, et al. A targeted mutational landscape of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2014;123(9):1293-1296. doi:10.1182/blood-2013-10-531509.

482. Wang C, McKeithan TW, Gong Q, et al. IDH2R172 mutations define a unique subgroup of patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2015;126(15):1741-1752. doi:10.1182/blood-2015-05-644591.

483. Schwartz FH, Cai Q, Fellmann E, et al. TET2 mutations in B cells of patients affected by angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *J Pathol*. 2017;242(2):129-133. doi:10.1002/path.4898.

484. Zang S, Li J, Yang H, et al. Mutations in 5-methylcytosine oxidase TET2 and RhoA cooperatively disrupt T cell homeostasis. *J Clin Invest*. 2017;127(8):2998-3012. doi:10.1172/JCI92026.

485. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488-2498. doi:10.1056/NEJMoa1408617.

486. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet*. 2012;44(11):1179-1181. doi:10.1038/ng.2413.

487. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*. 2011;20(1):11-24. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.001.

488. Challen GA, Sun D, Mayle A, et al. Dnmt3a and Dnmt3b have overlapping and distinct functions in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2014;15(3):350-364. doi:10.1016/j.stem.2014.06.018.

489. Young AL, Challen GA, Birmann BM, Druley TE. Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults. *Nat Commun*. 2016;7:12484. doi:10.1038/ncomms12484.

490. Quivoron C, Couronné L, Valle Della V, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell*. 2011;20(1):25-38. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.003.

491. Muto H, Sakata-Yanagimoto M, Nagae G, et al. Reduced TET2 function leads to T-cell lymphoma with follicular helper T-cell-like features in mice. *Blood Cancer J*. 2014;4:e264. doi:10.1038/bcj.2014.83.

492. Nishizawa S, Sakata-Yanagimoto M, Hattori K, et al. BCL6 locus is hypermethylated in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Int J Hematol*. 2017;105(4):465-469. doi:10.1007/s12185-016-2159-z.

493. Scourzic L, Couronné L, Pedersen MT, et al. DNMT3A(R882H) mutant and Tet2 inactivation cooperate in the deregulation of DNA methylation control to induce lymphoid malignancies in mice. *Leukemia*. 2016;30(6):1388-1398. doi:10.1038/leu.2016.29.

494. Grossmann V, Haferlach C, Weissmann S, et al. The molecular profile of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: mutations in RUNX1 and DNMT3A are associated

with poor prognosis in T-ALL. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(4):410-422. doi:10.1002/gcc.22039.

495. Yuan H, Li N, Fu D, et al. Histone methyltransferase SETD2 modulates alternative splicing to inhibit intestinal tumorigenesis. *J Clin Invest*. 2017;127(9):3375-3391. doi:10.1172/JCI94292.

496. Carvalho S, Vítor AC, Sridhara SC, et al. SETD2 is required for DNA double-strand break repair and activation of the p53-mediated checkpoint. *Elife*. 2014;3:e02482. doi:10.7554/eLife.02482.

497. Park IY, Powell RT, Tripathi DN, et al. Dual Chromatin and Cytoskeletal Remodeling by SETD2. *Cell*. 2016;166(4):950-962. doi:10.1016/j.cell.2016.07.005.

498. Lauritzen AF, Vejlsgaard GL, Hou-Jensen K, Ralfkiaer E. p53 protein expression in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol*. 1995;133(1):32-36.

499. Li G, Chooback L, Wolfe JT, et al. Overexpression of p53 protein in cutaneous T cell lymphoma: relationship to large cell transformation and disease progression. *J Invest Dermatol*. 1998;110(5):767-770. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00167.x.

500. McGregor JM, Crook T, Fraser-Andrews EA, et al. Spectrum of p53 gene mutations suggests a possible role for ultraviolet radiation in the pathogenesis of advanced cutaneous lymphomas. *J Invest Dermatol*. 1999;112(3):317-321. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00507.x.

501. Laharanne E, Oumouhou N, Bonnet F, et al. Genome-wide analysis of cutaneous T-cell lymphomas identifies three clinically relevant classes. *J Invest Dermatol*. 2010;130(6):1707-1718. doi:10.1038/jid.2010.8.

502. Vermeer MH, van Doorn R, Dijkman R, et al. Novel and highly recurrent chromosomal alterations in Sézary syndrome. *Cancer Res*. 2008;68(8):2689-2698. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6398.

503. Gros A, Laharanne E, Vergier M, et al. TP53 alterations in primary and secondary Sézary syndrome: A diagnostic tool for the assessment of malignancy in patients with erythroderma. *PLoS ONE*. 2017;12(3):e0173171. doi:10.1371/journal.pone.0173171.

504. McGirt LY, Jia P, Baerenwald DA, et al. Whole-genome sequencing reveals oncogenic mutations in mycosis fungoides. *Blood*. 2015;126(4):508-519. doi:10.1182/blood-2014-11-611194.

505. Jiang L, Gu Z-H, Yan Z-X, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DDX3X in natural killer/T-cell lymphoma. *Nat Genet*. 2015;47(9):1061-1066. doi:10.1038/ng.3358.

506. Vasmatzis G, Johnson SH, Knudson RA, et al. Genome-wide analysis reveals recurrent structural abnormalities of TP63 and other p53-related genes in peripheral T-cell lymphomas. *Blood*. 2012;120(11):2280-2289. doi:10.1182/blood-2012-03-419937.

507. Chavan RN, Bridges AG, Knudson RA, et al. Somatic rearrangement of the TP63

gene preceding development of mycosis fungoides with aggressive clinical course. *Blood Cancer J*. 2014;4:e253. doi:10.1038/bcj.2014.73.

508. Pedersen MB, Hamilton-Dutoit SJ, Bendix K, et al. DUSP22 and TP63 rearrangements predict outcome of ALK-negative anaplastic large cell lymphoma: a Danish cohort study. *Blood*. 2017;130(4):554-557. doi:10.1182/blood-2016-12-755496.

509. Macon WR, Levy NB, Kurtin PJ, et al. Hepatosplenic alphabeta T-cell lymphomas: a report of 14 cases and comparison with hepatosplenic gammadelta T-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(3):285-296.

510. Przybylski GK, Wu H, Macon WR, et al. Hepatosplenic and subcutaneous panniculitis-like gamma/delta T cell lymphomas are derived from different Vdelta subsets of gamma/delta T lymphocytes. *J Mol Diagn*. 2000;2(1):11-19.

511. Shale M, Kanfer E, Panaccione R, Ghosh S. Hepatosplenic T cell lymphoma in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2008;57(12):1639-1641. doi:10.1136/gut.2008.163279.

512. Kotlyar DS, Osterman MT, Diamond RH, et al. A systematic review of factors that contribute to hepatosplenic T-cell lymphoma in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(1):36–41.e1. doi:10.1016/j.cgh.2010.09.016.

513. Weidmann E. Hepatosplenic T cell lymphoma. A review on 45 cases since the first report describing the disease as a distinct lymphoma entity in 1990. *Leukemia*. 2000;14(6):991-997.

514. Wlodarska I, Martin-Garcia N, Achten R, et al. Fluorescence in situ hybridization study of chromosome 7 aberrations in hepatosplenic T-cell lymphoma: isochromosome 7q as a common abnormality accumulating in forms with features of cytologic progression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;33(3):243-251.

515. Wang CC, Tien HF, Lin MT, et al. Consistent presence of isochromosome 7q in hepatosplenic T gamma/delta lymphoma: a new cytogenetic-clinicopathologic entity. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995;12(3):161-164.

516. Chott A, Haedicke W, Mosberger I, et al. Most CD56+ intestinal lymphomas are CD8+CD5-T-cell lymphomas of monomorphic small to medium size histology. *Am J Pathol*. 1998;153(5):1483-1490. doi:10.1016/S0002-9440(10)65736-7.

517. McGregor S, Shah A, Raca G, et al. PLZF staining identifies peripheral T-cell lymphomas derived from innate-like T-cells with TRAV1-2-TRAJ33 TCR-α rearrangement. *Blood*. 2014;123(17):2742-2743. doi:10.1182/blood-2014-02-555482.

518. Xie P, Tian C, An L, et al. Histone methyltransferase protein SETD2 interacts with p53 and selectively regulates its downstream genes. *Cell Signal*. 2008;20(9):1671-1678. doi:10.1016/j.cellsig.2008.05.012.

519. Pfister SX, Ahrabi S, Zalmas L-P, et al. SETD2-dependent histone H3K36 trimethylation is required for homologous recombination repair and genome stability.

Cell Rep. 2014;7(6):2006-2018. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.026.

520. Richter J, Schlesner M, Hoffmann S, et al. Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet*. 2012;44(12):1316-1320. doi:10.1038/ng.2469.

521. Li J, Maruyama T, Zhang P, et al. Mutation of inhibitory helix-loop-helix protein Id3 causes γδ T-cell lymphoma in mice. *Blood*. 2010;116(25):5615-5621. doi:10.1182/blood-2010-03-274506.

522. Li J, Roy S, Kim Y-M, et al. Id2 Collaborates with Id3 To Suppress Invariant NKT and Innate-like Tumors. *The Journal of Immunology*. 2017;198(8):3136-3148. doi:10.4049/jimmunol.1601935.

523. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711.

524. Piesman J, Eisen L. Prevention of tick-borne diseases. *Annu Rev Entomol*. 2008;53(1):323-343. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093429.

525. Hubálek Z. Epidemiology of lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol*. 2009;37:31-50. doi:10.1159/000213069.

526. Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(8):1093-1101. doi:10.1172/JCI21681.

527. Balmelli T, Piffaretti JC. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of Borrelia burgdorferi sensu lato. *Res Microbiol*. 1995;146(4):329-340.

528. Lenormand C, Jaulhac B, De Martino S, Barthel C, Lipsker D. Species of Borrelia burgdorferi complex that cause borrelial lymphocytoma in France. *Br J Dermatol*. 2009;161(1):174-176. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09100.x.

529. Radolf JD, Caimano MJ, Stevenson B, Hu LT. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(2):87-99. doi:10.1038/nrmicro2714.

530. Buechner SA, Rufli T, Erb P. Acrodermatitis chronic atrophicans: a chronic T-cell-mediated immune reaction against Borrelia burgdorferi? Clinical, histologic, and immunohistochemical study of five cases. *J Am Acad Dermatol*. 1993;28(3):399-405.

531. Schöllkopf C, Melbye M, Munksgaard L, et al. Borrelia infection and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008;111(12):5524-5529. doi:10.1182/blood-2007-08-109611.

532. la Fouchardiere de A, Vandenesch F, Berger F. Borrelia-associated primary cutaneous MALT lymphoma in a nonendemic region. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(5):702-703.

533. Goodlad JR, Davidson MM, Hollowood K, et al. Primary cutaneous B-cell lymphoma and Borrelia burgdorferi infection in patients from the Highlands of

Scotland. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(9):1279-1285.

534. Wood GS, Kamath NV, Guitart J, et al. Absence of Borrelia burgdorferi DNA in cutaneous B-cell lymphomas from the United States. *J Cutan Pathol*. 2001;28(10):502-507.

535. Goteri G, Ranaldi R, Simonetti O, et al. Clinicopathological features of primary cutaneous B-cell lymphomas from an academic regional hospital in central Italy: no evidence of Borrelia burgdorferi association. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(11):2184-2188. doi:10.1080/10428190701618250.

536. Li C, Inagaki H, Kuo T-T, Hu S, Okabe M, Eimoto T. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a molecular and clinicopathologic study of 24 asian cases. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(8):1061-1069.

537. McKisic MD, Barthold SW. T-cell-independent responses to Borrelia burgdorferi are critical for protective immunity and resolution of lyme disease. *Infection and Immunity*. 2000;68(9):5190-5197.

538. Bockenstedt LK, Gonzalez DG, Haberman AM, Belperron AA. Spirochete antigens persist near cartilage after murine Lyme borreliosis therapy. *J Clin Invest*. 2012;122(7):2652-2660. doi:10.1172/JCI58813.

539. Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagómez D, et al. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(19):10913-10918. doi:10.1073/pnas.1833166100.

540. Chang W-S, Kim J-Y, Kim Y-J, et al. Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. *The Journal of Immunology*. 2008;181(10):6707-6710.

541. Vahl JC, Heger K, Knies N, et al. NKT cell-TCR expression activates conventional T cells in vivo, but is largely dispensable for mature NKT cell biology. Marrack P, ed. *PLoS Biol*. 2013;11(6):e1001589. doi:10.1371/journal.pbio.1001589.

542. Matsuda JL, Gapin L, Sidobre S, et al. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat Immunol*. 2002;3(10):966-974. doi:10.1038/ni837.

543. Watarai H, Sekine-Kondo E, Shigeura T, et al. Development and function of invariant natural killer T cells producing T(h)2- and T(h)17-cytokines. Marrack P, ed. *PLoS Biol*. 2012;10(2):e1001255. doi:10.1371/journal.pbio.1001255.

544. Doisne J-M, Becourt C, Amniai L, et al. Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor (gamma)t+ and respond preferentially under inflammatory conditions. *The Journal of Immunology*. 2009;183(3):2142-2149. doi:10.4049/jimmunol.0901059.

545. Akbari O, Stock P, Meyer EH, et al. ICOS/ICOSL interaction is required for CD4+ invariant NKT cell function and homeostatic survival. *J Immunol*. 2008;180(8):5448-5456.

546. Gleimer M, Boehmer von H, Kreslavsky T. PLZF Controls the Expression of a Limited Number of Genes Essential for NKT Cell Function. *Front Immunol*. 2012;3:374. doi:10.3389/fimmu.2012.00374.

547. Mysliwiec MR, Carlson CD, Tietjen J, Hung H, Ansari AZ, Lee Y. Jarid2 (Jumonji, AT rich interactive domain 2) regulates NOTCH1 expression via histone modification in the developing heart. *J Biol Chem*. 2012;287(2):1235-1241. doi:10.1074/jbc.M111.315945.

548. Pomerantz RG, Mirvish ED, Erdos G, Falo LD, Geskin LJ. Novel approach to gene expression profiling in Sézary syndrome. *Br J Dermatol*. 2010;163(5):1090-1094. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.09973.x.

549. Jeon YK, Go H, Nam SJ, et al. Expression of the promyelocytic leukemia zinc-finger in T-lymphoblastic lymphoma and leukemia has strong implications for their cellular origin and greater association with initial bone marrow involvement. *Mod Pathol*. 2012;25(9):1236-1245. doi:10.1038/modpathol.2012.82.

550. Nebozhyn M, Loboda A, Kari L, et al. Quantitative PCR on 5 genes reliably identifies CTCL patients with 5% to 99% circulating tumor cells with 90% accuracy. *Blood*. 2006;107(8):3189-3196. doi:10.1182/blood-2005-07-2813.

551. Chiu YH, Jayawardena J, Weiss A, et al. Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments. *J Exp Med*. 1999;189(1):103-110.

552. Behar SM, Podrebarac TA, Roy CJ, Wang CR, Brenner MB. Diverse TCRs recognize murine CD1. *J Immunol*. 1999;162(1):161-167.

553. Garrido P, Ruiz-Cabello F, Bárcena P, et al. Monoclonal TCR-Vbeta13.1+/CD4+/NKa+/CD8-/+dim T-LGL lymphocytosis: evidence for an antigen-driven chronic T-cell stimulation origin. *Blood*. 2007;109(11):4890-4898. doi:10.1182/blood-2006-05-022277.

554. Murray A, Cuevas EC, Jones DB, Wright DH. Study of the immunohistochemistry and T cell clonality of enteropathy-associated T cell lymphoma. *Am J Pathol*. 1995;146(2):509-519.

555. Picken RN, Strle F, Ruzic-Sabljic E, et al. Molecular subtyping of Borrelia burgdorferi sensu lato isolates from five patients with solitary lymphocytoma. *J Invest Dermatol*. 1997;108(1):92-97.

556. Jelić S, Filipović-Ljesković I. Positive serology for Lyme disease borrelias in primary cutaneous B-cell lymphoma: a study in 22 patients; is it a fortuitous finding? *Hematol Oncol*. 1999;17(3):107-116.

557. Kütting B, Bonsmann G, Metze D, Luger TA, Cerroni L. Borrelia burgdorferi-associated primary cutaneous B cell lymphoma: complete clearing of skin lesions after antibiotic pulse therapy or intralesional injection of interferon alfa-2a. *J Am Acad Dermatol*. 1997;36(2 Pt 2):311-314.

558. Grange F, Wechsler J, Guillaume J-C, et al. Borrelia burgdorferi-associated

lymphocytoma cutis simulating a primary cutaneous large B-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol*. 2002;47(4):530-534.

559. Landeira D, Sauer S, Poot R, et al. Jarid2 is a PRC2 component in embryonic stem cells required for multi-lineage differentiation and recruitment of PRC1 and RNA Polymerase II to developmental regulators. *Nat Cell Biol*. 2010;12(6):618-624. doi:10.1038/ncb2065.

560. Li G, Margueron R, Ku M, Chambon P, Bernstein BE, Reinberg D. Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes & Development*. 2010;24(4):368-380. doi:10.1101/gad.1886410.

561. Engel I, Seumois G, Chavez L, et al. Innate-like functions of natural killer T cell subsets result from highly divergent gene programs. *Nat Immunol*. 2016;17(6):728-739. doi:10.1038/ni.3437.

562. Simon C, Chagraoui J, Krosl J, et al. A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia. *Genes & Development*. 2012;26(7):651-656. doi:10.1101/gad.186411.111.

563. Puda A, Milosevic JD, Berg T, et al. Frequent deletions of JARID2 in leukemic transformation of chronic myeloid malignancies. *Am J Hematol*. 2012;87(3):245-250. doi:10.1002/ajh.22257.

564. Muñoz-Fontela C, Mandinova A, Aaronson SA, Lee SW. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. *Nature Reviews Immunology*. 2016;16(12):741-750. doi:10.1038/nri.2016.99.

565. Boehme SA, Lenardo MJ. TCR-mediated death of mature T lymphocytes occurs in the absence of p53. *J Immunol*. 1996;156(11):4075-4078.

566. Ichim G, Lopez J, Ahmed SU, et al. Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Mol Cell*. 2015;57(5):860-872. doi:10.1016/j.molcel.2015.01.018.

567. Tang HL, Tang HM, Mak KH, et al. Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Mol Biol Cell*. 2012;23(12):2240-2252. doi:10.1091/mbc.E11-11-0926.

568. Liu Q-L, Kishi H, Ohtsuka K, Muraguchi A. Heat shock protein 70 binds caspase-activated DNase and enhances its activity in TCR-stimulated T cells. *Blood*. 2003;102(5):1788-1796. doi:10.1182/blood-2002-11-3499.

569. Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sékaly RP. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med*. 1999;190(12):1879-1890.

570. Kempf W, Kazakov DV, Hübscher E, Tinguely M. Cutaneous Borreliosis With a T-Cell-Rich Infiltrate and Simultaneous Involvement by B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia With t(14;18)(q32;q21). *Am J Dermatopathol*. 2015;37(9):715-718. doi:10.1097/DAD.0000000000000216.

571. Böer A, Bresch M, Dayrit J, Falk TM. Erythema migrans: a reassessment of diagnostic criteria for early cutaneous manifestations of borreliosis with particular emphasis on clonality investigations. *Br J Dermatol*. 2007;156(6):1263-1271. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.07918.x.

572. Ciceroni L, Ciarrochi S, Ciervo A, et al. Isolation and characterization of Borrelia burgdorferi sensu lato strains in an area of Italy where Lyme borreliosis is endemic. *J Clin Microbiol*. 2001;39(6):2254-2260. doi:10.1128/JCM.39.6.2254-2260.2001.

573. Anttila TI, Lehtinen T, Leinonen M, et al. Serological evidence of an association between chlamydial infections and malignant lymphomas. *Br J Haematol*. 1998;103(1):150-156.

574. Chanudet E, Adam P, Nicholson AG, et al. Chlamydiae and Mycoplasma infections in pulmonary MALT lymphoma. *Br J Cancer*. 2007;97(7):949-951. doi:10.1038/sj.bjc.6603981.

575. Shen D, Yuen HKL, Galita DA, Chan NR, Chan C-C. Detection of Chlamydia pneumoniae in a bilateral orbital mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Ophthalmol*. 2006;141(6):1162-1163. doi:10.1016/j.ajo.2006.01.067.

576. Chan C-C, Shen D, Mochizuki M, et al. Detection of Helicobacter pylori and Chlamydia pneumoniae genes in primary orbital lymphoma. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2006;104:62-70.

577. Borghi A, Caselli E, Di Luca D, et al. Detection of Chlamydophila pneumoniae and human herpesvirus 8 in primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma: a case report. *Infect Agents Cancer*. 2013;8(1):41. doi:10.1186/1750-9378-8-41.

578. B N, PM W, L K, et al. The Prevalence of Chlamydophila pneumoniae in the Blood Samples of Patients with Primary Cutaneous Lymphomas. *J Transm Dis Immun*. 2017;01(01):1-7. doi:10.21767/2573-0320.10001.

579. Qin JZ, Zhang CL, Kamarashev J, Dummer R, Burg G, Döbbeling U. Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myb genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood*. 2001;98(9):2778-2783.

580. van Schaik B, Klarenbeek P, Doorenspleet M, et al. Discovery of invariant T cells by next-generation sequencing of the human TCR α-chain repertoire. *The Journal of Immunology*. 2014;193(10):5338-5344. doi:10.4049/jimmunol.1401380.

581. Choi WI, Kim MY, Jeon BN, et al. Role of Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger (PLZF) in cell proliferation and Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A (p21WAF/CDKN1A) gene repression. *J Biol Chem*. May 2014:jbc.M113.538751. doi:10.1074/jbc.M113.538751.

582. Liu TM, Lee EH, Lim B, Shyh-Chang N. Concise Review: Balancing Stem Cell Self-Renewal and Differentiation with PLZF. *Stem Cells*. 2016;34(2):277-287. doi:10.1002/stem.2270.

583. Parrado A, Robledo M, Moya-Quiles MR, et al. The promyelocytic leukemia zinc finger protein down-regulates apoptosis and expression of the proapoptotic BID

protein in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(7):1898-1903. doi:10.1073/pnas.0308358100.

584. Gérart S, Sibéril S, Martin E, et al. Human iNKT and MAIT cells exhibit a PLZF-dependent proapoptotic propensity that is counterbalanced by XIAP. *Blood*. 2013;121(4):614-623. doi:10.1182/blood-2012-09-456095.

585. Monticelli LA, Yang Y, Knell J, et al. Transcriptional regulator Id2 controls survival of hepatic NKT cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(46):19461-19466. doi:10.1073/pnas.0908249106.

586. Roy S, Zhuang Y. Orchestration of invariant natural killer T cell development by E and Id proteins. *Crit Rev Immunol*. 2015;35(1):33-48.

587. Li J, Wu D, Jiang N, Zhuang Y. Combined deletion of Id2 and Id3 genes reveals multiple roles for E proteins in invariant NKT cell development and expansion. *The Journal of Immunology*. 2013;191(10):5052-5064. doi:10.4049/jimmunol.1301252.