HAL
open science

Rôle des récepteurs NK dans les lymphoproliférations T matures. Exemple des leucémies/lymphomes T de l'adulte associés à l'HTLV-1 et des lymphoproliférations T intestinales primitives

Morgane Cheminant

To cite this version:

Morgane Cheminant. Rôle des récepteurs NK dans les lymphoproliférations T matures. Exemple des leucémies/lymphomes T de l'adulte associés à l'HTLV-1 et des lymphoproliférations T intestinales primitives. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS301 . tel-02948705

HAL Id: tel-02948705

https://theses.hal.science/tel-02948705

Submitted on 25 Sep 2020

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.

NNT: 2018SACLS301

Rôle des récepteurs NK dans les lymphoproliférations T matures. Exemple des leucémies/lymphomes T de l'adulte associés à l'HTLV-1 et des lymphoproliférations T intestinales primitives.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°582
Cancérologie : biologie - médecine - santé (CBMS)
Spécialité de doctorat: cancérologie

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 24 Septembre 2018, par

Morgane Cheminant

Composition du Jury :

M le professeur Aurélien MARABELLE Gustave Roussy – Inserm U1015	Président
M le professeur Nicolas ORTONNE Université Paris-Est Créteil – IMRB – Inserm U955	Rapporteur
M le docteur Laurent GENESTIER Centre Léon Berard – UMR Inserm 1052 - CNRS 5286	Rapporteur
Mme le docteur Nadine CERF-BENSUSSAN Institut Imagine – UMR Inserm U1163	Examinateur
Mme le professeur Georgia MALAMUT Université Paris Descartes – UMR Inserm U1163	Examinateur
M le professeur Philippe GAULARD Université Paris-Est Créteil – IMRB – Inserm U955	Examinateur
M le professeur Olivier HERMINE Université Paris Descartes – UMR Inserm U1163	Directeur de thèse

Thèse de doctorat

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS 3
TABLE DES ILLUSTRATIONS 5

INTRODUCTION 6

GÉNÉRALITÉS 7

EXEMPLES DE DEUX LYMPHOMES T PERIPHERIQUES RARES 10
A. LEUCEMIES/LYMPHOMES T DE L'ADULTE ASSOCIES A L' HTLV-1 10
B. LYMPHOPROLIFERATIONS T INTESTINALES PRIMITIVES 21

RÉCEPTEURS NATURAL KILLER 33
A. RECEPTEURS KIR ET NCRS : GENERALITES 33
B. EXPRESSION PHYSIOLOGIQUE DES NKRS 36
C. LE RECEPTEUR KIR3DL2 45
D. LE RECEPTEUR NKP46 47

RECEPTEURS NK ET HEMOPATHIES LYMPHOÏDES 49
A. EXPRESSION DES NKRS DANS LES HEMOPATHIES LYMPHOÏDES 49
B. ROLE DES NKRS DANS LA LYMPHOMAGENESE 55

OBJECTIFS DE LA THESE 58

RESULTATS 59

ARTICLE 1 60
NKP46 IS A DIAGNOSTIC MARKER AND MAY BE A THERAPEUTIC TARGET IN INTESTINAL T-CELL LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASES

ARTICLE 2 (EN PRÉPARATION) 62
MEMBRANE EXPRESSION OF NK RECEPTOR KIR3DL2 CONTRIBUTES TO DELINEATE THE ACUTE ATL AND IS A THERAPEUTIC TARGET IN ATL

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 68

A. ORIGINES CELLULAIRES ET CLASSIFICATION DES LYMPHOMES T PERIPHERIQUES 69
B. ASPECTS DIAGNOSTIQUES 73
C. ASPECTS THERAPEUTIQUES 76

BIBLIOGRAPHIE 79

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement Laurent Genestier et Nicolas Ortonne d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Merci à mes examinateurs, Nadine Cerf-Bensussan, Georgia Malamut et Philippe Gaulard. Merci à Aurélien Marabelle d'avoir accepté de présider ce jury.

Olivier, merci à toi d'avoir encadré ce travail de thèse. Merci pour la liberté que tu m'as laissée, le soutien et la sympathie que tu m'as témoignée, même si ceux-ci se manifestent parfois à des heures où mes neurones ne sont plus capables d'une connexion efficace!

Ce travail n'aurait pas été possible sans toi, Julie. Il est difficile d'exprimer à quel point tu m'as aidée, tant sur le plan technique que sur le plan humain! J'espère que nous allons pouvoir continuer à prendre autant de plaisir à travailler ensemble. Merci également à Thierry Molina et à l'équipe d'anatomopathologie pour leur accueil chaleureux. Je n'oublie pas Nicole Brousse qui m'a aidé à débuter ce travail.

Nadine, je voudrais particulièrement vous remercier pour avoir accepté cette collaboration inattendue et m'avoir accueillie avec tant de bienveillance dans votre équipe. Merci au CELAC, à Christophe Cellier et Georgia Malamut qui ont soutenu ce travail.

Hervé, alors que rien ne t'y obligeait, tu m'as appris les rudiments et puis les finesses des manips. Merci pour ta générosité et ton esprit critique! Ah, cher labo 217! Simon, tes problèmes scientifiques corsés vont me manquer. Mathilde, Rachelle, Moussab, votre bonne humeur a fait de cette thèse un très bon moment. Nicolas, merci à toi pour ton humour, qui m'a bien remonté le moral quand les résultats n'étaient pas au rendez-vous! Yves, tu m'as convaincue que j'étais capable de faire les manips d'infection HTLV-1 alors que cela me semblait une montagne... Merci à toi de m'avoir lancée.

Je remercie vivement toute l'équipe d'onco-hématologie biologique de l'hôpital Necker sans qui j'aurais eu bien du mal à débuter cette thèse. Elizabeth, votre soutien m'a été salutaire, et cela depuis longtemps. Merci à toi Vahid pour tes conseils avisés et ton accueil toujours chaleureux au labo! Ludo, je te remercie d'avoir trouvé du temps à me consacrer malgré les innombrables projets que tu mènes. Merci surtout pour ta bonne humeur inaltérable. Agatha, Amélie, Patrick, Mehdi, Naima, merci pour vos conseils, votre aide pour les manips et leur interprétation. Chantal, pour une fois je t'ai peu sollicitée, mais je voudrais quand même te remercier pour ta gentillesse et ta disponibilité.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans citer l'équipe d'hématologie clinique de l'hôpital Necker. Il est difficile d'exprimer à quel point j'ai eu et ai toujours du plaisir à travailler avec vous tous. Felipe, merci pour tous ces domaines scientifiques et médicaux dans l'apprentissage desquels tu m'as accompagnée. Merci surtout pour

ton soutien et d'avoir toujours été là quand c'était nécessaire pour moi. Ambroise, David, sans vous et votre sympathie, je n'aurais pas pu faire ce travail, merci à vous! Ambroise, ton soutien, parfois critique, m'est précieux. Merci également aux autres cliniciens et à toute l'équipe para-médicale.

J'aimerais également remercier Hélène Sicard, Cécile Bonnafous et Florence Lhospice pour votre enthousiasme et votre réactivité. Ces sessions de travail marseillaises resteront des parenthèses ensoleillées de cette thèse!

Enfin, j'aimerais souligner que ce travail est issue d'une entreprise collective, qui n'aurait pu être possible sans la gentillesse et l'envie d'avancer d'un grand nombre de professionnels que je ne peux malheureusement tous citer. Je ne sais en outre comment remercier les patients qui, alors qu'ils étaient souvent confrontés à des situations difficiles, ont accepté que des travaux de recherche soient menés. J'espère ne jamais oublier que l'ultime but de tous nos travaux est d'améliorer le soin et notre pratique.

Mes chers parents, ma soeur généreuse, les amis de tous horizons, vous avez toujours été là quand il le fallait, merci!

Louis, notre plus beau cadeau est né cette année. Ta présence à mes côtés et la joie de découvrir Elouan m'enchantent.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Classification des lymphomes T périphériques..... 11
Figure 2: Survie globale selon la forme clinique de l'ATL..... 15
Figure 3: Schéma résumant la physiopathologie de l'ATL..... 16
Figure 4: Profil génétique de l'HTLV-1 et profil d'expressions de Tax et HBZ dans les cellules primaires d'ATL..... 19
Figure 5: Caractéristiques histologiques des lymphomes T primitifs intestinaux..... 25
Figure 6: Critères histopathologiques, immunophénotypiques et moléculaires des diagnostics des maladies coeliaques réfractaires de type 1 et de type 2, et du lymphome T primitif intestinal associé à une entéropathie..... 27
Figure 7: Sous-types de lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) intestinaux murins et humains..... 29
Figure 8: Schéma de la physiopathologie de la maladie coeliaque réfractaire de type II..... 31
Figure 9: Le Leukocyte Receptor Complex (dont la région 19q13.4). A droite, un prototype d'haplotype KIR..... 34
Figure 10: Parallèle entre les lymphocytes T du système immunitaire adaptatif et les cellules lymphoïdes innées..... 39
Figure 11: Modèle montrant comment des lymphocytes T peuvent acquérir des caractéristiques innées sous l'effet d'une stimulation antigénique chronique..... 43
Figure 12: Expression de KIR3DL2 dans les lymphomes T cutanés..... 51
Figure 13: Expression de l'ARN messager de TAX (en rose) dans deux cellules tumorales d'une biopsie ganglionnaire chez une patiente porteuse d'un ATL aiguë..... 61
Figure 14: Phénotype de méthylation des ilôts CpG dans les ATL (CIMP)..... 62
Figure 15: Origines cellulaires présumées de lymphomes T périphériques..... 68
Figure 16: Expression de NKp46 en immunohistochimie sur des biopsies paraffinées d'une cohorte de lymphomes T/NK de type nasal..... 69
Figure 17: Résultats préliminaires d'expression de NKp46 en immunohistochimie sur des biopsies d'une cohorte de PTCLs..... 71
Figure 18: Résultats préliminaires d'expression de KIR3DL2 en immunohistochimie sur des biopsies d'une cohorte de PTCLs..... 71

Tableau 1: Atteintes cliniques et biologiques des différentes formes d'ATL, selon la classification de Shimoyama..... 13
Tableau 2: Caractéristiques des lymphoproliférations T gastro-intestinales primitives..... 23
Tableau 3: Expression des récepteurs NK dans les différents types de lymphomes T périphériques..... 53

INTRODUCTION

GÉNÉRALITÉS

Les lymphomes T périphériques (PTCLs) représentent entre 6 et 7% des lymphomes et sont des entités hétérogènes encore mal individualisées (Laurent et al., 2017). Le pronostic de ces PTCLs est médiocre avec des survies à long terme de l'ordre de 40% malgré l'utilisation de chimiothérapies intensives (Armitage, 2017). Leurs présentations clinico-biologiques sont extrêmement variées, reflétant des origines cellulaires et des mécanismes de lymphomagénèse divers, et encore largement méconnus. Le développement de traitements plus efficaces repose sur une meilleure compréhension de leur physiopathologie.

La classification des hémopathies lymphoïdes a récemment été révisée (Swerdlow et al., 2016), avec un impact important sur les PTCLs. Plus de 25 entités de lymphomes T ou (natural killer) NK matures sont ainsi regroupées et classées selon leur présentation clinique principale, qu'elle soit ganglionnaire, extra-ganglionnaire ou leucémique (**Fig. 1**). Les lymphomes T d'origine T folliculaire helper, les lymphomes anaplasiques et les PTCLs non spécifiés (PTCL, NOS) font partie des PTCLs ganglionnaires. Les lymphomes extra-ganglionnaires regroupent les PTCL intestinaux primitifs, cutanés primitifs, et le lymphome T γδ hépato-splénique. Les lymphomes ou leucémies matures T et NK associés à l'Epstein-Barr virus (EBV) peuvent être classés à part. Enfin, les formes leucémiques de PTCLs regroupent 4 entités, dont les leucémies/lymphomes T de l'adulte associés à l'HTLV-1 (ATL).

Cette classification est basée sur l'origine cellulaire présumée de chaque hémopathie lymphoïde, dont l'identification repose sur une combinaison de caractéristiques cliniques, phénotypiques, cytogénétiques et moléculaires. L'expression des récepteurs NK (NKRs) a ainsi été recherchée principalement dans les hémopathies lymphoïdes matures T et NK, dont l'origine cellulaire est souvent peu claire. Il a été montré que les cellules pathologiques circulantes d'un lymphome T cutané primitif, le syndrome de Sézary, expriment un NKR appelé KIR3DL2, dont l'expression semble partagée par tous les lymphomes T cutanés primitifs (Battistella et al., 2017). Il a également été suggéré que KIR3DL2 pouvait parfois être exprimé par les cellules néoplasiques

d'ATL (Obama et al., 2007). En outre, un lymphome intra-épithélial intestinal, non reconnu dans la classification de l'OMS, appelé maladie coeliaque réfractaire de type II (MCRII), pourrait être dépendant de la sécrétion d'IL-15 qui semble entrainer la reprogrammation des lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) vers un phénotype NK cytotoxique pathologique (Malamut et al., 2010; Meresse et al., 2006; Schulthess et al., 2012). Les connaissances sur l'expression de NKRs par les autres PTCLs sont très parcellaires.

Ces constatations nous ont amenés à évaluer l'expression de NKRs sur un panel représentatif de PTCLs, constitué en particulier de PTCL primitifs intestinaux et d'ATL. Les résultats nous ont permis de discuter l'origine cellulaire de ces lymphomes et le rôle de ces NKRs dans la lymphomagénèse. Dans une optique translationnelle, l'expression de ces NKRs pourrait également aider au diagnostic de ces entités parfois difficiles à individualiser, et enfin constituer une cible thérapeutique intéressante.

Dans la suite de l'introduction, je développerai des notions actuelles sur l'origine cellulaire et la physiopathologie des ATL et des PTCLs primitifs intestinaux, ainsi que sur la classification et le rôle physiologique des NKRs ce qui me permettra d'aborder leur intérêt dans les PTCLs primitifs intestinaux (article 1) et dans l'ATL (article 2).

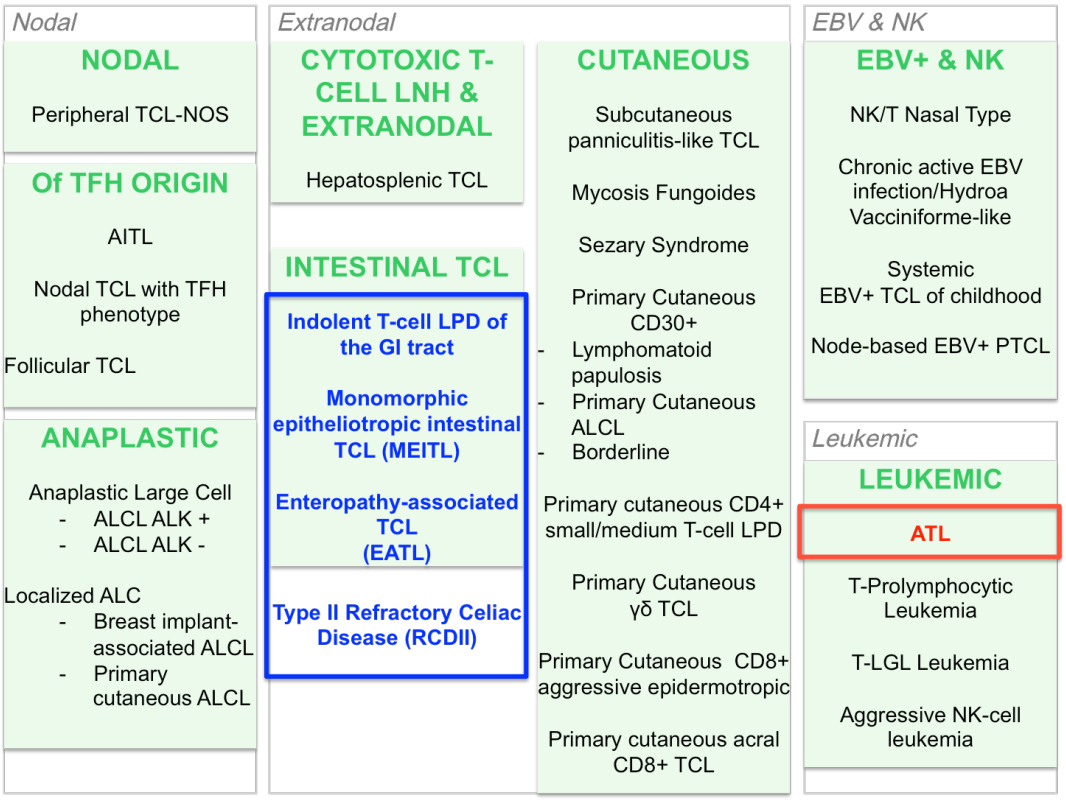


Figure 1 : classification des lymphomes T périphériques (PTCLs).
Plus de 25 entités de lymphomes T ou (natural killer) NK matures sont classés selon leurs caractéristiques clinique et biologiques. Les lymphomes T d'origine T folliculaire helper (TFH), commes les lymphomes T angio-immunoblastiques (AITL), les lymphomes anaplasiques (ALCL) et les PTCLs non spécifiés (PTCL, NOS) font partie des PTCLs ganglionnaires. Les lymphomes extra-ganglionnaires regroupent les PTCL intestinaux primitifs, cutanés primitifs, et le lymphome T γδ hépato-splénique. Les lymphomes T et NK associés à l'Epstein-Barr virus (EBV) peuvent être classés dans un groupe à part. Enfin, les formes leucémiques regroupent 4 entités, dont les leucémies/lymphomes T de l'adulte associés à l'HTLV-1 (ATL). En outre, une prolifération lymphoïde monoclonale non reconnue dans la classification de l'OMS, appelé sprue réfractaire de type II (MCRII ou RCDII en anglais) a été identifiée récemment comme un vrai lymphome intra-épithélial intestinal. D'après *Swerdlow et al., Blood, 2016.*

EXEMPLES DE DEUX LYMPHOMES T PERIPHERIQUES RARES

A. LEUCÉMIES/LYMPHOMES T DE L'ADULTE ASSOCIÉS À L'HTLV-1

1. Epidémiologie, formes cliniques, traitement et pronostic

Les lymphoproliférations T associées à l'HTLV-1 sont des hémopathies agressives caractérisées par l'expansion clonale de lymphocytes T (LT) CD4+ infectés par le rétrovirus HTLV de type 1. L'HTLV1 est le premier rétrovirus infectant l'homme à avoir été isolé par l'équipe de Robert Gallo en 1980 aux USA, son lien avec la lymphoprolifération date de cette époque. L'infection par l'HTLV-1 touche environ 5 à 10 millions de personnes dans le monde mais seuls 5% des individus infectés développent une hémopathie (Gessain and Cassar, 2012). Les hémopathies associées à HTLV-1 sont regroupées sous l'acronyme ATL (Adult T-cell Leukemia/Lymphoma).

L'épidémiologie des ATL recoupe les zones d'endémie d'infection par l'HTLV-1, comme le Japon où environ 1,1 millions de japonais sont porteurs de l'HTLV-1 (Satake et al., 2012), les Caraïbes, l'Amérique du Sud et l'Amérique Centrale, l'Afrique sub-saharienne (Ishitsuka and Tamura, 2014). La région de Kyushu, les îles Okinawa mais aussi la population des Aïnous à Hokkaido, ont une prévalence particulièrement importante d'infection HTLV-1 au Japon. La transmission de l'HTLV-1 se fait principalement par l'allaitement maternel. L'existence d'une transmission horizontale principalement sexuelle a été sous-estimée, mais semble en fait relativement importante, comme l'a montré une étude japonaise de donneurs de sang qui a estimé le nombre de nouvelles infections par l'HTLV-1 à 4190 par an, avec une proportion particulièrement importante de femmes touchées (Satake et al., 2016). Le risque de développer un ATL chez des porteurs de l'HTLV-1 a été estimé à 6-7%

chez les hommes et 2-3% chez les femmes après un temps de latence prolongé (Watanabe, 2017). Le développement d'un ATL se fait plus précocement chez les porteurs d'HTLV-1 en Amérique du Sud et dans les Caraïbes (environ 40 ans) qu'au Japon (environ 60 ans) sans que l'on comprenne les raisons de ces variations (Pombo de Oliveira et al., 1995). Au Japon, dans les zones d'endémie d'HTLV-1, jusqu'à 40% des lymphomes matures sont des ATL, entrainant environ 1000 décès annuels (Watanabe, 2017).

Les ATL se répartissent en formes agressives et indolentes, les formes agressives étant caractérisées par des LDH élevées et une hypercalcémie presque toujours présente. Ainsi la classification de Shimoyama, distingue les formes indolentes (chronique « chronic » ou smoldering) et les formes agressives leucémisée (aiguës, « acute ») ou non (lymphome, « lymphoma ») (Shimoyama, 1991) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Atteintes cliniques et biologiques des différentes formes d'ATL, selon la classification de Shimoyama. Lympho : lymphocytes sanguins ; LT : % de lymphocytes T évalué en cytologie.

Formes d'ATL	**INDOLENTES**		**AGRESSIVES**	
	Smoldering	**Chronique**	**Lymphome**	**Aiguë**
Sang	Lympho < 4G/L LT tum ≥ 5%	Lympho ≥ 4G/L LT tum ≥ 5%	Lympho < 4G/L LT tum ≤ 1%	LT tum ≥ 5%
Ganglions	-	+/-	+++	+/-
Autres	+/- (peau)	+/- (peau, ganglions, foie)	+	+/-
LDH	≤ 1,5N	< 2,5N	élevées	élevées
Calcémie	normale	normale	élevée	élevée

Le pronostic de ces formes agressives est très péjoratif avec une médiane de survie de 8,3 mois pour les formes « acute » et de 10,6 mois pour les formes « lymphoma ». Le pronostic des formes indolentes, bien que meilleur, reste mauvais avec une médiane de survie de 30,3 et 36,7 mois pour les formes « chronic » et « smoldering » (Katsuya et al., 2015) (**Fig. 2**). Le traitement des formes agressives a fait l'objet d'un consensus

international qui propose l'utilisation d'une combinaison de chimiothérapies intensives, ou de l'association de zidovudine et interféron α (AZT/IFN-α) en cas de forme aiguë (Tsukasaki et al., 2009; Utsunomiya et al., 2015), l'association AZT/IFN-α n'étant efficace que dans les formes « acute » mais pas dans les formes « lymphoma » sans que cela soit expliqué. Une consolidation rapide par greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques est recommandée chez les patients jeunes en rémission au moins partielle, avec des survies à 4 ans de 26% dans une étude japonaise récente (Katsuya et al., 2015). De plus, une greffe allogénique réalisée précocement, dans les 3 mois qui suivent le diagnostic de l'ATL, améliore le pronostic (Fuji et al., 2017). Des thérapies ciblées, principalement des anticorps monoclonaux ont également été proposées. Le mogalizumab dirigé contre CC chemokine receptor 4 (CCR4) a ainsi montré des taux de réponse globale aux alentours de 30% chez des patients en rechute ou réfractaires (Ishida et al., 2012). Néanmoins, son association avec une chimiothérapie intensive en première ligne n'améliore pas la survie par rapport à un traitement par chimiothérapie seule (Ishida et al., 2015). Le brentuximab vedotin, un anticorps monoclonal dirigé contre CD30 associé à un agent cytotoxique, pourrait être intéressant dans les formes agressives positives pour CD30. Le lenalidomide a montré des taux de réponse globale intéressant (42%) chez des patients en rechute mais avec une survie sans progression médiocre (3,8 mois) (Ishida et al., 2016). Le trioxyde d'arsenic qui est capable de dégrader Tax et d'induire des réponses dans un modèle murin transgénique pour Tax qui développe une lymphoprolifération T mature (Hajj et al., 2010), a été évalué dans des formes indolentes avec quelques réponses sans que le suivi des patients ait été suffisant pour pouvoir conclure à son efficacité (Kchour et al., 2009). Les inhibiteurs des histones déacétylases ou de EZH2 pourraient également être intéressants et sont actuellement en cours d'essai.

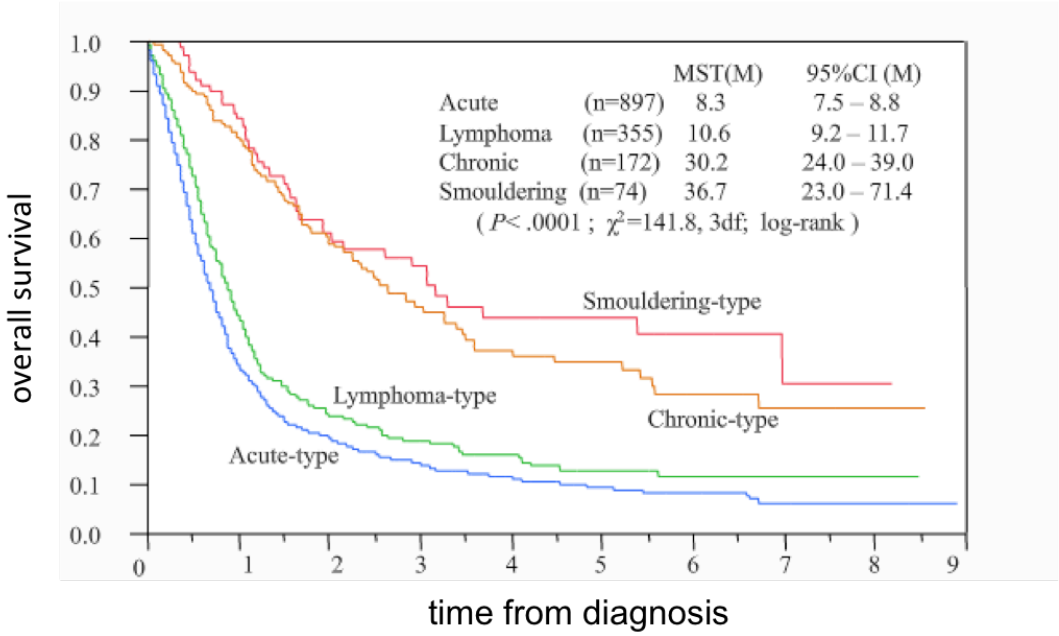


Figure 2 : Survie globale selon la forme clinique de l'ATL. *Katsuya et al., Blood, 2015.*

2. *Physiopathologie de l'ATL*

La physiopathologie de l'ATL associe un premier événement, représenté par l'infection et l'intégration HTLV-1, suivi de l'échappement immunitaire des cellules infectées, et de l'accumulation secondaire progressive d'évènements oncogéniques (**Fig. 3**). Ce schéma simplifié permet d'expliquer la longue latence entre l'infection par l'HTLV-1 et le développement d'un ATL. Il souligne en outre que l'infection HTLV-1 n'est pas capable à elle seule d'induire un ATL.

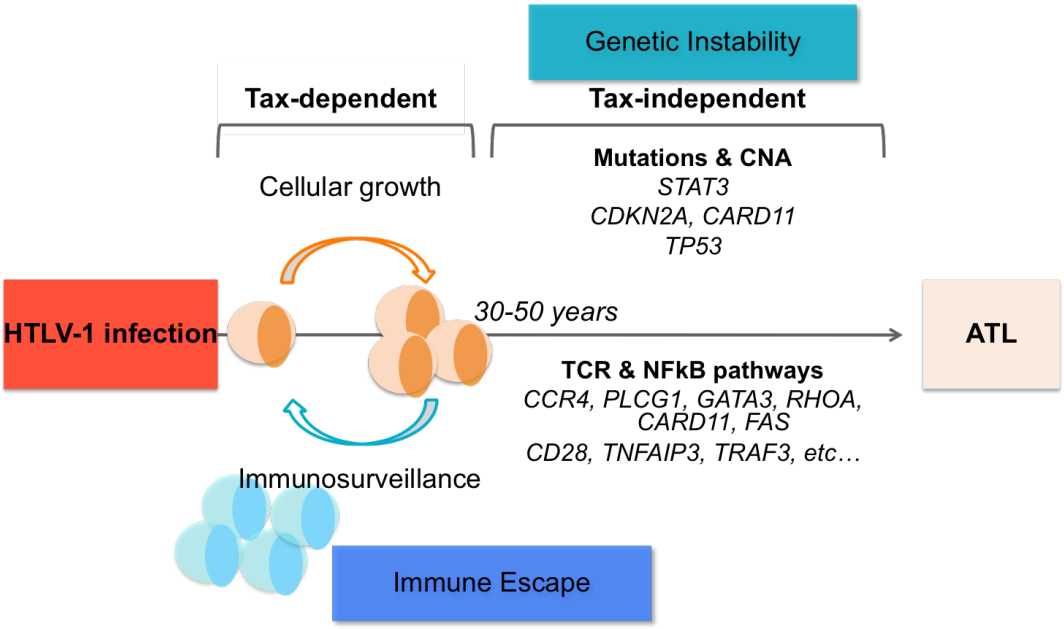


Figure 3 : Schéma résumant la physiopathologie de l'ATL. Celle-ci associe un événement lié à l'infection et l'intégration de l'HTLV-1, suivi d'un échappement immunitaire des cellules infectées et l'accumulation d'évènements oncogéniques aboutissant après une latence prolongée au développement d'un ATL.

Premier événement : rôle de l'HTLV-1 et de la protéine virale Tax

HTLV-1 est un rétrovirus enveloppé contenant deux copies identiques d'ARN simple brin de 8,5 kb chacune. Comme d'autres rétrovirus, la séquence virale d'HTLV-1 est composée de deux séquences répétées à chaque extrémité qui génèrent, après rétrotranscription et intégration du provirus à l'ADN de l'hôte, les séquences LTR (long terminal repeats). Le génome viral comprend également des gènes *gag*, *pol* et *env* et une séquence supplémentaire (*pX*) codant pour les protéines p12, p13, and p30, Rex, et Tax (Kannian et al., 2013). Rapidement après l'infection par HTLV-1, il existe une transcription virale qui va disparaître en raison du développement d'une réponse immunitaire. Le provirus peut néanmoins persister dans les PBMC et les organes lymphoïdes secondaires qui constitueraient donc le réservoir de l'HTLV-1, et se répliquer par intermittence (Kazanji et al., 2000). La multiplication du virus se fait ensuite par expansion clonale des lymphocytes infectés. Chez un même patient, le nombre de clones différents est donc le reflet de la réplication virale. L'HTLV-1 n'a

pas d'activité transformante directe sur la cellule hôte. Les sites d'intégration du provirus sont extrêmement variables d'une tumeur à l'autre (Cook et al., 2014; Gillet et al., 2011), même si chaque clone lymphocytaire ne contient qu'un seul site d'intégration (Cook et al., 2014). Il a donc longtemps été pensé que l'intégration du génome viral n'induisait pas de mutagenèse insertionnelle (effet cis-activateur). Il était ainsi admis que l'oncogénèse était principalement dépendante de l'expression des protéines virales Tax et HBZ. Récemment il a néanmoins été montré que le provirus s'insérait dans des régions de l'ADN cellulaire où grâce à sa capacité à être reconnu par CTCF, il induisait des changements conformationels de la chromatine entrainant la formation de transcrits de fusion avec des gènes situés à distance du site d'intégration. Certains de ces transcrits pourraient être des oncogènes ou au contraire des anti-oncogènes ayant perdu leur fonction, qui pourrait ainsi entrainer un défaut d'apoptose ou la prolifération de multiples clones cellulaires (Rosewick et al., 2017). Il reste à établir si la formation de ces transcrits anormaux ou si les sites d'intégration peuvent déterminer directement la transformation tumorale ou s'ils permettent simplement l'expansion et l'immortalisation de clones dont la survie prolongée permettrait l'accumulation d'évènements oncogéniques secondaires.

Le rôle de Tax dans la transformation tumorale reste bien documenté. Tax est une protéine virale de 40kDa, comportant un domaine en doigt de zinc qui lui permet d'interagir avec la protéine CREB, un domaine central d'interaction avec la protéine NEMO qui appartient à la voie NF-κB, et un domaine PDZ en C-terminal. Tax peut ainsi immortaliser des lymphocytes *in vitro* et induire des hémopathies lymphoïdes chez des souris transgéniques, avec un temps de latence long (Azran et al., 2004; Hasegawa et al., 2006; Niewiesk, 2016). De plus Tax est impliqué dans la modulation de gènes cellulaires entrainant la prolifération des LT, principalement via l'activation des facteurs de transcription NF-kB et CREB (cAMP response element-binding protein) (Matsuoka and Jeang, 2011; Sun and Yamaoka, 2005). Les cellules exprimant Tax ont des anomalies des checkpoints du cycle cellulaire, des mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN et des voies d'apoptose, ce qui entraine l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques (Nicot, 2015). Il a ainsi été montré que, précocement après l'infection HTLV-1, Tax activait la transcription de

composants du PRC2 (polycomb-repressive complex 2), principalement EZH2 (enhancer of zeste homolog 2), entrainant une altération globale de la méthylation de l'histone H3Lys27 (H3K27me3) (Fujikawa et al., 2016). Ces anomalies ne sont pas dues à des mutations de EZH2 comme cela est le cas dans d'autres hémopathies lymphoïdes, mais sont directement liées à Tax. En effet, la transduction de Tax dans des LT normaux induit les mêmes anomalies épigénétiques, ce qui n'est pas le cas des autres protéines virales. Cependant l'hyperexpression de EZH2 est aussi induite par la stimulation des molécules de co-stimulation des lymphocytes T, ce qui pourrait expliquer pourquoi elle reste hyperexprimée même dans les phases terminales de la maladie où Tax n'est plus exprimée (DuPage et al., 2015). Les formes indolentes d'ATL comme les formes agressives ont la même signature épigénétique de PRC2, liée à l'expression de EZH2. Il a donc été proposé qu'un programme épigénétique de transformation leucémique soit acquis très précocement dans l'histoire de l'infection par HTLV-1, et dépendrait de Tax (Fujikawa et al., 2016).

Deuxième événement : échappement immunitaire

En dépit des nombreux travaux démontrant le potentiel oncogénique de Tax, il n'est pas certain que le développement et/ou le maintien d'un ATL soit dépendant de Tax. En effet, malgré l'existence d'une « signature Tax », son expression protéique ou en ARN messager est faible voire absente *in vivo* dans les cellules d'ATL (**Fig. 4A**) (Hanon et al., 2000; Takeda et al., 2004; Tamiya et al., 1996). Ainsi l'expression de Tax n'est retrouvée que dans 14 des 41 ATL évalués en RT-PCR (Takeda et al., 2004), et un seul cas sur 50 évalués en RNA-Seq (Kataoka et al., 2015). De plus, le provirus HTLV-1 ou le gène *Tax* a fréquemment subi des altérations génétiques, des mutations ou des anomalies de méthylation impliquant la perte de son expression dans les clones d'ATL (**Fig. 4B**). Seuls la moitiés des cas d'ATL étudiés pourrait donc théoriquement exprimer Tax (Cook et al., 2014; Taniguchi et al., 2005). Cette perte d'expression de Tax semble nécessaire à un échappement immunitaire des cellules tumorales, puisqu'il existe une immunité anti-Tax avec des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dirigés contre Tax chez les patients porteurs d'un ATL (Bangham, 2003; Harashima et al., 2004; Jacobson et al., 1990; Kannagi et al., 2012). Pourtant, la survie des cellules d'ATL reste dépendante de l'expression de Tax, les traitements ciblant Tax

ayant une efficacité anti-leucémique *in vivo* (Dassouki et al., 2015; Suehiro et al., 2015). On sait en outre que la culture *ex vivo* de cellules d'ATL induit l'expression du génome viral en quelques heures dans environ 50% des cas (Kurihara et al., 2005; Tochikura et al., 1985; Umadome et al., 1988). Par ailleurs, Tax semble exprimé dans une petite fraction du pool de cellules MT-1 (0,05-3%), une lignée cellulaire qui est connue pour exprimer le même niveau de Tax que les cellules primaires d'ATL (Usui et al., 2008). Cette expression est sporadique avec un effet on-off spontané, et inductible sous l'effet de plusieurs stress cellulaires. La suppression de Tax dans la lignée MT-1 est capable d'induire l'apoptose de tout le pool cellulaire, prouvant que l'expression de Tax est critique pour la survie tumorale, même en n'étant exprimé que par un nombre minime de cellules. Cette expression transitoire de Tax induit une machinerie anti-apoptotique, protégeant ainsi les cellules infectées et permettant une transmission virale (Mahgoub et al., 2018). Il a donc été proposé que Tax puisse être nécessaire à l'initiation de la lymphomagénèse à un stade précoce après l'infection HTLV-1. La mise en place d'une immunité efficace dirigée contre Tax empêcherait le développement des cellules tumorales. L'échappement immunitaire permis par la perte d'expression de Tax serait donc le deuxième événement conduisant au maintien de cellules infectées.

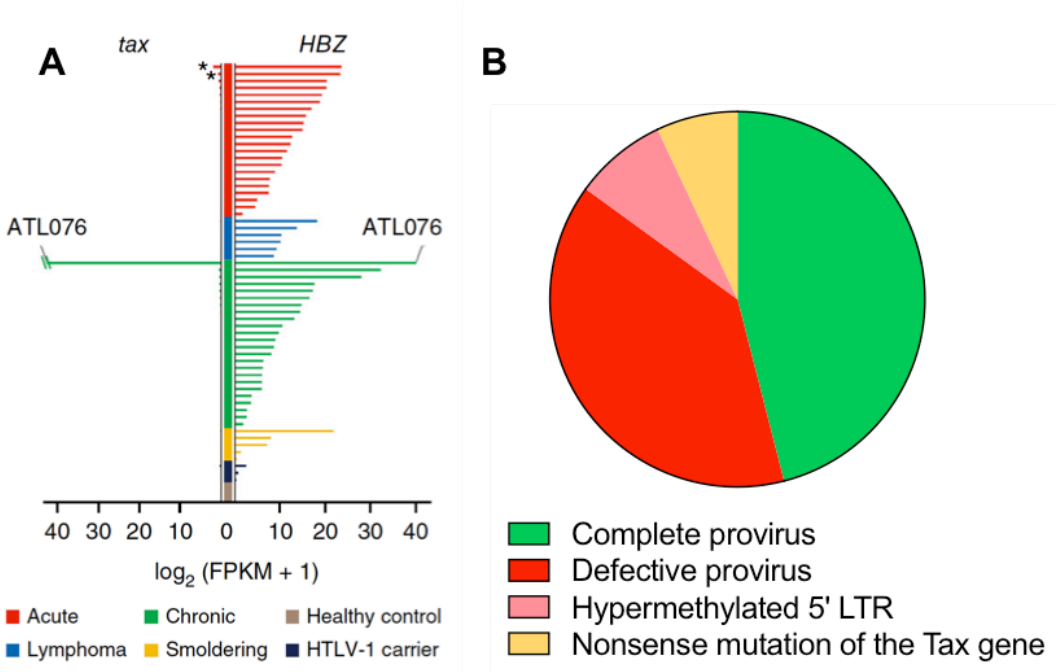


Figure 4 : Profil génétique de l'HTLV-1 et profil d'expressions de Tax et HBZ dans les cellules primaires d'ATL. A. Expressions des ARN messagers de Tax et HBZ dans des LT CD4+ de contrôles sains (n=3), de porteurs asymptomatiques de l'HTLV-1 (n=3), et d'ATL (n=57), analysées en RNA-seq. *Kataoka et al., Nature Genetics, 2015*. **B**. Analyse de la structure du provirus HTLV-1 dans 197 échantillons d'ATL. D'après *Cook et al., Blood, 2014*.

Troisième événement : accumulation d'évènements oncogéniques

La survie prolongée des cellules infectées permettrait l'accumulation d'évènements génétiques secondaires. De plus, Tax induit une instabilité génétique en entrainant des dommages directs et en bloquant les mécanismes de réparation de l'ADN (Matsuoka and Jeang, 2011). En revanche, le nombre de mutations génétiques identifiées dans les ATL est équivalent à celui des lymphomes B diffus à grandes cellules (Kataoka et al., 2015; Lawrence et al., 2013). Schématiquement, les évènements identifiés, qui touchent principalement les voies de signalisation du TCR et de NF-kB ou des gènes impliqués dans l'échappement au système immunitaire, sont également similaires à ceux retrouvés dans les autres hémopathies lymphoïdes (Kataoka et al., 2015; Watanabe, 2017). L'architecture clonale des ATL indolents, mise en évidence par l'étude de l'intégration virale, est caractérisée par l'existence de plusieurs clones. En

revanche, les formes agressives d'ATL sont secondaires à la prolifération d'un clone principal avec un site d'intégration viral unique (Bangham et al., 2014; Cook et al., 2014; Gillet et al., 2011). Grâce à l'identification des sites d'intégration virale des différents clones présents chez un même patient, il a été montré que la progression linéaire d'un pool polyclonal vers un clone unique responsable de l'ATL était une image simplifiée de la physiopathologie de l'ATL. En effet, le clone majoritaire est souvent associé à de multiples sous-clones (Gillet et al., 2011). En outre, les rechutes ne sont pas toujours le fait du clone d'ATL initial (Tsukasaki et al., 1997).

3. Origine cellulaire présumée de l'ATL

L'origine cellulaire des ATL est discutée. Un premier modèle de lymphomagénèse propose que des évènements oncogéniques puissent s'accumuler dans des populations cellulaires ayant une longue durée de vie, comme les cellules souches hématopoïétiques, transformant ainsi ces cellules en cellules initiatrices de l'hémopathie. Dans les hémopathies lymphoïdes néanmoins, la durée de vie prolongée des lymphocytes et le phénotype mature suggèrent une origine cellulaire dans une population lymphocytaire mature particulière, même s'il est possible que l'événement initiateur ait lieu dans un progéniteur hématopoïétique (Nagata et al., 2016). Dans l'ATL, il n'a pas pu être montré d'intégration HTLV-1 dans les cellules souches hématopoïétiques ou dans des progéniteurs lymphoïdes, confortant la seconde hypothèse (Nagai et al., 2015). En outre, le phénotype des ATL est de type LT mémoire avec un trou phénotypique sur CD7. Les cellules tumorales expriment CD4, Foxp3 et CD25, ce qui a conduit à faire l'hypothèse d'une origine LT régulatrice (Karube et al., 2004; Roncador et al., 2005). Cependant, ces caractéristiques phénotypiques peuvent être acquises à la suite de l'infection par le virus (Zhao et al., 2011), et l'expression de Foxp3 est hétérogène au sein du pool tumoral. De plus, les cellules d'ATL sont capables d'induire la prolifération comme d'inhiber certaines fonctions des LT conventionnels par des mécanismes incompris qui passeraient en partie par la synthèse de cytokines et par des interactions intercellulaires directes (Abe et al., 2008). Récemment, une étude japonaise a mis en évidence une population cellulaire T souche mémoire ayant intégré HTLV-1 et

caractérisée par des propriétés de cellule inductrice de leucémie, chez les patients infectés asymptomatiques (AC) et chez les patients avec un ATL. Les auteurs montrent que le nombre de LT mémoires CD45RO+ (LT centraux mémoires et LT effecteurs mémoires T_{CM}+T_{EM}) et de LT souches mémoires CD45RA+ (T_{SCM}) est augmenté dans les ATL de forme chronique ou aiguë (Nagai et al., 2015). Toutes ces sous-populations lymphocytaires ont intégré le provirus HTLV-1, contrairement aux cellules T naïves (T_N). Seuls les lymphocytes T_{SCM} sont capables d'engendrer une lymphoprolifération ayant le même clone que l'ATL du patient, après xénogreffe à des souris immunodéficientes (Nagai et al., 2015). Ces lymphocytes T_{SCM} CD45RA+ CD45RO- CCR7+ CD27+, représentant 2 à 4% des LT CD4+ et CD8+, sont caractérisés par des capacités d'auto-renouvellement, de différenciation en lymphocytes T_{CM} et T_{EM} (Gattinoni et al., 2011) et sont capables d'une activité effectrice en réponse à une stimulation médiée par le TCR. Ils ont en outre été identifiés comme un réservoir du VIH-1 (Buzon et al., 2014). Ils pourraient donc constituer la cellule d'origine de l'ATL, malgré une expression aberrante de CD45RO par les cellules tumorales (Nagai et al., 2015).

B. LYMPHOPROLIFERATIONS T INTESTINALES PRIMITIVES

1. Classification et description des lymphoproliférations T gastro-intestinales

Les lymphoproliférations T gastro-intestinales (T-LPD GI) primitives sont un groupe de pathologies hétérogènes, allant de lymphoproliférations polyclonales secondaires à un processus dysimmunitaire comme la maladie coeliaque (MC), jusqu'à des lymphomes agressifs. Le diagnostic de ces pathologies est difficile et repose actuellement sur l'intégration de données cliniques et d'analyses biologiques poussées. Les caractéristiques de chacun de ces lymphomes sont rappelées dans le **tableau 2**.

Type	Clinique	Histologie (morphologie)	Phénotype	Réarrangement du *TCRγ*	Cytogénétique	Mutations récurrentes	Origine cellulaire présumée
EATL	Associé à la MC (HLA DQ2/DQ8) Agressif AEG Perforation intestinale	Destruction de l'architecture Pléomorphe Grandes cellules Nécrose	CD3+ CD8+/- CD56- CD30+ TCR double-négatif (62%) TCRαβ (15%) TCRγδ (10%)	monoclonal	+ 9q31.3 - 16q12.1	*JAK1/STAT3* RAS pathway *(BRAF, NRAS, KRAS)*	LIE « de type inné » iCD3+ CD103+
MEITL	Plus fréquent en Asie Non associé à l'EBV Agressif AEG Perforation intestinale	Destruction de l'architecture Epithéliotropisme Monomorphe Cellules de taille petite à moyenne	CD3+ CD8+ CD56+ MATK+ SYK+ TCRγδ (50%) TCRαβ (25%) TCR double-négatif (10%)	monoclonal	+ 8q24 + 1q + 5q	*SETD2* LOF (93%) *STAT5B* (60%) *JAK3* (50%) *SH2B3* (20%) RAS pathway *(BRAF, NRAS, KRAS)* *CREBBP*	LIE Tγδ
Indolent T-LPD	Indolent Douleur abdominale Diarrhées Malabsorption	Pas de destruction de l'architecture Infiltrat du chorion Cellules de taille petite	CD4+ ou CD8+ CD30- CD56- TCRαβ	monoclonal	Inconnu	Inconnu	LTαβ conventionnel du chorion
Gastropathie lymphomatoïde	Non associé à l'EBV Indolent Douleur abdominale	Infiltrat du chorion sans épithéliotropisme Cellules de taille petite	iCD3+ CD56+ TIA-1+ Granzyme B+	polyclonal			Lymphocyte NK
MCRII	Douleur abdominale Diarrhées Malabsorption	Atrophie villositaire LIE > 30/100 CE	LIE CD3+CD8- > 50% des LIE (IHC) ou >25% sCD3- des CD45+ (CMF) CD30- CD103+ TCR double-négatif (80%) TCRγδ (rare) TCRαβ (très rare)	monoclonal	Trisomie 1q	*JAK1/STAT3*	LIE « de type inné » iCD3+ CD103+
MCRI	Douleur abdominale Diarrhées Malabsorption	Atrophie villositaire LIE > 30/100 CE	LIE CD3+CD8+	polyclonal			LIE T CD8 conventionnel
MC	Douleur abdominale Diarrhées Malabsorption	Atrophie villositaire LIE > 30/100 CE	LIE CD3+CD8+	polyclonal			LIE T CD8 conventionnel

EATL : lymphome T intestinal associé à une entéropathie ; MEITL : lymphome T monomorphe épithéliotrope intestinal; Indolent T-LPD : lymphoprolifération T gastro-intestinale indolente ; MCRI et MCRII : maladies coeliaques réfractaires de type I et II ; MC : maladie coeliaque ; AEG : altération de l'état général ; EBV : virus Epstein-Barr ; LIE : lymphocytes intra-épithéliaux ; CE : cellules épithéliales ; IHC : immunohistochimie ; CMF : cytométrie de flux ; sCD3 : CD3 de surface ; iCD3 : CD3 intra-cellulaire ; LOF : perte de fonction ; LT : lymphocyte T ; NK : lymphocyte natural killer

Lymphome T associé à une entéropathie et lymphome T monomorphe épithéliotrope intestinal

Les T-LPD GI comprennent deux lymphomes extrêmement agressifs, le **lymphome T associé à une entéropathie (EATL)** et le **lymphome T monomorphe épithéliotrope intestinal (MEITL)**, qui sont marqués par des survies à 5 ans inférieures à 20% malgré des traitements intensifs (Nijeboer et al., 2015a). Ils ont été bien individualisés lors de la révision récente de la classification OMS (Delabie et al., 2011; Swerdlow et al., 2016). La présentation clinique est similaire dans les deux cas, bruyante avec de la fièvre, une altération de l'état général, des douleurs abdominales voire une perforation digestive. L'atteinte est généralement localisée au tube digestif préférentiellement duodénale et iléale. L'EATL est un lymphome rare (3,76% des lymphomes T) (Laurent et al., 2017), classiquement associé à la MC contrairement au MEITL. Le MEITL a une incidence plus importante en Asie et reste rare en Europe et aux Etats-Unis d'Amérique (Delabie et al., 2011). Histologiquement, la prolifération tumorale détruit l'architecture normale de l'intestin et est composée de cellules lymphoïdes pléomorphes et de grande taille dans l'EATL alors que l'aspect est monomorphe et les cellules de taille petite à moyenne dans le MEITL avec un épithéliotropisme marqué (**Fig. 5**). L'EATL exprime plus souvent CD30 alors que le MEITL exprime CD8 et CD56 dans une plus forte proportion de cas (Delabie et al., 2011). Les deux lymphomes ont un phénotype cytotoxique et expriment typiquement l'intégrine αE(CD103)β7 retrouvée normalement sur les lymphocytes intra-épithéliaux digestifs (LIE), même s'il a été suggéré que la transformation en EATL pouvait être accompagnée d'une perte de cet antigène. De plus, contrairement à l'EATL, le MEITL est également caractérisé par une forte surexpression de SYK, une tyrosine kinase reliée à ZAP-70, pouvant être responsable d'une activation de la voie du TCR (Mutzbauer et al., 2018). L'EATL exprime rarement un TCR fonctionnel, qui, s'il est présent, est plutôt de type αβ (Mutzbauer et al., 2018) alors que le MEITL exprime plus fréquemment un TCRγδ (Chan et al., 2011). Récemment, plusieurs travaux se sont attachés à décrire les anomalies génétiques récurrentes des MEITL. Il a ainsi été montré que le MEITL était caractérisé par une perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *SETD2*, qui code pour une trimethyltransferase H3K36 (Moffitt et al., 2017; Roberti et al., 2016). Par ailleurs, des mutations de la voie de signalisation

JAK/STAT et particulièrement de *STAT5B* et *JAK3* ont été retrouvées (Küçük et al., 2015; Nairismägi et al., 2016). A l'inverse, la triméthylation H3K36 est préservée dans l'EATL. Le profil mutationnel de l'EATL est moins bien décrit mais il semble que la voie de signalisation JAK/STAT soit également impliquée avec des mutations récurrentes de *JAK1* et *STAT3* (Nicolae et al., 2016; Roberti et al., 2016).

Lymphoprolifération T indolente gastro-intestinale

A côté de ces lymphomes agressifs, les lymphoproliférations intestinales comprennent une entité moins sévère, appelée **lymphoprolifération T indolente gastro-intestinale (LPD T indolente)** qui a été individualisée plus récemment (Carbonnel et al., 1999; Malamut et al., 2014; Margolskee et al., 2013; Perry et al., 2013; Svrcek et al., 2007) et reste une entité provisoire dans la classification OMS révisée (Swerdlow et al., 2016). Les cellules tumorales sont de petite taille et infiltrent densément le chorion sans détruire l'architecture normale de l'intestin. Elles expriment CD4 ou parfois CD8 et ont un réarrangement monoclonal du TCR. Le profil génétique de cette entité est mal décrit.

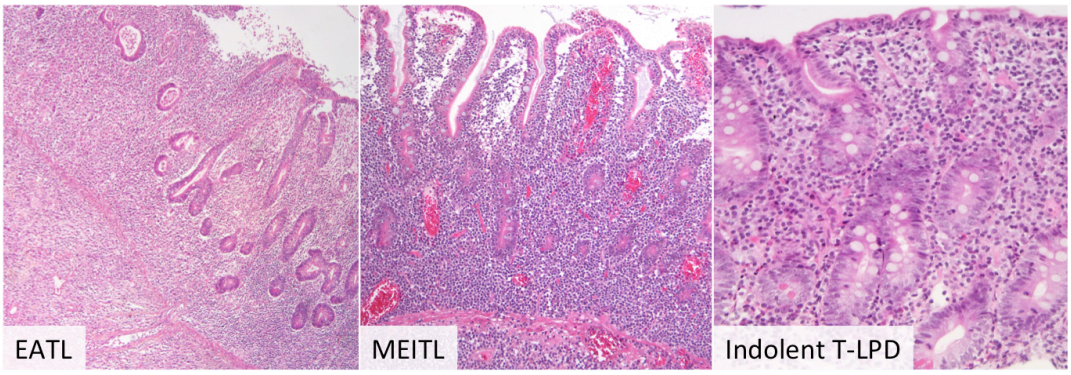


Figure 5: Caractéristiques histologiques des lymphomes T primitifs intestinaux. Une prolifération de grandes cellules pléomorphes détruit l'épithélium intestinal dans le lymphome T primitif intestinal associé à une entéropathie (EATL). Le lymphome T monomorphe épithéliotrope intestinal (MEITL) est marqué par un épithéliotropisme de cellules tumorales lymphoïde monomorphes de taille petite à moyenne. Dans la lymphoprolifération T indolente (indolent T-LPD), les cellules tumorales sont de petite taille, infiltrent le chorion et, classiquement, ne détruisent pas l'architecture normale intestinale. *Images fournies par J. Bruneau, Hôpital Necker.*

Maladie coeliaque réfractaire de type II

Enfin, un lymphome intra-épithélial de bas grade, nommé sprue réfractaire ou **maladie coeliaque réfractaire de type II (MCRII)**, a été décrit au cours de l'évolution de la MC (**Fig. 6**). La prévalence de la MC est proche de 1 % avec des variations pouvant aller de 0,3 à près de 5 à 10 %. Le traitement repose sur l'éviction du gluten, responsable d'une activation dysimmunitaire chronique chez des individus génétiquement prédisposés en raison d'un HLA particulier (HLA DQ2, HLA DQ8). Chez un petit nombre de patients coeliaques adultes (évalué entre 2 et 10% des MC), l'éviction du gluten pendant un an ne suffit pas à entrainer la guérison, définissant ainsi la maladie coeliaque réfractaire (MCR). Deux types de MCR sont décrits, qui correspondent à deux processus physiopathologiques bien distincts. La MCR de type I (MCRI) est une pathologie polyclonale dont la définition est exclusivement clinique (résistance à un régime sans gluten bien conduit supérieur à 1 an). Histologiquement et phénotypiquement, l'aspect est strictement identique à la MC avec une atrophie villositaire associée à une lymphocytose T TCRαβ+ CD8+ intra-épithéliale. A l'inverse, la MCRII est une lymphoprolifération monoclonale de lymphocytes intra-épithéliaux (LIE). L'évolution est réputée indolente mais les survies rapportées sont de l'ordre de 50% à 5 ans, les décès étant principalement liés aux infections dans un contexte de malabsorption, ou aux transformations vers un EATL (Malamut et al., 2009, 2013; Rubio-Tapia et al., 2009). Cette évolution péjorative semble favorisée par l'utilisation d'immunosuppresseurs. Histologiquement, l'aspect morphologique de la MCRII est similaire à une MC non compliquée ou à une MCRI avec une atrophie villositaire et une augmentation du nombre de LIE supérieur à 30 pour 100 cellules épithéliales (CE). Le phénotype des LIE permet de différencier la MCRII des MC non compliquées et des MCRI. En effet, les LIE de la MCRII expriment typiquement CD3 mais pas CD8 dans plus de 50% des LIE en immunohistochimie. La cytométrie de flux, réalisée sur LIE triés à partir de biopsies intestinales fraiches, permet d'identifier la population anormale de LIE exprimant CD3 en intra-cellulaire (iCD3+), CD103 mais pas CD8 dans plus de 25% des LIE CD45+. Le diagnostic différentiel des ces pathologies est difficile et il est probable que l'incidence des MCRII soit sous-évaluée. C'est la raison pour laquelle a été mise au point, dans le cadre du réseau CELAC (Centre Expert des Lymphomes Associés à la Maladie Coeliaque), une approche

diagnostique combinant les données cliniques, histologiques, de biologie moléculaire et de cytométrie de flux réalisée après tri des LIE sur biopsies digestives fraiches. Néanmoins cette approche demande du temps, et la cytométrie de flux n'est disponible que dans quelques centres spécialisés.

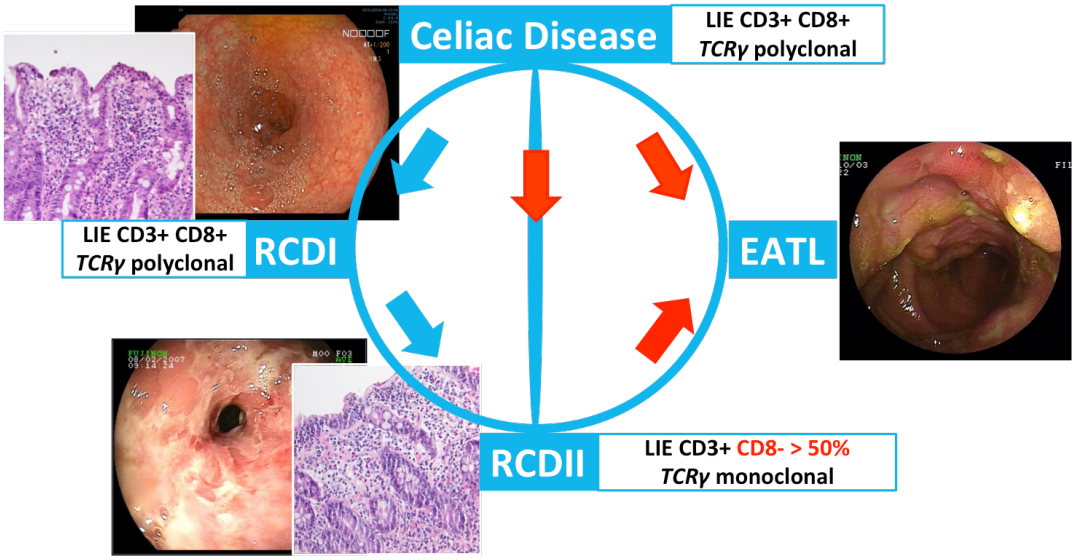


Figure 6 : Critères histopathologiques, immunophénotypiques et moléculaires des diagnostics des maladies coeliaques réfractaires de type 1 et de type 2 (RCDI et RCDII), et du lymphome T primitif intestinal associé à une entéropathie (EATL). D'après *Cellier et al., The Lancet, 2000.*

Lymphoprolifération NK gastrique indolente

Il a par ailleurs été décrit, principalement au Japon, des cas de **lymphoprolifération NK gastriques indolentes**, mimant un lymphome NK/T mais non associés au virus Epstein-Barr (EBV) (Ishibashi et al., 2013; Mansoor et al., 2011; Takata et al., 2015; Takeuchi et al., 2010). C'est une entité bénigne sans réarrangement monoclonal du TCR, parfois appelée gastropathie lymphomatoïde ou entéropathie à cellules NK. Les cellules lymphoïdes expriment CD3 en intra-cellulaire, CD56 mais n'expriment pas CD4 ou CD8. L'évolution clinique est bonne avec des régressions parfois spontanées.

2. *Physiopathologies et origines cellulaires présumées des lymphoproliférations T gastro-intestinales*

Généralités sur les lymphocytes intestinaux physiologiques

Les lymphocytes intestinaux sont de type inné ou adaptatif. Les lymphocytes adaptatifs dérivent de LT conventionnels CD4+ ou CD8+ et expriment un TCRαβ. Une grande variété de cellules lymphoïdes innées ou de type inné réside également dans le tube digestif. Elles comprennent des cellules NK, des cellules lymphoïdes innées (ILCs), des LT exprimant un TCRγδ (LTγδ), des cellules NKT, et des LT invariants associés aux muqueuses (MAIT).

Parmi les lymphocytes intestinaux, les LIE sont spécialisés dans l'homéostasie intestinale et expriment CD103 (Cerf-Bensussan et al., 1987), une intégrine αE impliquée dans l'interaction avec une E-cadhérine exprimée par les cellules épithéliales intestinales (**Fig. 7**). La plupart des LIE exprime des NKRs activateurs ou inhibiteurs qui jouent un rôle seuls, ou en association avec le TCR.

Les **LIE adaptatifs ou conventionnels** sont caractérisés par un répertoire TCRαβ, oligoclonal chez l'adulte, probablement induit par la colonisation microbienne (Probert et al., 2007). Ils dérivent principalement de LT TCRαβ+ CD8+ impliqués dans la reconnaissance du non-soi présenté par le CMH de classe I. Ils représentent la majeure partie des LIE (70-75%) et sont considérés comme des LT résidents tissulaires. Une petite population de LIE TCRαβ+ CD4+ a également été décrite et compte pour environ 10% des LIE.

Parmi les **LIE non conventionnels**, une population de cellules exprimant un TCRγδ incomplet ou non fonctionnel (Goodman and Lefrançois, 1988) avec un répertoire restreint, et n'exprimant pas CD8 ou CD4 représentent environ 10% des LIE totaux.

Enfin, il a été décrit l'existence d'une petite population comptant pour moins de 10% des LIE totaux, exprimant des NKRs mais pas de complexe CD3/TCR de surface, qui

s'apparente à des ILCs et font partie des LIE de type inné. Initialement considérés comme des précurseurs lymphoïdes, ils sont présents dans le tube digestif du fœtus, expriment des gènes T immatures (CD3ε, RAG, TdT) et sont capables de se différencier en LT *in vitro* (Gunther et al., 2005). Il a également été montré qu'une population de LIE CD103+ mais n'exprimant pas CD3 de surface pouvait se différencier en cellules NK ou LT CD8+ *in vitro* mais pas en LT CD4+ (Schmitz et al., 2016). Cependant ils peuvent avoir une activité effectrice cytotoxique et sécréter de l'IFNγ en réponse à l'IL-12 et l'IL-15 (Meresse et al., 2004; Yang et al., 2004). Il a ainsi été proposé que ces cellules puissent définir une nouvelle population d'ILCs exprimant des marqueurs NK (NKp44, NKp46), le facteur de transcription tbx21 et CD103, appelées **cellules lymphoïdes innées intra-épithéliales du groupe 1 (IE-ILC1)** (Fuchs et al., 2013). Des cellules avec un phénotype similaire et des propriétés cytotoxiques ont également été décrites dans les amygdales (Cella et al., 2010; Fuchs et al., 2013).

IEL subset	TCR repertoire	NK cell receptor repertoire	Ligands	Effector molecules
Mouse				
Unconventional TCRαβ+ IEL	Diverse[a]	CD94, NKG2 family and LY49 family	MHC class I, MHC class II, non-classical MHC class I, RAE1, MULT1, H60a and Qa-1	IFNγ, TNF and granzyme B
Unconventional TCRγδ+ IEL	TCRVγ7-enriched	CD94, NKG2 family and LY49 family	BTNL1, BTNL6, RAE1, MULT1, H60a and Qa-1	IFNγ, TNF and granzyme B
Conventional TCRαβ+ IEL	Diverse[a]	None	MHC class I and MHC class II	IFNγ, TNF and granzyme B
ILC1	None	CD94, NKG2 family and LY49 family	RAE1, MULT1, H60a and Qa-1	IFNγ, TNF and granzyme B
CD8αα+ innate IEL	None	LY49E+ or LY49E−	TL	IFNγ and possibly others
Human				
Unconventional TCRαβ+ IEL[b]	ND	ND	ND	ND
Unconventional TCRγδ+ IEL	TCRVδ1-enriched	CD94, NKG2 family and KIR family	CD1, MICA, MICB, ULBP and others and possibly BTNLs	IFNγ, TNF and granzyme B
Conventional TCRαβ+ IEL	Diverse[a]	CD94, NKG2 family and KIR family	MHC class I, MHC class II, MICA, MICB and ULBP	IFNγ, TNF and granzyme B
ILC1	None	CD94, NKG2 family and KIR family	MICA, MICB and ULBP	IFNγ, TNF and granzyme B
Intracellular CD3+ IEL	None	KIR family and others	ND	IFNγ and possibly others

Figure 7 : Sous-types de lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) intestinaux murins et humains. *McDonald et al., Nature Reviews Immunology, 2018.*

Physiopathologie de la maladie coeliaque

Chez des individus prédisposés, le gluten va entrainer une activation chronique de LT CD4+ de type helper 1 (Th1) qui s'accompagne d'une production d'immunoglobulines A (IgA) spécifiques du gluten et de la transglutaminase de type II. Ces LT TCRαβ+ CD4+ sont principalement localisés dans la *lamina propria* et ne peuvent pas à eux-seuls induire une MC. Cette activation LT CD4+ peut, lorsqu'elle est associée à une sécrétion accrue d'interleukine 15 (IL-15), induire l'activation et l'expansion de LIE TCRαβ+ CD8+ cytotoxiques non spécifiques du gluten. Ces LT CD8+ surexpriment des NKRs, en particulier les récepteurs activateurs NKG2C et NKG2D. Ceux-ci sont capables, en réponse à des ligands exprimés par les cellules épithéliales (CEs) intestinales, d'induire une activité cytolytique et cytokinique

dirigée contre les CEs. Ce mécanisme participe à l'atrophie villositaire de la MC (Hüe et al., 2004; Meresse et al., 2004, 2006).

Physiopathologie de la maladie coeliaque réfractaire de type II

La physiopathologie de la MCRII a été en partie élucidée récemment (Ettersperger et al., 2016). Les auteurs de ce travail ont montré que la MCRII dérivait d'une population particulière de cellules lymphoïdes de type inné présentes dans le tube digestif normal (**Fig. 8**). La cellule anormale de la MCRII n'est donc pas le résultat de la transformation d'un LIE T conventionnel, dont on sait le nombre augmenté dans la MC et la MCRI mais provient d'une population distincte. Les LIE anormaux de MCRII expriment CD103 et CD3 en intra-cellulaire mais pas le complexe CD3/TCR en surface. Ils portent des réarrangements du *TCR* généralement non fonctionnels, ce qui suggère l'existence d'une différenciation LT déficiente et permet d'éliminer l'hypothèse d'une diminution d'expression du TCR en réponse à une stimulation antigénique chronique (Ettersperger et al., 2016; Tack et al., 2012). Ils sont capables de se différencier indépendamment du facteur de transcription ID2, et ont été engagés localement dans un programme de différenciation lymphocytaire T sous la dépendance de NOTCH1. Ce programme de différenciation T semble interrompu par l'IL-15. L'IL-15 est en effet capable d'induire *in vitro* la serine-protéase Granzyme B qui va permettre le clivage de NOTCH1 intra-cellulaire. La perte d'expression de NOTCH1 entraine ainsi une reprogrammation vers une voie innée aboutissant à des LIE de type inné (innate-like LIE) exprimant à la fois des marqueurs T et des NKRs. Dans la même étude, il a en outre été suggéré qu'une activation de la voie de signalisation JAK/STAT, due à des mutations récurrentes de *JAK1* et *STAT3* identifiées dans les MCRII, puisse conférer un avantage prolifératif à ces LIE de type inné (Ettersperger et al., 2016).

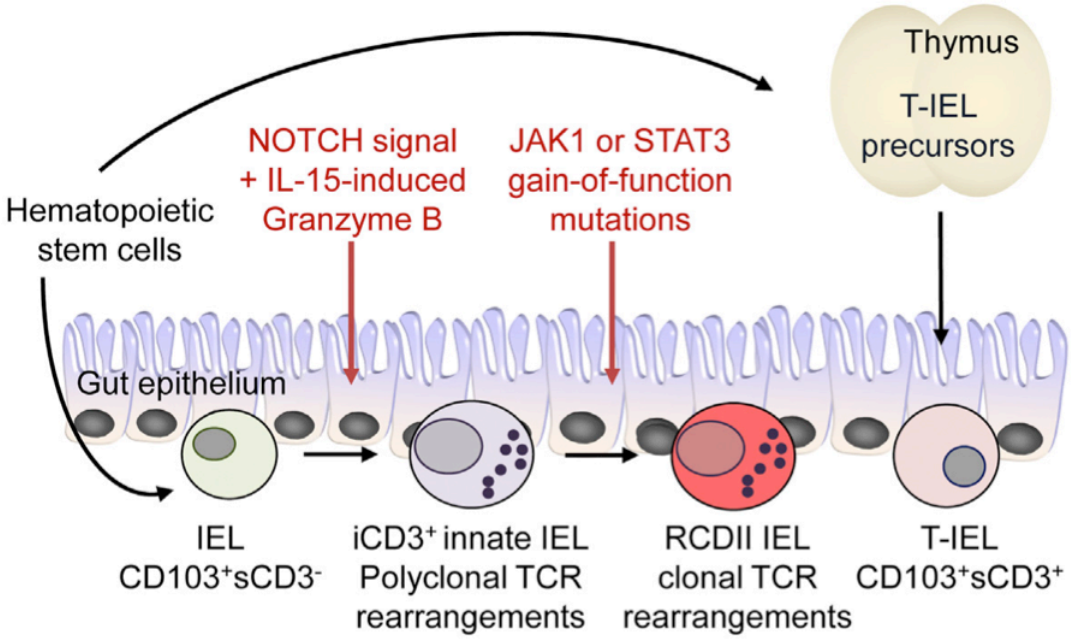


Figure 8 : Schéma de la physiopathologie de la maladie coeliaque réfractaire de type II (RCDII). Des cellules lymphoïdes innées avec des marqueurs T sont présentes dans l'épithélium intestinal et sont capables de se différencier localement en réponse à des signaux NOTCH et Granzyme-B induit par l'IL-15. L'acquisition de mutations gains de fonction de *JAK1* et *STAT3* favorise leur transformation maligne. *Ettersperger et al., Immunity, 2016.*

Physiopathologie du lymphome T associé aux entéropathies

Etant donné le lien de clonalité entre MCRII et EATL, il est probable que **l'EATL** dérive de la même cellule d'origine que la MCRII. L'analyse des réarrangements du *TCR* a montré des réarrangements incomplets et non fonctionnels sans expression d'un TCR dans la majorité des cas (Mutzbauer et al., 2018; Tjon et al., 2008). Par ailleurs, les cellules tumorales de l'EATL ont un phénotype cytotoxique et expriment CD3, CD103 mais pas CD4, et rarement CD8 ou CD56. Il a ainsi été proposé que la cellule tumorale d'EATL puisse dériver d'un LIE cytotoxique (Di Sabatino et al., 2012). Les données récentes sur la MCRII publiées par le groupe de Nadine Cerf-Bensussan plaide pour une origine LIE de type inné sCD3- CD103+ partageant des marqueurs T et NK (Ettersperger et al., 2016). L'EATL serait donc l'évolution ultime d'une MCRII ayant acquis des anomalies génétiques conférant aux cellules tumorales leur agressivité. Durant ce processus de transformation, il a été rapporté la perte de

marqueurs comme CD103 et l'acquisition d'antigènes associés à l'activation cellulaire comme CD30.

Physiopathologie du lymphome T monomorphe épithéliotrope intestinal

A l'inverse, le **MEITL** exprime plus fréquemment un TCRγδ (Chan et al., 2011; Nicolae et al., 2016; Sun et al., 2011; Tan et al., 2013; Tomita et al., 2015; Tse et al., 2012) bien que l'expression d'un TCRαβ soit retrouvé dans un nombre substantiel de cas (Mutzbauer et al., 2018). Il a en outre été suggéré que la voie du TCR puisse jouer un rôle dans la physiopathologie du MEITL (Mutzbauer et al., 2018). En effet, le MEITL est caractérisé par une expression quasiment constante de SYK, une tyrosine kinase reliée à ZAP-70 qui est physiologiquement non exprimée dans les LT (Chu et al., 1996) et qui peut perturber l'activation du TCR (Steinberg et al., 2004). Les mêmes auteurs ont en outre montré l'expression de molécules impliquées dans la voie proximale d'activation du TCR (LCK, FYN, ZAP-70, PLCγ1, SLP-76, VAV1, HPK1) (Mutzbauer et al., 2018). Par ailleurs, des mutations perte de fonction de *SETD2* ont été identifiées dans les EATL comme dans les MEITL (Moffitt et al., 2017; Roberti et al., 2016). La suppression de SETD2 dans les LT entraine en outre une prolifération de LTγδ chez la souris, suggérant son rôle dans la lymphomagénèse (Moffitt et al., 2017). Ces données ont conduit à proposer le LTγδ comme cellule d'origine du MEITL.

Physiopathologie de la lymphoprolifération T indolente gastro-intestinale

Les connaissances physiopathologiques de la LPD T indolente sont parcellaires. Ce lymphome est caractérisé par la présence d'un réarrangement monoclonal du *TCR*, l'expression d'un TCRαβ de surface et l'expression de CD4 (Carbonnel et al., 1999; Malamut et al., 2014; Margolskee et al., 2013; Svrcek et al., 2007) ou plus rarement de CD8 (Perry et al., 2013). Il a donc été proposé qu'il dérive d'un LT TCRαβ conventionnel du chorion. L'association de ces lymphomes à des maladies auto-immunes ou inflammatoires a conduit à suggérer un rôle de stimulation antigénique chronique dans la lymphomagénèse.

RÉCEPTEURS NATURAL KILLER

Les récepteurs natural killer (NKRs) sont des molécules trans-membranaires activatrices et inhibitrices qui constituent un répertoire varié et régulent la fonction des cellules NK. Ils comprennent des récepteurs Immunoglobulin-like Killer (KIR), des récepteurs lectine de type C hétérodimères CD94/NKG2 qui reconnaissent la molécule du CMH-I non classique HLA-E, le récepteur activateur NKG2D, et des récepteurs cytotoxiques naturels (NCRs).

A. RÉCEPTEURS KIR ET NCRs : GÉNÉRALITÉS

1. Récepteurs Immunoglobulin-like Killer (KIR)

Les **KIR** comprennent des KIR inhibiteurs (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3) et des KIR activateurs (2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DL4, 2DS5, 3DS1). Ils appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et diffèrent par le nombre de domaines extra-cellulaires (deux ou trois) et la taille de leur fragment intracytoplasmique (long « L » ou court « S »). Les récepteurs à domaine intracytoplasmique long contiennent deux motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) qui sont capables de recruter les phosphatases SHP-1 ou SHP-2 (SH2-domain-containing phosphatase 1 ou 2) et d'avoir un rôle inhibiteur (Long et al., 2001). Les récepteurs à domaine intra-cytoplasmique court peuvent transmettre un signal activateur en s'associant à la protéine adaptatrice DAP12 qui possède un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (Lanier et al., 1998). Chaque récepteur KIR est spécifique d'un groupe d'allèles du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), HLA-A, HLA-B et HLA-C. Chez un même individu, chaque cellule NK exprime différentes combinaisons de KIR, permettant ainsi la constitution d'un répertoire extrêmement diversifié, encore amplifié par la variabilité du CMH. Les gènes codant pour ces KIR sont localisés en cluster sur le chromosome 19q13.4 et sont transmis en haplotype (**Fig. 9**). Ils sont caractérisés par

une grande variabilité génétique avec un polymorphisme important au sein de chaque gène. L'expression des KIR sur les cellules NK est dépendante de la méthylation de leurs promoteurs. Ainsi, l'inhibition de la DNA méthyltransférase (DNMT) par le 5-aza-2'-deoxycytidine conduit à une expression globale des KIR sur toutes les cellules NK (Chan et al., 2003; Santourlidis et al., 2002).

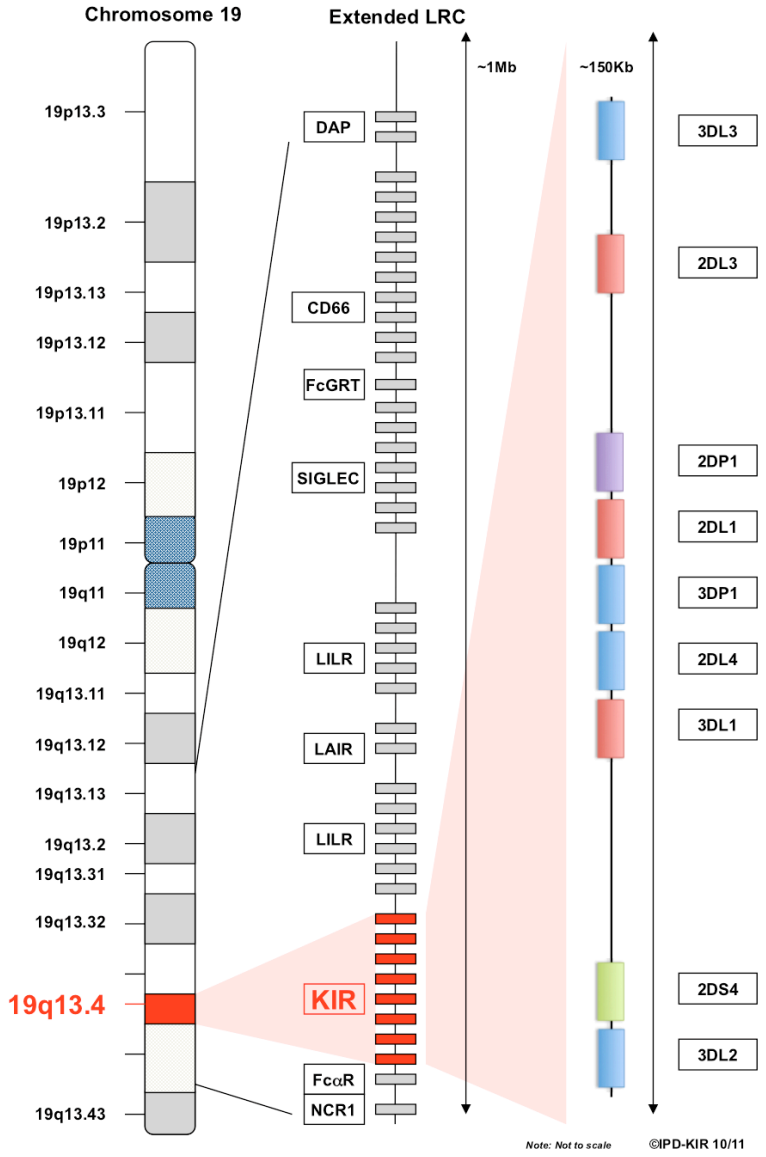


Figure 9 : Le Leukocyte Receptor Complex (dont la région 19q13.4), contenant en particulier des gènes codant pour les KIR, la protéine adaptatrice DAP et le gène *NCR1*. A droite, un prototype d'haplotype KIR. Les gènes KIR framework sont en bleu, les KIR inhibiteurs sont en rouge et les KIR activateurs en vert. *https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html.*

2. Récepteurs cytotoxiques naturels (NCRs)

Les récepteurs activateurs comprennent également CD94/NKG2C, NKG2D et les NCRs. Trois **NCRs** ont été décrits chez l'homme, NKp46 (NCR1, CD335), NKp44 (NCR2, CD336) et NKp30 (NCR3, CD337) (Moretta et al., 2001). Ils font partie du même groupe en raison de leur capacité à activer les cellules NK mais ont des structures différentes. Ils sont composés de un ou deux domaines extra-cytoplasmiques, et d'une protéine trans-membranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines, dont un site peut interagir avec des protéines adaptatrices possédant des motifs ITAM. Les ligands de ces récepteurs sont induits par le stress cellulaire (principalement pour NKG2D) (Stern-Ginossar et al., 2008) ou sont dérivés de pathogènes (principalement pour les NCRs). Des protéines virales, de type hemagglutinines ou hemagglutinines neuraminidases, bactériennes ou parasitaires ont ainsi été identifiées comme ligands des NCRs (Jarahian et al., 2009; Mandelboim et al., 2001).

3. Fonction des récepteurs NK (NKRs)

Ces NKRs jouent un rôle important dans la régulation de la cytotoxicité des lymphocytes, en particulier dans l'immunité anti-virale et anti-tumorale médiée par les lymphocytes NK. Celle-ci est modulée par la balance des récepteurs inhibiteurs et des récepteurs activateurs. La reconnaissance des molécules du CMH-I se fait sans intervention d'un peptide par les récepteurs KIR inhibiteurs et permet la tolérance au soi. A l'inverse, la perte du CMH-I sur une cellule du soi anormale induit une perte d'inhibition et l'activation des fonctions effectrices des cellules NK (théorie du missing-self) (Vivier et al., 2011). Par ailleurs, l'expression de récepteurs activateurs, incluant NKG2D et les NCRs, permet aux cellules NK de lyser directement, sans immunisation préalable, les cellules cibles, infectées par un virus ou transformées, qui en expriment le ligand.

B. EXPRESSION PHYSIOLOGIQUE DES NKRs

La grande majorité des NKRs a donc d'abord été identifiée sur les cellules NK. Plus récemment, ils ont été identifiés sur des populations minoritaires de LT et sur une population de cellules NK-like appelées cellules lymphoïdes innées (ILCs) (Bensussan et al., 2011; Correia et al., 2011a; Hudspeth et al., 2012; Lanier et al., 1998; von Lilienfeld-Toal et al., 2006; Meresse et al., 2006; Raulet et al., 2001; Walzer et al., 2007a). Ces populations lymphocytaires diffèrent dans leur développement et leur distribution mais sont caractérisés par des propriétés communes de type inné et ont la particularité d'être principalement localisés dans les tissus périphériques non lymphoïdes sans pouvoir recirculer (Artis and Spits, 2015; Eberl et al., 2015a; Fan and Rudensky, 2016; Godfrey and Berzins, 2007; Schenkel and Masopust, 2014). Ces « lymphocytes résident tissulaires » comprennent les LT résidents tissulaires mémoires conventionnels (T_{RM}), les ILCs et les LT non conventionnels (« innate-like ») que sont les LTγδ, les lymphocytes NKT invariants (iNKT), les lymphocytes T invariants associés aux muqueuses (MAIT) et certains LIE.

1. Récepteurs NK et cellules lymphoïdes innées (ILCs)

Si la distinction entre cellules lymphoïdes et myéloïdes remonte à la fin du XIXème siècle par Paul Ehrlich, suivie par la mise en évidence de lymphocytes T et B adaptatifs dans les années 60 (Miller, 2011), les ILCs n'ont été caractérisées que très récemment dans les années 2008-2010 (Cella et al., 2010; Luci et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2010; Vonarbourg et al., 2010; Walker et al., 2013). Contrairement aux LT conventionnels, les **ILCs** n'expriment pas de récepteur spécifique de l'antigène (Artis and Spits, 2015). A l'exception des cellules NK, elles sont localisées principalement dans les tissus périphériques (Gasteiger et al., 2015). Chez la souris, elles se différencient à partir d'un progéniteur lymphoïde commun inné (Common Innate lymphoid progenitor_CILP) exprimant la chaine α du récepteur à l'interleukine 7 (IL7Rα/CD127) (Spits et al., 2013), sous la dépendance du facteur de transcription ID2 (Boos et al., 2007) et donnent lieu à trois types de lignages : les précurseurs NK, les précurseurs des cellules inductrices de tissus lymphoïde (Lymphoid tissue inducer

– LTi) (Constantinides et al., 2014) et les précurseurs communs helper des ILCs (Klose et al., 2014). Ces derniers expriment le facteur de transcription (FT) PLZF et donne les fractions helper, classées selon le type de FT impliqué et le profil cytokinique (Spits et al., 2013). Les ILCs du groupe 1 (ILC1), sous la dépendance de T-bet, produisent de l'IFN-γ, les ILCs du groupe 2 (ILC2), sous la dépendance de GATA-3 produisent IL4, IL-5, IL-13 et les ILCs du groupe 3 (ILC3), sous la dépendance de RORγt produisent IL-22 et IL-17. Les ILC3 sont en outre divisées en deux groupes identifiés selon qu'ils expriment ou non des NCRs. Les LTi, qui n'expriment pas de NCR, sont dépendantes de RORγt et sont donc classés dans le groupe des ILC3. On décrit schématiquement leurs fonctions en miroir de celles des LT conventionnels (**Fig. 10**) (Eberl et al., 2015b). Les NK ont une activité cytolytique similaire à celle des LT CD8+ cytotoxiques. Les **ILC1**, en miroir des LT CD4+ Th1, sont productrices des cytokines effectrices IFN-γ et TNF-α et ont été impliquées dans la surveillance anti-infectieuse digestive et anti-tumorale. Des populations d'ILC1, productrices d'IFN-γ et de Granzyme-B (Simoni et al., 2017), ont en outre été identifiées en intra-épithélial, dans l'intestin (Fuchs et al., 2013) et dans les amygdales (Bernink et al., 2013) (**IE-ILC1**). Ces IE-ILC1, dont le précurseur n'a pas été identifié, expriment Eomes (eomesodermin), T-bet et CD103, mais sont, contrairement aux cellules NK, indépendantes de l'IL-15 pour leur différenciation (Fuchs et al., 2013). Les **ILC2**, en miroir des LT CD4+ Th2, sont impliquées principalement dans la réponse anti-parasitaire (Klose and Artis, 2016). Les **ILC3**, en miroir des LT Th17, sont impliquées dans l'homéostasie intestinale et la réponse anti-infectieuse locale (Klose and Artis, 2016).

Chez l'homme la différenciation est moins bien connue que chez la souris (Juelke and Romagnani, 2016), de sous-populations hétérogènes ont été décrites au sein de chacun des groupes (Björklund et al., 2016; Gury-BenAri et al., 2016) et une plasticité entre les différentes populations a été rapportée (Hazenberg and Spits, 2014; Klose et al., 2014; Viant et al., 2016). Il a en outre été proposé que certaines ILC1 puissent correspondre à des LT activés avec une expression faible du complexe CD3/TCR puisqu'elles expriment un réarrangement invariant du TCR (Björklund et al., 2016; Robinette et al., 2015), CD3 en intra-cellulaire ou la molécule de costimulation CD28

(Roan et al., 2016). Cette population de cellules pourrait donc plutôt constituer une population LT de type inné ou à l'inverse une population innée de type LT (Simoni and Newell). Des analyses en cytométrie de masse (CyTOF) ont ainsi échoué à identifier une population d'ILC1 distincte phénotypiquement ou fonctionnellement (Newell and Cheng, 2016).

Il est par ailleurs difficile d'assigner des propriétés fonctionnelles spécifiques à chacun de ces types cellulaires (McDonald et al., 2018), et ces populations semblent redondantes entre elles (Rankin et al., 2016; Song et al., 2015; Vély et al., 2016). Ainsi, des patients allogreffés pour un déficit immunitaire combiné sévère sans reconstitution immunitaire NK ou ILCs se portaient bien plusieurs années après la greffe, sans augmentation du risque infectieux ou de cancer (Vély et al., 2016). Les auteurs de cette étude suggèrent que les ILCs sont donc redondantes et complémentaires des autres cellules du système immunitaire. Ce phénomène de redondance avait déjà été suggéré dans un modèle d'infection à *Citrobacter rodentium* chez la souris, dans lequel l'infection était contrôlée par la sécrétion d'IL-22 par les LT en l'absence de sécrétion d'Il-22 par les ILC3 (Rankin et al., 2016; Song et al., 2015). Le fait qu'il n'existe pas de déficit immunitaire NK isolé va également dans ce sens (Parry et al., 2016).

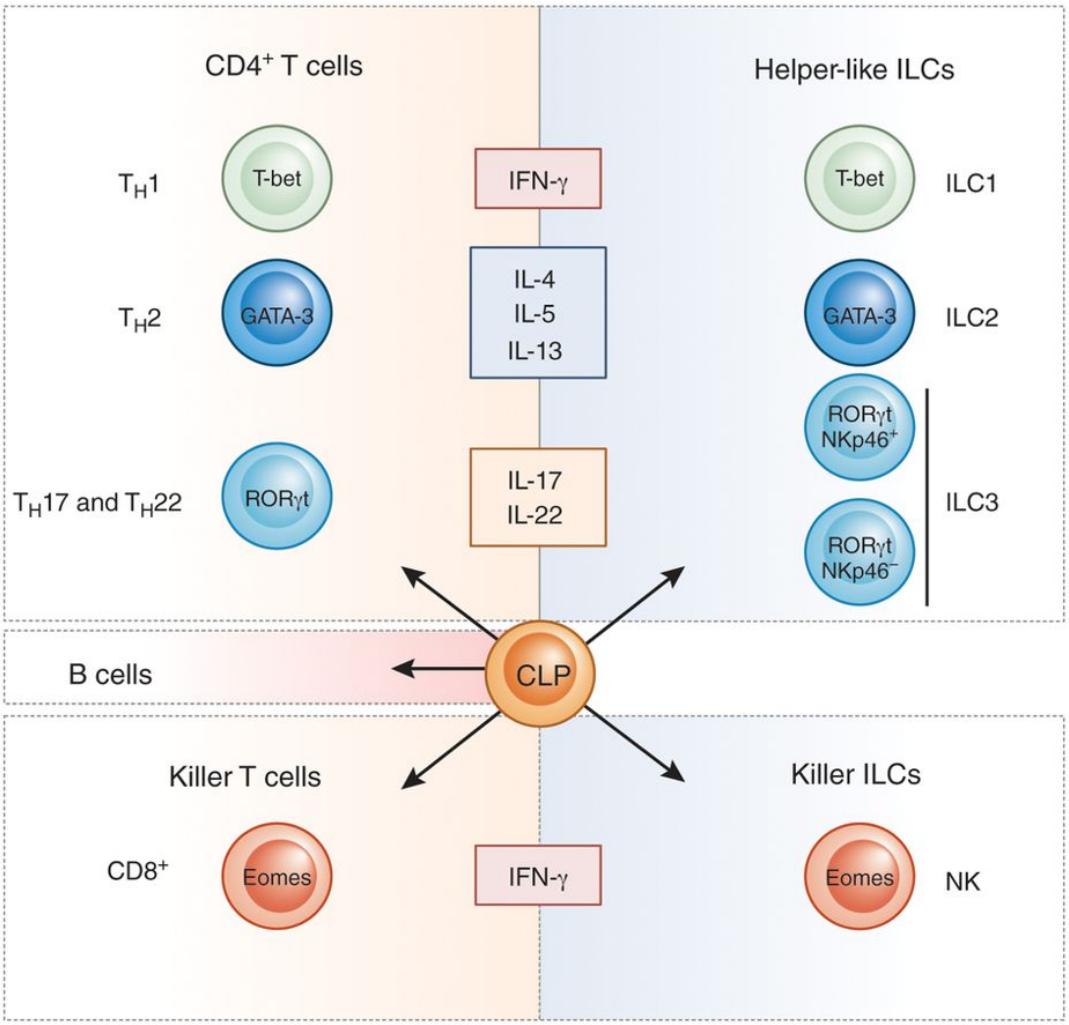


Figure 10 : Parallèle entre les lymphocytes T du système immunitaire adaptatif et les cellules lymphoïdes innées (ILCs). *Eberl et al., Nature Immunology, 2015.*

2. *Récepteurs NK et lymphocytes T de type inné*

Si les acteurs cellulaires propres à l'immunité innée ou adaptative possèdent des caractéristiques distinctes et non redondantes les unes des autres, des lymphocytes partageant des caractéristiques de cellules innées et adaptatives, pourraient former un troisième « système » parfois appelé immunité transitionnelle. Il est en effet bien connu que certaines populations lymphocytaires T peuvent également exprimer des NKRs (Di Santo, 2006). Ces LT non conventionnels sont caractérisés par l'expression d'un TCR semi-invariant et la capacité à répondre à des signaux différents de la

reconnaissance classique du complexe peptide-CMH. Ils peuvent répondre rapidement à une infection ou à une dérégulation tissulaire et ont été impliqués dans l'immunité anti-tumorale, l'allergie ou la réponse inflammatoire (Hayday, 2009; Strid et al., 2011). Il a été proposé qu'ils soient définis par la dépendance à une signalisation TCR pour leur développement, suivie secondairement d'une altération de la réponse TCR antigène-spécifique (Wencker et al., 2014).

Lymphocytes non conventionnels exprimant un TCRαβ

Parmi les lymphocytes non conventionnels exprimant un TCRαβ, deux types cellulaires avec un TCR semi-invariant ont été décrits dans les années 1990: les lymphocytes NKT invariants et les lymphocytes T invariants associés aux muqueuses (MAIT) (Lantz and Bendelac, 1994; Porcelli et al., 1993).

Les **NKT** expriment un TCRαβ de répertoire restreint avec une chaîne α invariante (réarrangement Vα24-Jα18 chez l'homme) associée à une chaine β de diversité limitée. Ils reconnaissent des antigènes glycolipidiques présentés par la molécule du CMH-I CD1d (reconnaissance CD1d restreinte). Deux types de NKT sont décrits, le type I (NKT invariants_iNKT) exprimant un TCRαβ semi-invariant (chaine Vβ11 chez l'homme), reconnaissant l'α-galactosylceramide (α-GalCer), et le type II avec un répertoire TCRαβ restreint dont la reconnaissance antigénique, principalement pour le sulfatide, reste CD1d restreinte (Jahng et al., 2004). Comme les ILCs helper, les MAIT et certains LTγδ, ils expriment également le FT PLZF (Alonzo et al., 2010; Constantinides et al., 2014; Kovalovsky et al., 2008; Lu et al., 2015; Rahimpour et al., 2015; Savage et al., 2008). Les NKT expriment des NKRs, en particulier CD56, CD94/NKG2A et NKG2D, mais leur activation est dépendante de la signalisation TCR, ce qui leur permet de garder une réponse immunitaire conventionnelle de type TCR (Fan and Rudensky, 2016). Chez l'homme, ils n'expriment pas NKp46, ce qui permet de les différencier des ILCs et des cellules NK.

Les **MAIT** représentent entre 1% et 10% des LT dans la circulation périphérique et résident principalement dans le foie mais aussi dans l'intestin et le sang périphérique. Ils expriment, comme les iNKT, un TCRαβ de répertoire restreint avec une chaîne α

invariante (Vα7.2-Jα33 chez l'homme) associée à une chaine β de diversité limitée. Ils sont activés par des peptides (métabolites précurseurs de la vitamine B12) présentés par la molécule conservée et non classique du CMH-I, MR1, et peuvent produire IFN-γ et IL-17 (Fan and Rudensky, 2016). Les cellules MAIT pourraient également être capables d'une reconnaissance TCR antigène-spécifique responsable d'une activation et prolifération cellulaire (Eckle et al., 2014; Gold et al., 2014).

Il a parfois été proposé de sortir les iNKT et les MAIT du groupe des lymphocytes de type inné en raison de la persistance d'une signalisation TCR efficace (Wencker et al., 2014).

Lymphocytes non conventionnels exprimant un TCRγδ

Les **LT TCRγδ+** font également partie des LT non conventionnels, représentent 5 à 6 % des LT CD3+ circulants et sont particulièrement retrouvés dans la barrière épithéliale intestinale. Leur développement thymique ne nécessite pas de sélection positive ou négative dépendante du TCR. Ils sont capables d'une reconnaissance antigénique conventionnelle médiée par le TCR, mais aussi de reconnaître des antigènes présentés par des molécules de la famille CD1, ou de type CMH-I (MICA, ULBP4…) induites par le stress cellulaire. Ils sont également capables de reconnaître des ligands en l'absence de présentation antigénique (Chien et al., 2014). Enfin, ils expriment des NKRs, comme NKG2D, qui pourraient avoir un rôle dans leur fonction cytotoxique (Bauer et al., 1999). Ils n'expriment en revanche pas de NCRs à l'état basal mais ceux-ci peuvent être induits après stimulation du TCR dans un contexte cytokinique IL-12 ou IL-15 (Correia et al., 2011a). Ils participeraient à une réponse immunitaire rapide en produisant IFN-γ et IL-17 précocement après activation (Fan and Rudensky, 2016; Jensen et al., 2008). Ils ont été impliqués dans l'immunité protectrice contre les pathogènes intra- et extra-cellulaires, la surveillance anti-tumorale, la modulation des réponses immunitaires innée et adaptative, la maintenance de la barrière épithéliale et le remodelage tissulaire (Hayday, 2009; Lantz and Bendelac, 1994).

Lymphocytes T « conventionnels de type inné »

Plusieurs NKRs, en particulier CD56, CD94/NKG2A, des KIR et NKp46, ont en outre été décrits sur des **LT conventionnels TCRαβ+ CD8+** ayant un tropisme tissulaire non lymphoïde sans capacité à recirculer (Anfossi et al., 2001; Arlettaz et al., 2004a, 2004b; Arosa et al., 2017; Bedoui et al., 2016; Correia et al., 2011a; Kastenmüller et al., 2012; Lee et al., 2011; Mingari et al., 2000; Seyda et al., 2016; Speiser et al., 1999; Vivier and Anfossi, 2004).

Il a d'abord été montré que l'expression du récepteur inhibiteur NKG2A par les LT CD8+ de type T_{EM} était liée à la stimulation TCR (Jabri et al., 2002). Des LT CD8+ effecteurs peuvent ainsi exprimer divers NKRs après activation (CD94/NKG2C, CD94/NKG2A et des KIR), qui joueraient un rôle de co-récepteur du TCR (Arlettaz et al., 2004b). Puis, des LT CD8+ TCRαβ+ possédant un phénotype T effecteur en différenciation terminale T_{EMRA} CD45RA+ CCR7- et le récepteur NKG2D ont été identifiés (Chu et al., 2013). Ils expriment CD103, Eomes mais pas la molécule de costimulation CD28 et répondent mal à une stimulation TCR. Ils sont en outre capables de produire de l'IFN-γ en réponse à stimulation par l'IL-12 ou l'IL-18 et ont donc une « activité innée » (Jacomet et al., 2015; Wencker et al., 2014). L'acquisition d'un phénotype et fonction innés a donc conduit à les définir comme des « **LT CD8+ innés** » (Jacomet et al., 2016). Par ailleurs, des LT TCRαβ+ avec un répertoire TCR oligoclonal, expriment des NKRs variés, s'accumulent avec l'âge et sont fonctionnels sans reconnaissance TCR spécifique, ce qui a conduit à proposer que l'acquisition de NKRs illustrait une plasticité cellulaire bénéfique dans le contexte du vieillissement (Anfossi et al., 2001; Arosa, 2002; van Bergen et al., 2009; Li et al., 2009; Michel et al., 2016; Tarazona et al., 2000). Des LT CD8+ KIR+ ont un répertoire TCR biaisé par rapport aux LT CD8+ KIR-, appuyant l'hypothèse d'une activation chronique du TCR dans le maintien de ces cellules (Björkström et al., 2012). Ces données ont conduit à suggérer que l'acquisition d'un phénotype et d'une fonction innée par des LT conventionnels était secondaire à une activation chronique du TCR (**Fig. 11**).

Il a néanmoins été montré que des cytokines, en particulier l'IL-15, sont également capables d'induire ce phénotype particulier (Alves et al., 2003; Chiu et al., 2006;

Correia et al., 2011b). Chez l'homme, des cellules souches hématopoïétiques cultivées en présence d'IL-15, sur un système OP9-DL1 surexprimant NOTCH, génèrent en effet des cellules NK exprimant un CD3 intra-cellulaire (De Smedt et al., 2007). Il a également été montré que l'invalidation dans des précurseurs murins du gène *bcl11b*, impliqué dans la différenciation T et induit par NOTCH, permettait de différencier *in vitro* des lymphocytes avec des réarrangements du TCRαβ et exprimant le récepteur NKp46. Ces cellules ont été nommées « Induced T to NK cells » (ITNK) (Li et al., 2010). Au total, l'expression de NKRs a donc été constatée sur plusieurs populations de LT conventionnels, dont l'apparition est induite par des stimuli activateurs variés.

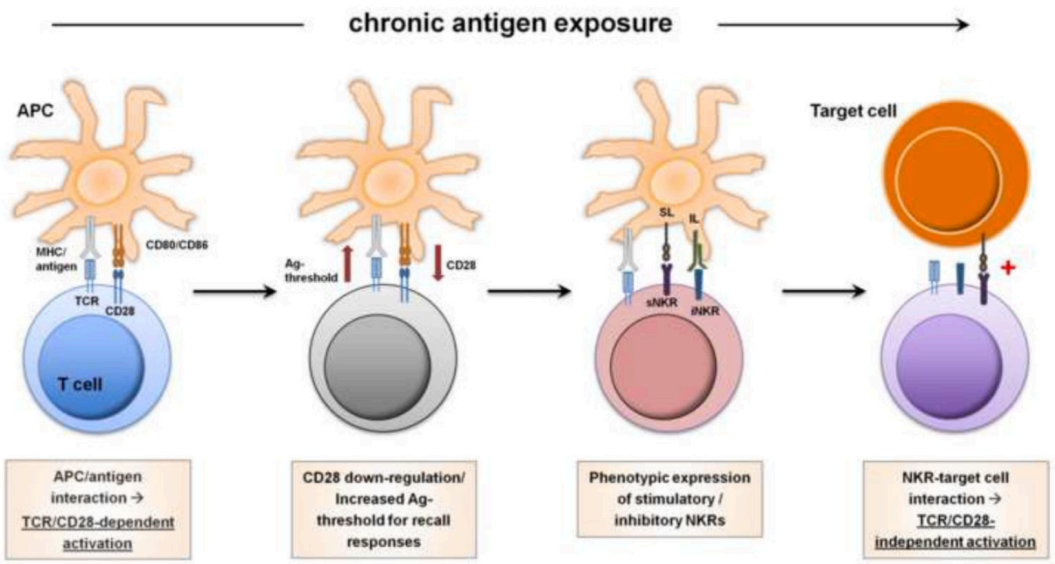


Figure 11 : Modèle montrant comment des lymphocytes T peuvent acquérir des caractéristiques innées sous l'effet d'une stimulation antigénique chronique. *Seyda et al., Trends Immunology, 2017.*

Le rôle de ces NKRs dans les LT reste globalement mal connu. Ces LT de type inné pourraient avoir une fonction similaire aux ILCs, en raison de leur signalisation TCR altérée. Néanmoins, ils gardent une capacité de réponse TCR résiduelle, surtout dans des contextes cytokiniques particuliers (Michel et al., 2012). L'engagement de leurs NKRs activateurs permettrait ainsi survie et sécrétion cytokinique (Correia et al., 2011b), donc une réponse cytotoxique rapide dans un contexte signalisation TCR

antigène spécifique déficiente (Wencker et al., 2014). Les NKRs activateurs pourraient ainsi jouer un rôle dans la protection immunitaire locale en détectant les ligands microbiens ou induits par le stress cellulaire et permettre ainsi une activation cellulaire rapide, en particulier en cas de signalisation TCR déficiente (Wencker et al., 2014). Il a également été proposé que l'expression des KIR par les LT puisse protéger le LT de la mort induite par l'activation du TCR (AICD), indépendamment de la liaison à un ligand, ce qui pourrait expliquer l'accumulation de ces cellules avec l'âge (Ugolini et al., 2001). Enfin, il a également été montré qu'ils pouvaient avoir une fonction de co-récepteur inhibiteur ou activateur au TCR (Guerra et al., 2002; Henel et al., 2006).

3. Récepteurs NK et lymphocytes intra-épithéliaux intestinaux (LIE)

L'expression de NKRs, a également été rapportée sur tous **LIE** intestinaux humains (**Fig. 7**), qui comprennent des populations lymphocytaires innées et adaptatives variées. En effet, les **LIE TCRαβ+**, qui sont capables d'une activité cytotoxique et d'une sécrétion d'IFN-γ et de TNF-α, sont dépourvus de la molécule de costimulation CD28 (Pobezinsky et al., 2012) mais peuvent exprimer des NKRs des familles NKG2 et KIR dans certaines conditions (Jabri et al., 2000; Meresse et al., 2006). Il a ainsi été proposé que l'inflammation chronique de patients porteurs d'une maladie coeliaque puisse favoriser la présence et l'expansion de cette population de lymphocytes de type inné (NK-like) exprimant CD3, faiblement un TCRαβ, CD8 et des NKRs (NKp44, NKp46, NKG2C). Ces LIE de type inné peuvent dégranuler ou sécréter de l'IFN-γ sans reconnaissance du gluten médiée par le TCR (Meresse et al., 2004, 2006), en réponse aux ligands de NKG2D et à un environnement cytokinique favorable, lié à l'IL-15 et une activation LT CD4+. Cette population de LT TCRαβ+ a néanmoins un répertoire CDR3 biaisé, suggérant l'existence d'une stimulation antigénique chronique pouvant jouer un rôle dans la balance de ces NKRs inhibiteurs et activateurs et dans la physiopathologie de la MC (Jabri et al., 2002). Il est également possible que l'IL-15 et les récepteurs activateurs puissent diminuer le seuil de stimulation nécessaire à l'activation de la signalisation TCR (Liu et al., 2013). Des NKRs ont également été retrouvés sur des LIE non conventionnels **TCRγδ+** et des

ILC1, comptant pour une minorité de LIE (phénotype CD161+ NKp46+ CD122+ CD160+ CD94+ NKG2D+) et capables d'avoir une activité cytolytique en réponse à l'IL-15 et l'IL-12 (Fuchs et al., 2013). Enfin, une petite population de **LIE de type inné,** indépendante du facteur de transcription ID2 pour leur développement, exprime également des NKRs. Ces LIE n'expriment pas de TCR de surface, mais expriment CD3 en intra-cellulaire et CD103 (intégrine αE qui reconnaît l'E-cadhérine). Ces cellules ont initié une différenciation T dépendante de NOTCH, mais l'IL-15 de l'environnement va pouvoir induire Granzyme-B qui, en clivant NOTCH, peut orienter la différenciation de ces cellules vers un lignage inné (Ettersperger et al., 2016). A l'exception des LT conventionnels TCRαβ+, ces LIE peuvent tous avoir des propriétés cytolytiques et de production cytokinique en réponse aux cytokines IL-12, IL-15 et IL-18 produites par les cellules épithéliales et les cellules présentatrices d'antigène de la *lamina propria*, et/ou en raison de l'engagement de leurs NKRs (Ettersperger et al., 2016; Fuchs et al., 2013).

C. LE RECEPTEUR KIR3DL2

Le récepteur KIR3DL2 (p140, NKAT4, CD158k) fait partie de la famille des récepteurs KIR inhibiteurs. Il comprend trois domaines extra-cellulaires et une chaine longue intra-cytoplasmique portant des motifs ITIM et s'associe en dimère. Il est codé par un gène localisé dans le cluster des KIR (chromosome 19q13.4), « framework » car retrouvé dans tous les haplotypes (Hsu et al., 2002) (**Fig. 9**). Il peut donc théoriquement être exprimé par tous les individus, mais le gène *KIR3DL2* est extrêmement polymorphe avec plus de 86 allèles rapportés (Robinson et al., 2010) et de multiples isoformes dus à des épissages alternatifs ont été décrits. Son expression physiologique est plutôt faible et a été décrite sur environ 20% de cellules NK et une fraction minoritaire de LT CD8+ (environ 9%) et de LT CD4+ (environ 5%) (Chan et al., 2005; Sako et al., 2014). Comme tous les KIR, il est principalement exprimé sur les LT mémoires CD45RO+ CD28− CCR7− CD62L− (Chan et al., 2005).

En raison de sa structure et du motif ITIM porté par sa chaine intra-cytoplasmique, KIR3DL2 est réputé avoir un rôle inhibiteur sur les cellules NK. Néanmoins, il a été difficile d'identifier un ligand avec un rôle fonctionnel, et une activation des cellules NK suite à l'internalisation de KIR3DL2 a été rapportée (Sivori et al., 2010). En effet, KIR3DL2 se lie à des molécules du CMH-I, en particulier HLA-A3 et HLA-A11 (Augusto et al., 2015; Hansasuta et al., 2004) mais les interactions sont de faible affinité et dépendantes d'un peptide. Le rôle de cette interaction *in vivo* reste controversé car il n'a pas pu être montré d'engagement fonctionnel des NK suite à la liaison KIR3DL2/HLA-A3 ou HLA-A11 (Fauriat et al., 2008). Suite à deux études explorant le rôle des KIR dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et dans l'infection avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), la molécule HLA non classique HLA-F a été identifiée comme un potentiel ligand de KIR3DL2 (Goodridge et al., 2010). Dans la première, des astrocytes primaires de patients porteurs d'une SLA sont capables d'exprimer KIR3DL2 (Song et al., 2016). La surexpression de son ligand HLA-F sur des motoneurones permet de protéger ceux-ci de la cytotoxicité induite par les astrocytes. Dans la deuxième étude, les auteurs ont étudié une centaine de protéines HLA de classe I et ont montré que KIR3DS1 mais également KIR3DL2 étaient capables de se lier à HLA-F (Garcia-Beltran et al., 2016). Cette liaison va entrainer la dégranulation, la production de cytokines anti-virales et l'inhibition de la réplication du VIH par les cellules NK KIR3DS1+ *in vitro*. L'aspect fonctionnel de la liaison KIR3DL2 et HLA-F n'est en revanche pas étudié. Il a par ailleurs été montré que KIR3DL2 pouvait se lier indépendamment d'un peptide aux chaines lourdes de HLA-B27 (Kollnberger et al., 2002), entrainant une inhibition de la production d'IFN-γ et augmentant la survie des LT et NK (Kollnberger et al., 2007). Pour compliquer ce tableau, il a été montré que KIR3DL2 pouvait avoir un rôle activateur des cellules NK en se liant à des CpG-oligodeoxynucleotides (ODN-CpG). A la suite de cette liaison, KIR3DL2 est internalisé vers les endosomes où le complexe KIR3DL2/ODN-CpG est reconnu par le TLR9, ce qui entraine l'activation des cellules NK (Sivori et al., 2010). La fonction physiologique de KIR3DL2 sur les LT peu claire et est extrapolée d'études réalisées sur les lymphocytes tumoraux du syndrome de Sezary (**cf chapitre suivant**).

Le récepteur KIR3DL2 a en outre été impliqué dans la physiopathologie de maladies auto-immunes (Chan et al., 2005). Dans la spondylarthrite ankylosante, la liaison de KIR3DL2 aux chaines lourdes libres de HLA-B27 pourrait entrainer une augmentation du nombre de LT de type Th17 exprimant KIR3DL2 avec un comportement pro-inflammatoire (Bowness et al., 2011). Par ailleurs, son expression a été particulièrement bien décrite dans des lymphomes T cutanés. Ce point est développé dans le **chapitre suivant**.

D. LE RECEPTEUR NKp46

Le récepteur NKp46 (CD335) est un récepteur activateur très conservé entre les espèces, codé par le gène *NCR1 (natural cytotoxicity triggering receptor 1*) sur le chromosome 19 (19q13.42). Il code pour un récepteur de type immunoglobuline qui contient 2 domaines extra-cellulaires, un domaine trans-membranaire et une chaine courte intra-cytoplasmique. NKp46 s'associe notamment à CD3z et FceRIγ, deux adaptateurs qui possèdent un motif ITAM, et qui permettent une activité cytotoxique et de production cytokinique.

NKp46 est constitutivement exprimé par les cellules NK non activées du sang périphérique. *NCR1* est en outre l'un des gènes les plus spécifique du profil transcriptomique des cellules NK, ce qui a initialement conduit à proposer NKp46 comme marqueur spécifique des cellules NK (Sivori et al., 1997; Walzer et al., 2007a, 2007b). Mais NKp46 a également été retrouvé sur les ILCs, en particulier du groupe 1 (Fuchs et al., 2013) et d'une fraction du groupe 3 (ILC3 NCR+) (Killig et al., 2014; Spits et al., 2013). Il a en outre été montré que NKp46 pouvait être exprimé par une fraction minoritaire de LT CD3+ chez la souris, alors qu'il n'est pas exprimé par les cellules NKT restreintes par le CD1d (Walzer et al., 2007a). Cette population peut exprimer d'autres récepteurs NK comme CD94/NKG2A et proliférer en présence d'IL-15 (Yu et al., 2011). La souris transgénique surexprimant l'IL-15 développe en effet une leucémie LGL-T NKp46+ (Yu et al., 2011). Enfin, NKp46 est exprimé par

environ 10% des LIE CD3+ TCRαβ+ humains (mais pas murins) et cette valeur peut augmenter au cours de la maladie coeliaque.

NKp46 peut reconnaître des protéines virales comme l'hémagglutinine d'influenzae (Jarahian et al., 2009; Mandelboim et al., 2001), des protéines bactériennes (Chaushu et al., 2012) ou des ligands cellulaires exprimés en cas d'infection, comme la vimentine (Garg et al., 2006). Le facteur P du complément a récemment été identifié comme un autre ligand de NKp46 (Narni-Mancinelli et al., 2017). Fonctionnellement, la liaison de NKp46 par son ligand induit une activité cytotoxique et la production d'IFN-γ par les cellules NK. Son rôle est moins clair dans les ILC3 où son engagement n'induit pas de production cytokinique (Glatzer et al., 2013). Enfin, NKp46 pourrait conférer aux LIE une activité cytotoxique dirigée contre les cellules épithéliales intestinales (Meresse et al., 2006).

RECEPTEURS NK ET HEMOPATHIES LYMPHOÏDES

Les hémopathies lymphoïdes sont classées selon une combinaison de caractéristiques cliniques, phénotypiques, cytogénétiques et moléculaires, ce qui justifie l'étude approfondie de leur phénotype. L'expression de NKRs a ainsi été recherchée principalement dans les hémopathies lymphoïdes matures T et NK, dont l'origine cellulaire est souvent discutée.

A. EXPRESSION DES RECEPTEURS NK DANS LES HEMOPATHIES LYMPHOÏDES

Il a été montré que des NKRs pouvaient être exprimés par différentes hémopathies lymphoïdes. Les résultats de ces études sont résumés dans le **tableau 3**, et sont détaillés ci-dessous.

1. Lymphomes T périphériques ganglionnaires

L'expression de NKp46 a été recherchée dans de petites cohortes de lymphomes T périphériques, non spécifiés (**PTCL, NOS**) et semble marginale dans ce groupe de lymphomes (Freud et al., 2013; Uemura et al., 2018). En revanche, des NKRs ont été associés à des lymphomes anaplasiques (**ALCL**), en particulier ALK positifs (Freud et al., 2013).

2. Lymphomes T périphériques extra-ganglionnaires

Parmi les lymphomes extra-ganglionnaires, les **lymphomes NK/T de type nasal** ont été le mieux explorés pour l'expression de NKRs. Ils sont souvent CD3 positif en intra-cellulaire, CD4, CD8 et TCR négatifs, mais expriment CD56 et sont caractérisés

par leur association à l'Epstein-Barr virus (EBV). Il a été montré sur de petits nombres de patients qu'ils pouvaient exprimer CD94, NKG2A, et peut-être KIR3DL2 (Battistella et al., 2017), mais pas KIR2DL1, KIR2DL2, KIR3DL1, KIR2DS4 (Dukers et al., 2001; Haedicke et al., 2000). Enfin, à l'exception de KIR2DL4 (CD158d), l'expression en ARN messager de tous les KIR est diminuée ou absente sur une cohorte de 17 patients analysés en RNA-seq (Küçük et al., 2016). En revanche, l'expression de NKp46, étudiée sur une plus grande cohorte, semble presque constamment retrouvée dans ce lymphome (Freud et al., 2013; Uemura et al., 2018).

Un cas de **lymphome Tγδ hépatosplénique** semble également exprimer plusieurs NKRs (CD94/NKG2A/ KIR2DL1/ KIR2DL2) (Haedicke et al., 2000).

Il a en outre été suggéré que les lymphomes intestinaux primitifs, en particulier cytotoxiques pouvaient exprimer des NKRs. En effet, cinq lymphomes T intestinaux, de type **EATL**, exprimaient CD94 sur les cellules tumorales, sans expression d'autres KIR (Dukers et al., 2001; Haedicke et al., 2000). Par ailleurs, une étude publiée cette année a montré l'expression de NKp46 sur 3 **MEITL** (Uemura et al., 2018), alors que 3 EATL précédemment décrits n'exprimaient pas NKp46 (Freud et al., 2013).

L'expression de KIR3DL2 a été particulièrement bien étudiée dans les lymphomes T cutanés primitifs (**CTCL**). Il a ainsi été montré que KIR3DL2 était un marqueur spécifique des cellules tumorales du syndrome de Sézary (**SS**) (Musette et al., 2003). Le SS est un lymphome T cutané primitif agressif qui associe une phase sanguine tumorale. KIR3DL2 peut servir de marqueur diagnostique du SS en combinaison avec T-plastin (PLS3), le facteur de transcription Twist et NKp46 analysés par PCR quantitative (Michel et al., 2013; Ortonne et al., 2008). Le développement d'un anticorps monoclonal dirigé contre KIR3DL2 (IPH4102) a permis en outre d'évaluer l'intérêt de KIR3DL2 comme cible thérapeutique dans le SS (Marie-Cardine et al., 2014). Cet anticorps est ainsi capable d'induire une cytotoxicité cellulaire (ADCC) contre les cellules primaires de Sézary KIR3DL2+ *ex vivo* (Marie-Cardine et al., 2014). Cet anticorps est actuellement en essai thérapeutique chez les patients porteurs d'un lymphome T cutané KIR3DL2+ (Schmitt et al., 2017). Le rôle de KIR3DL2

dans la lymphomagénèse du SS reste controversé. L'existence d'une population non tumorale clonale mais n'exprimant pas KIR3DL2 a été identifiée chez les patients porteurs d'un SS (Ortonne et al., 2006). Les LT KIR3DL2+ tumoraux ont un répertoire TCR restreint, ce qui suggère le rôle d'une sélection antigénique chronique dans l'expansion des LT KIR3DL2+ (Ortonne et al., 2006). Son rôle potentiel dans la survie des cellules tumorales est discuté. Il est possible que l'engagement de KIR3DL2 puisse promouvoir la survie cellulaire. En effet, la liaison de KIR3DL2 à l'anticorps agoniste AZ158 n'est pas capable à elle seule d'induire le recrutement de la phosphatase SHP-1 mais joue un rôle de co-récepteur inhibiteur du TCR en inhibant la mort cellulaire induite par la restimulation du TCR (AICD) (Thonnart et al., 2014). A l'inverse, il a été montré que la liaison de KIR3DL2 aux ODN-CpG dans les cellules de Sezary pouvait induire son internalisation et la déphosphorylation de STAT3, puis une activation des caspases et l'apoptose des cellules tumorales (Ghazi et al., 2015).

L'expression de KIR3DL2 a depuis été montrée dans une grande partie des lymphomes T cutanés (**Fig. 12**). Il est ainsi exprimé dans la moitié des mycosis fungoïdes (**MF**) et semble associé à la transformation en grandes cellules quand plus de 10% des cellules tumorales l'expriment (Battistella et al., 2017; Ortonne et al., 2012). Il est également exprimé par la plupart des lymphomes anaplasiques cutanés primitifs (**cALCL**), et sur 3 cas de lymphomes Tγδ cutanés (Battistella et al., 2017). Enfin, un cas de lymphome agressif cutané primaire épidermotrope CD8+ (**PCAETCL**) développé chez un patient porteur du VIH exprimait à la fois NKp46 et KIR3DL2.

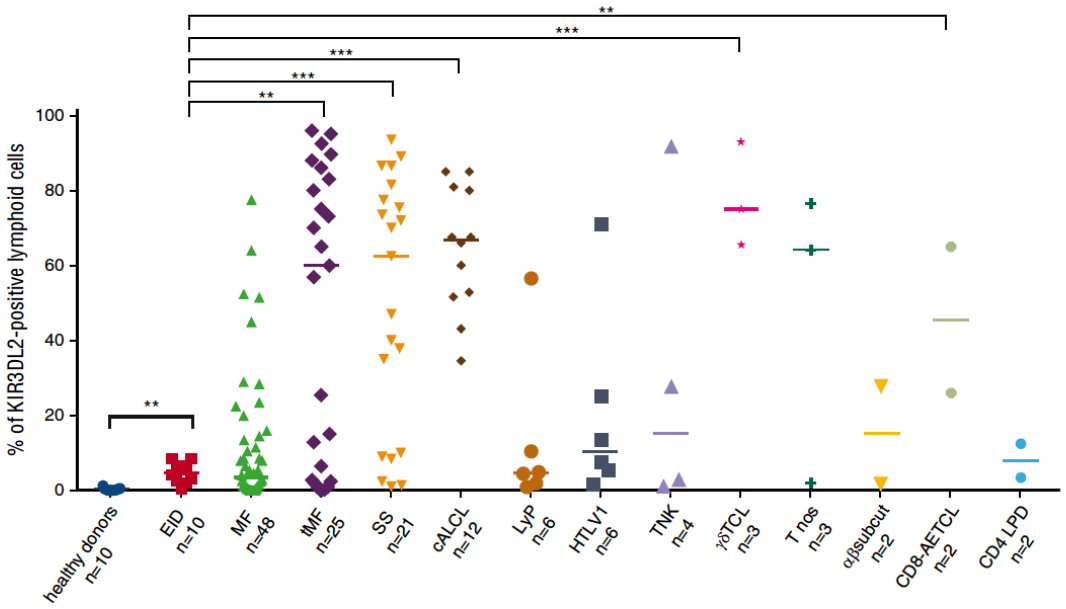


Figure 12 : Expression de KIR3DL2 dans les lymphomes T cutanés. EID : érythrodermie inflammatoire ; MF : mycosis fungoïde, tMF : MF transformé ; SS : syndrome de Sézary ; cALCL : lymphome anaplasique cutané primitif ; LyP : papulose lymphomatoïde ; HTLV1 : atteinte cutanée d'un ATL ; TNK : lymphome T/NK de type nasal ; αβ subcut : lymphome T sous-cutané de type panniculite; γδTCL : lymphome T γδ cutané ; CD8-AETCL : lymphome T cytotoxique épidermotrope agressif CD8+ ; T nos : lymphome T cutané non spécifié. *Battistella et al., Blood, 2018.*

3. Lymphomes T périphériques de type leucémique

Les cellules tumorales de la **leucémie à LGL** sont connues pour exprimer typiquement CD56 et CD57, et expriment dans une grande majorité de cas des récepteurs KIR (Lundell et al., 2005). KIR3DL2 est ainsi exprimé par 14% des cellules leucémiques CD3+CD57+ (contre 11% des LT physiologiques). Il a en outre été proposé qu'une population CD3+ NKp46+ minoritaire pouvant s'accumuler en présence d'IL-15, puisse être la cellule d'origine de la leucémie à LGL (Yu et al., 2011).

Pour finir, l'expression de KIR3DL2 avait été rapportée en cytométrie de flux chez 6 patients porteurs d'un **ATL** aigu, avec une hétérogénéité intra-clonale (Obama et al., 2007). Très récemment, une étude réalisée chez 18 patients porteurs d'un ATL a également rapporté l'expression de KIR3DL2 en immunohistochimie chez 12 des 18 patients étudiés sans lien entre la forme d'ATL et l'expression de KIR3DL2 (Hurabielle et al.).

4. Modèle murin de lymphome T périphérique

Un modèle murin TP53 déficient soumis à une stimulation antigénique chronique (par la bactérie *Streptococcus pneumoniae*, qui exprime les antigènes glycolipidiques connus pour activer les NKT**)** développe un lymphome T périphérique dérivant d'un lymphocyte NKT CD1d restreint (Bachy et al., 2016). Ce nouveau type de lymphome est caractérisé par l'expression de molécules associées aux cellules NK, en particulier des NKRs. Ce modèle murin permet d'étudier l'évolution physiologique des lymphocytes T connus pour devenir « innés » en présence d'une stimulation antigénique chronique (Seyda et al., 2016), ainsi que la lymphomagénèse spécifique des lymphomes T exprimant des caractéristiques de cellules innées.

Hémopathie	Récepteur NK	Nombre de cas	Méthode de Détection	Référence
Leucémie à LGL	KIR2DL1	15/21	CMF	*Lundell et al., 2005*
	KIR2DL2/2DL3			
	KIR3DL1/3DS1			
	KIR2DS4			
	KIR3DL2	22/23 (96%)		
	CD94/NKG2			
ATL	**KIR3DL2**	12/18 (67%)	IHC	*Hurabielle et al., 2018*
		6/7 (86%)	CMF	*Obama et al., 2007*
MF	**KIR3DL2**	22/48 (46%)	IHC (seuil > 5% des cellules tumorales)	*Battistella et al., 2017*
SS	**KIR3DL2**	18/21 (86%)	CMF	*Ortonne et al., 2008 ; Michel et al., 2013*
tMF	**KIR3DL2**	14/16 (87.5%)	RT-PCR et CMF (anti-KIR3DL2/DL1)	*Ortonne et al., 2012 ; Battistella et al., 2017*
	NKp30, **NKp46**			
cALCL	**KIR3DL2**	12/12 (100%)	IHC	*Battistella et al., 2017*
cγδ TCL	**KIR3DL2**	3/3 (100%)	IHC	*Battistella et al., 2017*
PCAETCL	**KIR3DL2**	1/1	IHC	*Karkouche et al. 2015*
	NKp46	1/1		
PTCL, NOS	**NKp46**	2/3	IHC	*Uemura et al., 2018*
	NKp46	1/14	IHC	*Freud et al., 2013*
	KIR3DL2	2/3	IHC	*Battistella et al., 2017*
ALCL	**NKp46**	5/12 (5/8 ALK+)	IHC	*Freud et al., 2013*
ENKL	CD94	5/9 et 5/5		*Dukers et al., 2001 ; Haedicke et al., 2000*
	KIR2DL1	3/9		
	KIR2DL2/2DL3	1/9		
	KIR3DL2	2/4		*Battistella et al. 2017*
	NKp46	59/66 et 3/3 (90%)	IHC ou CMF	*Freud et al., 2013 ; Uemura et al., 2018*
ANKL	**NKp46**	1/1	IHC	*Uemura et al., 2018*
EATL	CD94	3/5		*Dukers et al., 2001*
	CD94/NKG2A	2/11		*Haedicke et al., 2000*
	NKp46	0/3	IHC	*Freud et al., 2013*
MEITL	**NKp46**	3/3	IHC	*Uemura et al., 2018*
HS γδ TCL	CD94/NKG2A	1/1		*Haedicke et al., 2000*
	KIR2DL1/ KIR2DL2			

Leucémie à LGL : leucémie à grands lymphocytes à grains ; ATL : leucémie/lymphome T associé à l'HTLV-1 ; CTCL : lymphomes T cutanés ; MF : mycosis fungoïde : SS : syndrome de Sézary ; tMF : mycosis fundoïde transformé ; cALCL : lymphome anaplasique cutané primitif ; cγδ TCL: lymphoma T γδ cutané primitif; PCAETCL : lymphome T épidermotrope agressif cutané primitif ; PTCL, NOS : lymphome T périphérique, non spécifié ; ALCL : lymphome anaplasique ; ENKL : lymphome NK/T de type nasal ; ANKL : leucémie NK agressive ; EATL : lymphome T associé aux entéropathies ; MEITL : lymphome T intestinal monomorphe épidermotrope ; HS γδ TCL : lymphome T γδ hépatosplénique.

B. ROLE DES RECEPTEURS NK DANS LA LYMPHOMAGENESE

A l'image de leur impact sur les LT normaux, le rôle de ces NKRs dans la lymphomagénèse reste globalement mal connu. Dans la dernière partie de cette thèse, l'origine cellulaire des différents lymphomes T périphériques est discutée selon l'expression des NKRs et en fonction des données de la littérature et des résultats de ce travail. Enfin, si leur expression sur des lymphoproliférations cancéreuses peut être le reflet d'une origine cellulaire donnée, ces NKRs peuvent également témoigner d'un mécanisme physiopathologique sous-jacent ou jouer un rôle dans la survie et la prolifération des cellules tumorales. Il est ainsi tentant de leur assigner un rôle équivalent à leur fonction physiologique supposée.

Comme décrit plus haut, une stimulation antigénique chronique médiée par le TCR et/ou une activation cytokinique est capable d'entrainer l'acquisition de caractéristiques innées sur les LT normaux. En réponse à une stimulation chronique, ceux-ci sont physiologiquement exhaustés, surexpriment des marqueurs d'inhibition comme PD-1, CTLA4 ou LAG3, et ne sont pas capables de mettre en jeu une réponse immunitaire efficace. Il a été proposé que l'expression de NKRs permettait à ces LT la mise en oeuvre d'une réponse cytotoxique rapide dans un contexte signalisation TCR antigène spécifique déficiente (Wencker et al., 2014). Dans le cadre de la lymphomagénèse, on sait que plusieurs lymphomes T sont associés à une inflammation chronique ou à une maladie auto-immune, l'exemple type étant l'EATL qui survient dans un contexte de maladie coeliaque (cf chapitre "Physiopathologies et origines cellulaires présumées des lymphoproliférations T gastro-intestinales").

Le rôle d'une immunodépression prolongée ou d'une stimulation antigénique chronique dans la lymphomagénèse des lymphomes Tγδ hépatospléniques est également bien établi (Belhadj et al., 2003). Le profil d'expression de ces lymphomes rares est bien distinct des autres entités de PTCLs, mais se rapproche de celui des lymphomes NK/T, avec en particulier une surexpression des gènes codant pour les KIR et d'autres molécules associées aux cellules NK (Travert et al., 2012). De même, les lymphomes T cutanés sont souvent associés à des agents infectieux ou une

inflammation chronique et expriment également des NKRs, en particulier KIR3DL2. Les lymphomes NK/T sont des entités souvent considérées comme dérivées de cellules NK en raison de l'expression de NKRs. Néanmoins, une partie expriment un complexe CD3/TCR de surface et ont réarrangé leur *TCR*, ce qui explique pourquoi leur origine cellulaire reste discutée (Hong et al., 2016). Ils ont la particularité d'être liés au virus Epstein-Barr (EBV) dans tous les cas, qui est un critère diagnostique indispensable et joue probablement un rôle dans la lymphomagénèse. Contrairement aux lymphomes B associés à l'EBV, il n'est pas certain que les protéines de l'EBV puissent jouer un rôle transformant direct des LT. Même si cela reste du domaine hypothétique, il est ainsi possible que l'apparition d'un lymphome soit secondaire à une mauvaise réponse immunitaire locale à l'EBV et à une activation T chronique. Les mécanismes impliqués restent mal connus. Enfin, la leucémie à LGL, une entité classée dans les PTCL de type leucémique, se développe fréquemment chez des patients porteurs d'une pathologie auto-immune, comme la polyarthrite rhumatoïde, et expriment à la fois des marqueurs T et NK (Lundell et al., 2005). Une stimulation antigénique chronique médiée par le TCR participe donc probablement à la surexpression des NKRs dans les lymphomes T, comme cela a été proposé dans la physiologie des LT normaux (Björkström et al., 2012). Ainsi, divers modèles animaux développent des lymphoproliférations T de type inné ou NK en réponse à une stimulation antigénique chronique. La surexpression d'IL-15 dans des souris transgéniques est en particulier capable d'induire des lymphoproliférations à cellules exprimant des NKRs (Fehniger et al., 2001; Sato et al., 2011; Yu et al., 2011). Dans un modèle publié en 2016, les souris transgéniques exprimant constitutivement l'IL-15 vont développer des hémopathies T ressemblant à des lymphomes T cutanés ou à des leucémies LGL (Mishra et al., 2016). En outre, l'exposition prolongée de grands lymphocytes à grains à l'IL-15 induit une instabilité chromosomique et des anomalies de la méthylation aboutissant à la transformation en cellules cancéreuses (Mishra et al., 2012).

Il y a donc des arguments pour affirmer que l'expression de NKRs sur les cellules tumorales de plusieurs PTCLs pourrait donc être le témoin du processus de lymphomagénèse médié par une stimulation antigénique chronique TCR dépendante. En revanche, l'existence d'un rôle direct de ces NKRs sur la survie et la prolifération

des cellules tumorales reste discuté. Par analogie avec ce qui a été proposé dans le cadre des LT normaux, on peut penser que les NKRs activateurs pourraient participer à la prolifération cellulaire et que les NKRs inhibiteurs pourraient participer à la survie cellulaire en inhibant l'AICD, mais actuellement, peu de données convaincantes existent pour affirmer ces hypothèses.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'objectif de mon travail de thèse a été d'évaluer l'expression de NKRs dans deux groupes de lymphomes rares, les ATL et les lymphoproliférations T intestinales primitives.

Dans les ATL, la découverte de l'expression de KIR3DL2 nous a conduit à :

1. Caractériser le profil d'expression de KIR3DL2 dans les différentes formes d'ATL, ainsi que sur les LT CD4+ non clonaux des individus sains porteurs de l'HTLV-1, afin de l'utiliser comme outil diagnostique,

2. Tenter de comprendre le rôle et les modalités d'expression de KIR3DL2 dans la lymphomagénèse en questionnant l'origine cellulaire des ATL.

3. Enfin, grâce à un anticorps monoclonal actuellement en cours de développement clinique par la biotechnologie Innate Pharma, nous avons évalué KIR3DL2 comme cible thérapeutique directe dans l'ATL.

Dans les lymphoproliférations T intestinales primitives, la caractérisation de la cellule d'origine de la MCRII, définie comme un LIE de type inné iCD3+ CD103+ présentant des marqueurs à la fois T et NK, nous a permis :

1. D'étudier systématiquement l'expression des NKRs dans une optique d'aide au diagnostic de ces lymphoproliférations mal connues et difficiles à identifier.

2. D'évaluer l'intérêt d'un anticorps monoclonal dirigé contre NKp46 et couplé à une toxine dans les MCRII et les lymphoproliférations positives pour NKp46.

RÉSULTATS

ARTICLE 1

NKP46 IS A DIAGNOSTIC MARKER AND MAY BE A THERAPEUTIC TARGET IN INTESTINAL T-CELL LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASES

INTRODUCTION

Ce manuscrit résulte d'un travail collaboratif entre deux unités cliniques (le service d'Hématologie clinique à l'Hôpital Necker et de Gastroentérologie à l'HEGP) et deux unités de recherche (le laboratoire d'Immunité Intestinale - Dir Nadine CERF-BENSUSSAN et le laboratoire des maladies Hématologiques - Directeur Olivier HERMINE, tous deux à l'*Institut Imagine*).

Les lymphoproliférations T intestinales primitives (T-LPD GI) comprennent plusieurs entités de pronostic distinct, qui restent peu connues et souvent sous-diagnostiquées (Swerdlow et al., 2016). Les symptômes clinico-biologiques et histologiques se chevauchent largement entre ces entités, allant d'affections bénignes telles que la maladie cœliaque (MC) à des lymphomes extrêmement agressifs (Nijeboer et al., 2015b). Ces lymphomes agressifs comprennent deux entités, le lymphome T associé aux entéropathie (EATL), et le lymphome T monomorphe épithéliotrope intestinal (MEITL). L'EATL peut survenir chez des patients porteurs d'une MC ou d'une de ses complications, parfois non identifiée avant l'apparition du lymphome (Malamut et al., 2013). L'existence d'une MC ou d'une MC réfractaires au régime sans gluten de type 1 (MCR1) ou de type 2 (MCRII) est parfois difficile à mettre en évidence, et a un impact pronostique (Malamut et al., 2009). En outre, une pathologie indolente, appelée lymphoprolifération T indolente du tube digestif, a récemment été incluse comme entité provisoire dans la classification de l'OMS (Swerdlow et al., 2016). Le diagnostic précis de ces lymphoproliférations T intestinales primitive repose actuellement sur une approche multidisciplinaire (associant données cliniques, biologie moléculaire, cytométrie en flux et données histologiques) qui nécessite du temps et une expertise spécifique. De plus, l'analyse de cytométrie en flux des

lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) isolés à partir de biopsies duodénales fraîches n'est disponible que dans un petit nombre de centres spécialisés.

En conséquence, un lymphome intestinal primitif agressif peut être méconnu chez certains patients souffrant d'une entéropathie aspécifique. A l'inverse, le diagnostic peut être posé à tort et entrainer la mise en route de traitements intensifs inutiles chez des patients atteints d'une maladie indolente. Enfin, cette hétérogénéité mal reconnue rend difficile l'analyse des résultats des essais cliniques conduits dans ces pathologies.

L'équipe de Nadine CERF-BENSUSSAN a récemment publié un travail portant sur l'origine cellulaire de la MCRII. Les auteurs ont montré que la cellule pathologique de la MCRII dérivait d'une population distincte de LIE exprimant CD103 (αE) et CD3 en intra-cellulaire (iCD3), dépendante de l'IL-15 pour leur survie (Malamut et al., 2010; Mention et al., 2003). Cette population de LIE de type inné peut exprimer à la fois des NKRs et des antigènes LT, en réponse aux signaux combinés de NOTCH et de l'interleukine 15 (IL-15) (Ettersperger et al., 2016).

En raison du lien clonal entre MCRII et l'EATL, nous avons fait l'hypothèse que l'expression de récepteurs NK pouvait être une aide au diagnostic des lymphorpoliférations T intestinales primitives. Notre travail peut ainsi contribuer à la discussion sur leur origine cellulaire. Physiologiquement, l'expression de NKRs a été montrée dans les cellules NK, des cellules lymphoïdes innées (ILCs) de type 1 et d'un sous-ensemble de type 3, et dans certains LT de type inné. Cependant, l'expression des NKRs est moins connue dans les lymphomes T périphériques (PTCL). Or, ceux-ci sont classés en fonction de caractéristiques cliniques, phénotypiques et moléculaires permettant d'y associer une origine cellulaire présumée, ce qui justifie un phénotypage étendu des cellules tumorales.

Enfin, les options thérapeutiques disponibles dans les lymphoproliférations T intestinales sont actuellement limitées avec des résultats extrêmement médiocres. Grâce à une collaboration avec une société de biotechnologie, Innate Pharma, nous avons donc évalué l'intérêt de ces NKRs comme cible thérapeutique.

NKp46 is a diagnostic biomarker and may be a therapeutic target in intestinal T-cell lymphoproliferative diseases

Short title: NKp46 in intestinal lymphoproliferative diseases

Morgane Cheminant*[1-3], Julie Bruneau*[2-4], Georgia Malamut*[3,5,6], David Sibon[1-3], Nicolas Guegan[6], Tom Van Gils[7], Sascha Cording[6], Amélie Trinquand[3,8,9], Virginie Verkarre[3,4], Ludovic Lhermitte[3,8,9], Nicole Brousse[3,4], Anne-Sophie Jannot[10], Sherine Khater[3,5], Laurent Frenzel[1-3], Richard Delarue[1,3], Felipe Suarez[1-3], Ambroise Marçais[1,3], Chris JJ. Mulder[7], Elizabeth Macintyre[3,8,9], Vahid Asnafi[3,8,9], Laurent Pouyet[11], Cécile Bonnafous[12], Florence Lhospice[12], Thierry Jo Molina[3,4], Bertrand Meresse[3,6], **Christophe Cellier*[3,5,6], Nadine Cerf-Bensussan*[3,6], Olivier Hermine*[1-3], for the CELAC network°**

Affiliations: [1]Clinical Hematology, Necker-Enfants Malades University Hospital, AP-HP, Paris, France; [2]INSERM UMR1163 & CNRS URL 8254, *Imagine* Institute, Paris, France; [3]Paris Descartes University-Sorbonne Paris Cité, Paris, France; [4]Pathology Department, Necker-Enfants Malades University Hospital, AP-HP, Paris, France; [5]Department of Gastroenterology, HEGP Hospital, AP-HP, Paris, France; [6]INSERM UMR1163, Laboratory of Intestinal Immunity, *Imagine* Institute, Paris, France; [7]Department of Gastroenterology, VU University Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands. [8]Biological Hematology, Necker-Enfants Malades University Hospital, AP-HP, Paris, France; [9]INSERM UMR1151, Necker-Enfants Malades Institute, Paris, France; [10]Biomedical Informatics and Public Health Department, HEGP Hospital, AP-HP, Paris, France; [11]MI-mAbs, Marseille, France; [12]Innate Pharma, Marseille, France.

°for CELAC network see appendix

***The authors contributed equally to this work.**

Correspondence:

Pr Olivier Hermine, Department of Clinical Hematology, Necker Hospital, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France.

Phone number: +33(0)144495282

Fax number: +33(0)144385290

E-mail: ohermine@gmail.com

Authorship contributions: MC, JB, GM, OH and NCB conceptualized, supervised the study and wrote the manuscript. MC, JB, NG, TVG, SC provided data and data analysis. ASJ, MC contributed to statistical interpretation. MC, JB, GM, CC, NG, DS, TVG, CJJM, RD, FS, AM, LF, SK, BM, TJM, VA, EAM, VV, LL, AT, NB provided patient material and clinical data. MC, JB and OH obtained

fundings. All authors edited and approved the final version of the paper. MC, NCB and OH were responsible for the final version of the manuscript.

Statistics:

Text word count: 5638

Abstract word count: 269

Number of figures: 6

Number of tables: 0

Number of references: 39

Keywords: refractory celiac disease; NK receptors; intestinal lymphoma

Key Points:

1. NKp46 provides a novel biomarker for diagnosis in primary gastrointestinal T-cell lymphoproliferative diseases.
2. The anti-NKp46-PBD ADC may serve as an effective therapy for RCDII, EATL and MEITL.

ABSTRACT

BACKGROUND & AIMS:

Primary gastrointestinal (GI) T-cell lymphoproliferative diseases (T-LPD) are heterogeneous entities, which raise difficult diagnostic and therapeutic challenges. We have recently provided evidence that lymphomas complicating celiac disease (CD) arise from innate-like lymphocytes carrying NK receptors (NKRs).

METHODS:

NKRs expression was compared by flow cytometry in intraepithelial lymphocytes (IEL) from CD, type I (RCDI) or type II (RCDII) refractory CD. NKp46 was next assessed by immunohistochemistry in paraffin-embedded biopsies from 204 patients with CD, RCDI, RCDII or GI T-cell lymphomas and from a validation cohort of 61 patients. The cytotoxic properties of an anti-NKp46 monoclonal antibody conjugated to pyrrolobenzodiazepine (PBD) was tested *ex-vivo* in human primary tumor cells isolated from fresh duodenal biopsies.

RESULTS:

NKp46 (but not CD94, NKG2A, NKG2C, NKG2D) was significantly more expressed by malignant RCDII IEL than by normal IEL in CD and RCDI. In paraffin biopsies, detection of more than 25 NKp46+ IEL per 100 epithelial cells discriminated RCDII from CD and RCDI and was associated with a shorter survival (OS-5years 74.8% vs. 96.4%, p=0.0007). NKp46 was also detected in enteropathy-associated T-cell lymphomas (EATL, n=24/29) and in monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphomas (MEITL, n=4/4) but not in indolent T-cell LPD (n=0/15). Coherent with the severe outcome of EATL and MEITL, NKp46 expression was associated with a shorter survival (OS-5years 5.4% vs. 46.8%, p=0.0023). Treatment with anti-NKp46-PBD could efficiently and selectively kill human NKp46+ primary IEL *ex-vivo*.

CONCLUSIONS:

NKp46 is a novel biomarker useful for diagnosis and therapeutic stratification of GI T-LPD. Strong preclinical rationale identifies anti-NKp46-PBD as a promising therapy for RCDII, EATL and MEITL.

Keywords: refractory celiac disease; NK receptors; intestinal lymphoma

INTRODUCTION

Primary gastrointestinal (GI) T-cell lymphoproliferative diseases (T-LPD) are heterogeneous and diagnostically challenging entities[1]. Best defined entities are two highly aggressive lymphomas characterized by a 5-year survival rate shorter than 20%[2], the enteropathy-associated T-cell lymphoma (EATL), commonly associated with celiac disease (CD), and the monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma (MEITL), not associated with CD and more prevalent in Asia[1]. Because of their epitheliotropism and CD103 expression, both EATL and MEITL are thought to derive from intraepithelial lymphocytes (IEL)[3]. However, MEITL display a predominant positive T cell receptor (TCR) phenotype associated with CD8, CD56 and SYK expression[3] that are generally lacking in EATL. In 2016, the revised WHO classification of lymphoid neoplasms included a novel entity named indolent T-cell lymphoproliferative disease of the GI tract (indolent T-LPD) that is characterized by a good outcome[1,4–8]. In contrast to EATL and MEITL, indolent T-LPD tumor cells are made of small and mature TCRαβ+ T cells that express CD4 or CD8 and infiltrate predominantly the *lamina propria* where they likely arise[1,4–8]. Clinical and histological presentation may however mimic EATL or MEITL, leading to misdiagnosis and unnecessary aggressive treatment. Finally, besides these three malignant entities, an additional condition not yet recognized by the WHO classification is type II refractory CD (RCDII). As EATL, which it often precedes, this condition develops in a small subset of CD patients, who become refractory to the gluten free diet (GFD). In contrast with EATL, malignant cells have a normal cytological appearance and they do not divide actively. As they predominantly infiltrate the gut epithelium, RCDII can be viewed as an intraepithelial lymphoma. More specifically, RCDII is characterized by a clonal expansion of IEL displaying clonal TCRγ rearrangements and intracellular CD3 but no surface CD3-TCR complexes. Prognosis is poor due to the frequent severe malnutrition refractory to GFD and to the risk of transformation into overt clonally related EATL [9–13]. Diagnosis of RCDII is very challenging, as regular morphological analysis does not allow differentiation of RCDII malignant IEL from the normal IEL, that infiltrate the gut in CD. RCDII can notably be difficult to differentiate from slow response to GFD and from type I refractory CD (RCDI), a non-malignant complication of CD of as yet poorly understood mechanism[12,14].

In order to allow the accurate diagnosis of GI T-LPD that is indispensable to adjust therapy, we have developed a multidisciplinary diagnostic approach combining immunohistochemistry and molecular T-Cell Receptor gene (*TCR*) rearrangement analyses in biopsies with multiparameter flow-cytometry (MFC) on lymphocytes isolated from fresh duodenal biopsies[15–17]. However, this approach is time consuming and IEL MFC is only available in a small number of specialized centers, emphasizing the need to develop diagnostic criteria adapted to individual patient management. We recently demonstrated that RCDII IEL arise from a subset of innate-like lymphocytes with dual T and natural killer (NK) cell traits that are imprinted during their differentiation in response to combined signals from NOTCH and interleukin 15 (IL-15)[18].

We therefore investigated whether NK receptors might be used as a diagnosis marker to simplify the diagnosis of lymphomas complicating CD but also to stratify primary GI T-LPD according to their origin and/or prognosis. In addition, we hypothesized that NK receptors could serve as novel therapeutic targets in these debilitating diseases.

METHODS AND PATIENTS

Patients and clinical data

The records of 84 CD or RCD and 48 GI T-cell lymphoma patients enrolled prospectively in the French national CELAC registry until May 2017 were reviewed (see the **Supplementary Fig.1,** flow-chart). Intestinal biopsies were obtained according to INSERM protocol C08-34, which was approved by the Ile-de-France Ethics committee II (Paris, France). The observation time was the interval between diagnosis and last contact (last follow-up or death). Mean follow-up was 4.7 years. Diagnosis of CD was based on HLA-DQ2/8 typing, the detection of celiac specific antibodies, such as anti-tissue transglutaminase (anti-TGA), anti-endomysial antibody (anti-EMA), and the presence of villous atrophy with an increase of IEL in intestinal biopsies. RCD was defined by persistent malnutrition syndrome and villous atrophy after one year of strict adherence to GFD and was further divided into RCDI and RCDII. RCDI was diagnosed in the absence of detectable monoclonal TCRγ rearrangement with normal CD8+ T-IEL phenotype. Conversely RCDII was characterized by monoclonal TCRγ rearrangement associated with abnormal IEL phenotype, defined by >50% CD3+ but CD8- IEL by IHC of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) sections, and/or >25% negative surface CD3 (sCD3) of CD45+ IEL isolated from fresh biopsies by multiparameter flow cytometry (MFC)[15]. Flow cytometry can notably allow differentiating normal T cells with sCD3-TCR complexes from RCDII malignant IEL, which display intracellular CD3 (iCD3) but generally neither sCD3 nor CD8. Enteropathy-associated T-cell lymphoma (EATL) and monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma (MEITL) were diagnosed according to the revised WHO classification of lymphoid neoplasia[1]. Although EATL generally manifests with CD30+ cells and wide range cytology features, MEITL was monomorphic, with marked epitheliotropism and usually CD8+ CD56+ small to medium-sized cells. Indolent T-cell lymphoproliferative disease of the GI tract (indolent T-LPD) was diagnosed as previously described[78] and is characterized by a dense but non-destructive lymphoid infiltrate of small CD4 or CD8+ lymphoid cells, with monoclonal TCRγ rearrangement. Surgical samples from control patients, as well as from patients with other inflammatory bowel diseases (IBD) (n=12) were obtained in accordance with National guidelines. The validation cohort consisted of 61 CD, RCDI, and RCDII patients from VU University Medical Center (Amsterdam, the Netherlands) diagnosed between June 2002 and January 2017 (45 cases) and from Necker Hospital (Paris, France) from May to October 2017 (16 cases). An expert panel of pathologists (JB, NB, VV) blinded to NKp46 status reviewed all cases.

Multiparameter Flow Cytometry

IEL were isolated from fresh duodenal biopsies and multiparameter staining of lymphocytes was performed as previously described[15,16] with 8-color mixes of antibodies against CD3ε, CD4, CD8α,

CD45, CD103, TCRαβ, TCRγδ, CD122, CD127, CD56, CD16, NKp46, NKG2A, CD94, NKG2C, NKG2D. Data were analyzed on a FACSCanto II using FlowJo v10.2 software (BD Biosciences).

Immunohistochemistry

A minimum of four formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE, 10% formalin) GI biopsies were stained with Hematoxylin and Eosin (HES) and reviewed by three expert pathologists (J.B., N.B. and V.V.). Villous atrophy was graded and counts of IEL enumerated according to Oberhuber *et al*[19,20]. Antigen detection included CD3, CD8, CD30, CD4, Granzyme B, CD103 and NKp46 (8E5B, Innate Pharma). The number of NKp46+ IEL per 100 epithelial cells (NKp46+ IEL/100 EC) was assessed on well-orientated serial sections by counting about 500 EC. In EATL, MEITL and indolent T-LPD, NKp46 expression, count of NKp46+ large cells, and distribution (membrane and intracellular) were assessed on neoplastic cells.

Conjugate preparation

8B6A-PBD is a mouse monoclonal anti-NKp46 antibody drug conjugated (ADC) to the selective DNA alkylating compound pyrrolobenzodiazepine dimers (PBD, SG-1882 ref Kung Sutherland Blood 2013) with a drug antibody ratio of 1.9, according to a protocol adapted from Lhospice *et al*[21].

Apoptosis and internalization assays

For *ex-vivo* cytotoxicity assays, primary cells isolated from fresh duodenal biopsies were incubated for 96 hours with IL-15 added or not with 8B6A-PBD, IC-PBD, deglycosylated anti-NKp46 antibody (two negative controls) or PBD (positive control). Cell viability was measured using Annexin V-FITC and red-fluorescent Propidium Iodide. To study internalization, anti-NKp46 and control isotype (IC) were labeled with the pH-sensitive fluorescent dye CypHer5E. The CypHer5E signal was analyzed in surface CD3- (sCD3) CD103+ NKp46+ cells, enabling robust discrimination of antibody internalization from surface binding.

Statistical analysis

Continuous data were summarized using median and compared using the non-parametric Mann–Whitney test because of skewed distributions. Confidence intervals were estimated using a continuity correction. Graphics and statistical analysis were performed using GraphPad/Prism7 and R software. P-value < 0.05 was considered statistically significant.

Analysis on CD and RCD discovery cohort: ROC-curve analysis was performed to calculate the performance of the NKp46 marker to predict RCDII and to define the NKp46+ IEL / 100 EC threshold optimizing sensitivity and specificity. Thereafter, two groups were defined in the CD and RCD patients, depending on this threshold. Survivals were estimated using the Kaplan-Meier method on these two groups and comparisons were made using the log-rank test.

Analysis on RCDII subgroup: Cox's regression was used to assess the association between the NKp46+ IEL / 100 EC value and survival and/or EATL transformation. Comparisons between RCDII with NKp46+ IEL / 100 EC below and above 70 were made using the log-rank test.

Analysis on validation cohort: NKp46 expression was assessed blinded on IEL. Using the previously defined cut-off of 25 NKp46+ IEL/100 EC, ROC-curve analysis was performed and sensitivity and specificity were calculated.

Analysis on primary GI T-cell lymphoma: The NKp46 was assessed as positive or negative to define two groups. Survivals were estimated using the Kaplan-Meier method on these two groups and comparisons were made using the log-rank test.

Analysis on ex-vivo experiments: Percentages of remaining alive tumor cells were compared using the non-parametric Mann–Whitney test.

RESULTS

At diagnosis, NKp46 (CD335) expression discriminates RCDII from CD and RCDI patients

Expression of NK cell receptor was compared on IEL sorted from fresh duodenal biopsies in 15 CD, 7 RCDI and 21 RCDII patients by MFC. Frequency of NKp46+ IEL in CD45+ cells was significantly higher in RCDII samples (median 63.3% [22.7-95.2%]) than in CD and in RCDI samples (median 9.2% and 9.7% respectively, p<0.0001). In contrast, the distribution of other NK cell receptors (CD94, NKG2A, NKG2C and NKG2D) had a less discriminating power between RCDII and RCDI or CD (p=0.0148, p=ns, p=0.0148 and p=ns for CD94, NKG2A, NKG2C and NKG2D respectively) (**Fig. 1A**). NKp46 expression was next assessed by IHC in FFPE small bowel biopsies from 14 active CD (ACD), 23 RCDI and 34 RCDII patients at diagnosis, as well as in 13 healthy patients and in 12 patients with other IBD. Median count of IEL was 53 per 100 EC ([20-120]) in ACD and RCDI, and 77.5 per 100 EC RCDII ([25-150]). A monoclonal *TCRγ* rearrangement was found in all RCDII patients and in only one patient suspect of RCDI. In this patient, resistance to GFD was however previously ascribed to the mucosal localization of leukemic CD3+ TCRαβ+ CD8+ CD57+ large granular lymphocytes which explained the detection of the monoclonal *TCRγ* rearrangement[22].

In all newly diagnosed RCDII patients, abnormal IEL harbored NKp46 positivity, which was often strong and membranous. Four RCDII cases presented with granular NKp46 expression characterized by intracellular dots. Histologic details, NKp46+ in CD45+ IEL by MFC and *TCR* rearrangement on RCDII patients are shown in **supplementary Table 1**. In contrast, in all ACD and RCDI patients, a low number of IEL were positive for NKp46 (**Fig. 1C)**.

Median counts of NKp46+ IEL/100 EC were higher in RCDII than in CD and RCDI patients (68 [25-150] vs. 3 [0-15], p<0.0001) (**Fig. 1B**). Median counts of NKp46+ IEL/100 EC were also low in healthy controls (5, [0-15]) and in patients with non-celiac enteropathies (7.5, [0-20]) (**Fig. 2C and Supplementary Table 2**). Numbers of NKp46+ IEL determined by IHC correlated with frequencies of NKp46+ IEL defined by MFC (Pearson's correlation coefficient r=0.76, p<0.0001) (**Supplementary Fig. 2)**.

ROC analysis showed an area under curve of 1 with a threshold of 25 NKp46+ IEL/100 EC perfectly discriminating RCDII from CD and RCDI patients, with positive and negative predictive values of 100% [95%IC 88-100] (**Fig. 2A**). Accordingly and in contrast with CD or RCDI patients, all RCDII patients had more than 25 NKp46+ IEL/100 EC (**Fig. 1B and Supplementary Table 1**). In the validation cohort, which consisted of 26 RCDII and 35 CD or RCDI patients, ROC area under curve was estimated to be 0.916, p<0.0001 (**Fig. 2B**). Using the cut-off of 25 NKp46+ IEL/100 EC, the predictive performance in the validation cohort assessed blinded was high, with positive and negative predictive values of 95% [95%IC 75-100] and 87% [95%IC 72-95] respectively (**Fig. 2C and Supplementary Table 3)**. According to NKp46 expression, there were 5 false negative cases, as 5 RCDII cases were wrongly classified as CD or RCDI patients. However, details on these cases showed

that 2 out of these 5 RCDII cases can be reclassified as CD/RCDI, as case A12 was polyclonal and case A13 presented a low number of abnormal IEL by MFC (20%) with negative celiac serology. Moreover, one case (A29) was classified as RCDII with an increase number of malignant IEL by MFC (37% CD7+ sCD3- iCD3+ IEL) but with partial villous atrophy and low percentage of IEL by IHC (30 IEL/100 EC), that was concordant with the count of NKp46+ IEL assessed blinded by IHC (20 NKp46+ IEL/100 EC). Despite the apparent subnormal biopsy, this patient was considered as a false negative case because the count of NKp46+ IEL/100 EC was under 25. Of note, more than 50% of IEL are NKp46+ by IHC that is concordant with RCDII diagnosis as previously published[23] (**Supplementary Table 4)**. According to NKp46 expression, there was one false positive case, as one RCDI case was wrongly classified as RCDII patients. In conclusion, after centralized review by both teams (Necker and VU hospital), NKp46 expression assessment was able to reclassify most equivocal diagnoses.

As a clinical confirmation of the diagnostic role of this threshold in CD and RCD patients, counts over 25 NKp46+ IEL/100 EC correlated with significantly reduced overall survival (5-year rate of OS 74.8% vs. 96.4%, p=0.0007) (**Fig. 4A**). Analysis using Cox model did not reveal any association between NKp46+ IEL counts and either EATL occurrence or death in RCDII patients (**Supplementary Fig. 4**). Twenty sequential biopsies of 6 RCDII patients were analyzed after specific treatments. Median NKp46+ IEL/100 EC counts decreased from 68 [25-150] in newly diagnosed RCDII patients to 30 [0-100] (p=0.0008) after treatment (**Fig. 2C**).

NKp46 is selectively expressed in aggressive subtypes of primary GI T-cell lymphoma

A total of 48 newly diagnosed EATL (n=29), MEITL (n=4) or indolent T-LPD (n=15) patients were included. The diagnosis was performed on intestine, lymph node and other tissues in 38, 5 and 5 cases respectively. In healthy controls, NKp46 was expressed in only rare lymphocytes localized in T-areas of normal lymph nodes and tonsils. The 29 EATL were all characterized by an infiltrate of large tumor cells that were usually CD8 and CD56 negative but CD30 positive. The four MEITL cases presented with CD3+ CD8+ CD56+ small to medium-sized tumor cells. The 15 indolent T-LPD patients presented with a non-destructive T cell infiltrate that expressed CD4 in 13 and CD8 in 2 cases.

NKp46 was expressed in 83% of EATL (n=24/29) and 100% of MEITL cases (n=4/4) (**Fig. 3**). In EATL cases, NKp46 staining was heterogeneous with weak to strong expressions. Twelve positive EATL patients presented an intracellular NKp46 expression with positive dots (n=12/24); six of them displayed both membranous and intracellular NKp46 expression. The frequencies of EATL NKp46+ large cells varied between 50 and 100% of tumor cells with a majority of patients having more than 80% of NKp46+ tumor cells (n=21/24) (**Supplementary Table 5**). Among the 24 NKp46+ EATL, 11 cases complicated CD or RCDI and 13 RCDII. Among the 5 NKp46-negative EATL, two complicated RCDII and two CD or RCDI (in one patient, history was not available) (**Supplementary Fig. 5**). Four MEITL patients expressed NKp46 in all cases. The NKp46 expression was membranous

with an intermediate to strong intensity in the 4 patients. The frequencies of MEITL NKp46+ tumor cells varied between 50 and 100% of tumor cells (**Supplementary Table 5)**. On the contrary, NKp46 was never expressed by CD4 or CD8 positive T cell infiltrates that characterized indolent T-LPD cases (n=0/15) (**Fig. 3**).

The diagnostic value of NKp46 expression was confirmed by the associated-prognostic impact of NKp46 expression in our cohort of primary GI T-cell lymphomas. The 5-year rate of OS was significantly shorter in NKp46+ cases compared to NKp46 negative cases (5-year OS 5.4% vs. 46.8%, p=0.0023) (**Fig. 4B**). NKp46+ cases included 24 EATL and 4 MEITL, accounting for the extremely dismal prognosis associated with NKp46 expression. NKp46 negative cases included 5 EATL and the 15 indolent T-LPD. In EATL patients, however, prognosis was similar regardless NKp46 expression (**Supplementary Fig. 6**).

8B6A-PBD efficiently eliminates NKp46+ primary tumor cells.

As a proof of concept, a monoclonal antibody conjugated to pyrrolobenzodiazepine (PBD), directed against NKp46, was assessed on NKp46+ primary malignant IEL. *Ex-vivo* analysis of RCDII IEL freshly isolated from duodenal biopsies demonstrated efficient internalization of anti-NKp46-CypHer5E as shown by the 6-fold increase of median fluorescent intensity after a 24 hour-incubation compared to cells incubated with IC-CypHer5E (**Fig. 5A**). Accordingly, freshly isolated primary NKp46+ RCDII IEL were efficiently killed by 8B6A-PDB but not by IC-PDB and, after 96h, apoptosis induced by 8B6A-PBD in NKp46+ cells was similar to that induced by PBD alone at a 50 fold higher molar concentration (p=0.03) (**Fig. 5B)**. The effect was target specific, since normal residual sCD3+CD7+ IEL which did not express detectable levels of the NKp46 antigen, were unaffected by the conjugate (**Supplementary Fig. 7)**.

DISCUSSION

Classification, pathophysiology and prognosis of primary intestinal T-LPDs merit further investigation since therapeutic options are not yet standardized. Based on the retrospective analysis of a large French CELAC cohort, a national registry, and on a validation cohort from Holland, we show that NKp46 expression is a useful biomarker for identifying lymphomas complicating CD and for refining diagnosis in the heterogeneous group of GI T-LPD. In addition, we provide here evidence that NKp46 might represent a novel therapeutic target in NKp46-positive intestinal LPD, a group of severe diseases lacking efficient therapy.

We recently demonstrated that RCDII malignant lymphocytes, which develop in the gut epithelium of patients with CD, arise from innate-like lymphocytes with dual T and NK traits. In keeping with these findings, we show that NKp46 expression is a hallmark of RCDII IEL, shared by EATL. Since NKp46 can be easily detected in FFPE tissue sections by the novel anti-NKp46 8E5B antibody, NKp46 represents a robust marker to facilitate the diagnosis of RCDII. This rare but severe complication of CD, which frequently precedes the onset of overt EATL, can be considered as an intraepithelial lymphoma. Due to their normal cytology and intracellular expression of CD3, RCDII IEL can be easily mistaken for normal T-IEL infiltrating the CD epithelium. As a consequence, current diagnosis of RCDII is very difficult in the absence of flow cytometry and *TCR* clonality analyses. Herein, we show that a threshold of 25 NKp46+ IEL/100 EC allowed differentiation of RCDII from uncomplicated CD or from non-malignant cases of CD refractory to GFD (RCDI), with high sensitivity and specificity. Moreover, counts of NKp46+ IEL above 25/100 EC were associated with decreased survival rate (5-year rate of OS 75% vs. 96%, p=0.0007) in keeping with previous data comparing the outcome of RCDII and RCDI patients[12,13]. In comparison with other pan–NK cell markers such as CD16 and CD56, which are frequently expressed on normal T cells, monocytes, and/or granulocytes, NKp46 (CD335, NCR1) is a highly conserved member of the natural cytotoxicity receptor (NCR) family that is more specific of NK and innate lymphoid cells[24]. It has also been suggested that NKp46 identifies a functionally distinct cellular subset in mice and humans that is susceptible to leukemic transformation in the presence of excessive IL-15[25]. Our study indicates that NKp46 is a marker for the malignant RCDII cells and, as such, could be considered a tumor-associated antigen.

Given the clonal relationship and thereby common cellular origin between RCDII and EATL, it is not surprising that NKp46 was also often expressed in EATL tumor cells. Only rare EATL cases did not express NKp46. This may reflect a loss in surface antigens during the malignant evolution process, as suggested by one case with a concomitant NKp46 expression in RCDII cells without NKp46 expression in EATL tumor cells. Interestingly, NKp46 was also expressed by all 4 cases of MEITL studied, a second type of very aggressive intestinal lymphoproliferation, in which tumor cells co-express CD8 and the NK receptor CD56 and are also thought to arise from IEL[3]. The two

lymphomas may however arise from distinct subsets of IEL. MEITL have a predominant positive TCR phenotype associated with CD8, CD56 and SYK expression[3] while EATL, in keeping with their usual transformation from clonal innate-like RCDII IEL, have mainly a silent TCR phenotype[26–30]. In contrast with EATL an MEITL, none of the indolent T-LPD, whether CD4+ or CD8+, expressed NKp46. In keeping with our published data[8], CD4 positive cases of indolent T-LPD were more frequent in our series than CD8 positive cases. Distribution of CD4 versus CD8 seems variable in indolent T-LPD, with one report of 8/10 CD8 positive cases[7] while others exclusively reports CD4 positive cases[4–6] . Since indolent T-LPD are very rare, they remain largely unrecognized and are often misdiagnosed either as refractory CD or as aggressive peripheral T-cell lymphoma (PTCL), leading, in the latter case, to unnecessary intensive therapy[7]. NKp46 thus emerges as a powerful biomarker to discriminate primary GI T-LPD, particularly indolent T-LPD from both RCDII and EATL or MEITL. As a confirmation of this diagnostic impact, almost all NKp46+ GI T-cell lymphoma patients had died within 5 years of diagnosis, whereas 50% were alive if NKp46 was negative. Since NKp46 negative primary GI T-cell lymphoma were mainly indolent T-LPD, our results confirm the relatively good prognosis usually associated with this entity, which is often efficiently controlled by corticosteroids for long periods (5-year rate of OS 57% in our cohort, **Supplementary Fig. 8**)[7]. In contrast, and as previously reported, outcome of MEITL and EATL, which were mainly NKp46+, was extremely poor despite intensive chemotherapy and autologous stem cell transplantation[31–35]. Overall, by discriminating between GI T-LPD with very distinct outcomes, NKp46 expression provides an invaluable diagnostic marker, which should help therapeutic decision. We thus propose a novel simplified algorithm for primary GI T-LPD showing how adding NKp46 expression study to classical histological criteria may guide diagnosis and improve therapeutic management **(Fig. 6)**. Moreover, it has been suggested that expression of NK receptors is restricted to true NK cell lymphomas and a subset of intestinal enteropathy-type T cell lymphomas with a cytotoxic phenotype[36–39]. We thus assessed the NKp46 expression in other PTCL as these may occasionally affect the GI tract (data not shown). NKp46 was strongly expressed on NK/T-cell lymphoma (n=32/38) and weakly on anaplastic large-cell lymphoma (n=5/7), as it was previously suggested in a cohort of various lymphomas[38,39]. The NKp46 expression was more confidential in other PTCL (PTCL, NOS n=1/10; angioimmunoblastic T-cell lymphoma n=0/9; adult T-cell leukemia/lymphoma n=2/8). It thus remains possible to wrongly conclude to an indolent T-LPD diagnosis in the rare cases of intestinal localization of another aggressive NKp46 negative PTCL.

As in most PTCL, there is no standard of care for newly diagnosed EATL and MEITL patients and both types of lymphoma were highly refractory to all chemotherapy regimens used so far[31–35]. In addition, although RCDII patients can generally be improved by corticosteroids for variable periods of time, curative treatment is still lacking and frequent severe malnutrition and evolution to EATL, with the latter further accelerated by immunosuppressive therapies[12], highlighting the need for novel, and if possible targeted, therapies. Since NKp46 is frequently expressed by tumor cells in severe GI T-LPD

whereas its expression is restricted to minor normal cell subsets, mainly NK and innate lymphoid cells, we hypothesized that NKp46 could be a promising therapeutic target. In order to target tumor cells within tissues, we linked the PBD cytotoxic drug to an endocytosed version of the anti-NKp46 monoclonal antibody, generating ADC that can selectively deliver the drug into tumor cells. As a proof of concept, we showed that 8B6A-PBD could selectively and efficiently kill freshly isolated human primary NKp46+ RCDII IEL *ex-vivo*. Therefore these data provide an experimental rationale for considering clinical studies using anti-NKp46 ADC in the treatment of NKp46+ GI T-LPD.

In conclusion, our study shows that NKp46 is a novel and handy biomarker to clarify diagnosis of GI lymphoproliferations and to guide individual patient management. In addition, our findings open the path to a novel therapy in RCDII, EATL and in MEITL.

Acknowledgements:

We thank all clinicians and pathologists for contributing diagnostic and for help with sample management in the CELAC network: °Yoram Bouhnik, Charles-André Cuenod, Sabine Brechignac, Matthieu Allez, Jacques Cosnes , Agnès Fourmestraux, Jean-Charles Delchier, Jehan Dupuis, Corinne Haioun, Taoufik El Gnaoui, Eric Lerebours, Guillaume Savoye, Herve Tilly, Bernard Flourie, Bertrand Coiffier, Xavier Hebuterne, Nadia Arab, Jérôme Filippi, Stéphane Schneider, Frank Zerbib, Noel Milpied, Krimo Bouabdallah, Reza Tabrizi, Stéphane Vigouroux, Arnaud Pigneux, Thibaut Leguay, Marie-Sarah Dilhuydy, Charles Dauriac, Serge Bologna, Cyrille Hulin, Caroline Bonmati, Fréderic Magnin, Dana Ranta, Tamara Matysiakbudnik, Eric Deconinck, Philippe Pouderoux, Bruno Bonaz, Remy Gressin, Franck Carbonnel, Jean-Marc Gornet, Julien Branche, Georgette Saint-Georges, Jean-Marie Reimund, Stéphane Nancey, Maria Nachury, Stéphanie Viennot, Camille Zallot, Bettina Fabiani, Lysiane Marthey, Karine Juvin, Yann Le Baleur, Sandy Kwiatek, Eric Saillard, Dominique Louvel, Xavier Roblin, Philippe Beau, Pierre Feugier, Laurent Peyrin-Biroulet, Hélène Zanaldi, Hedia Brixi-Benmansour, Guillaume Cadiot, Thierry Lecomte, Jean-Francois Bretagne, Olivier Casasnovas, Denis Caillot, Laurent Bedenne, Jacques-Olivier Bay, Corinne Bouteloup, Bernard Duclos and Carine Foucaud.

Disclosure of Conflicts of interest:

F. Lhospice and C. Bonnafous are senior directors and have ownership interest (including patents) in Innate Pharma. M. Cheminant, J. Bruneau and O. Hermine received research grants from Innate Pharma. The other authors disclosed no potential conflicts of interest.

Grant Support:

The study was financially supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Innate Pharma (Marseille, France), Institut national du cancer (INCA), la ligue contre le cancer, l'association pour la recherche contre le cancer, and Université Paris Diderot. MC is a recipient of grant from INCA.

Supplementary information is available on the …'s website

REFERENCES

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood 2016;127(20):2375–90.

2. Nijeboer P, Malamut G, Mulder CJ, et al. Enteropathy-associated T-cell lymphoma: improving treatment strategies. Dig Dis Basel Switz 2015;33(2):231–5.

3. Mutzbauer G, Maurus K, Buszello C, et al. SYK expression in monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc 2017;

4. Carbonnel F, d'Almagne H, Lavergne A, et al. The clinicopathological features of extensive small intestinal CD4 T cell infiltration. Gut 1999;45(5):662–7.

5. Svrcek M, Garderet L, Sebbagh V, et al. Small intestinal CD4+ T-cell lymphoma: a rare distinctive clinicopathological entity associated with prolonged survival. Virchows Arch Int J Pathol 2007;451(6):1091–3.

6. Margolskee E, Jobanputra V, Lewis SK, Alobeid B, Green PHR, Bhagat G. Indolent small intestinal CD4+ T-cell lymphoma is a distinct entity with unique biologic and clinical features. PloS One 2013;8(7):e68343.

7. Perry AM, Warnke RA, Hu Q, et al. Indolent T-cell lymphoproliferative disease of the gastrointestinal tract. Blood 2013;122(22):3599–606.

8. Malamut G, Meresse B, Kaltenbach S, et al. Small intestinal CD4+ T-cell lymphoma is a heterogenous entity with common pathology features. Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc 2014;12(4):599-608.e1.

9. Halfdanarson TR, Litzow MR, Murray JA. Hematologic manifestations of celiac disease. Blood 2007;109(2):412–21.

10. Al-toma A, Verbeek WHM, Mulder CJJ. The management of complicated celiac disease. Dig Dis Basel Switz 2007;25(3):230–6.

11. Rubio-Tapia A, Kelly DG, Lahr BD, Dogan A, Wu T-T, Murray JA. Clinical staging and survival in refractory celiac disease: a single center experience. Gastroenterology 2009;136(1):99–107; quiz 352–3.

12. 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.

13. Malamut G, Chandesris O, Verkarre V, et al. Enteropathy associated T cell lymphoma in celiac disease: a large retrospective study. Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver 2013;45(5):377–84.

14. Malamut G, Meresse B, Cellier C, Cerf-Bensussan N. Refractory celiac disease: from bench to bedside. Semin Immunopathol 2012;34(4):601–13.

15. Cellier C, Delabesse E, Helmer C, et al. Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. French Coeliac Disease Study Group. Lancet Lond Engl 2000;356(9225):203–8.

16. Mention J-J, Ben Ahmed M, Bègue B, et al. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. Gastroenterology 2003;125(3):730–45.

17. Malamut G, El Machhour 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):2131–43.

18. Ettersperger J, Montcuquet N, Malamut G, et al. Interleukin-15-Dependent T-Cell-like Innate Intraepithelial Lymphocytes Develop in the Intestine and Transform into Lymphomas in Celiac Disease. Immunity 2016;45(3):610–25.

19. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. Eur J Gastroenterol Hepatol 1999;11(10):1185–94.

20. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). Gastroenterology 1992;102(1):330–54.

21. Lhospice F, Brégeon D, Belmant C, et al. Site-Specific Conjugation of Monomethyl Auristatin E to Anti-CD30 Antibodies Improves Their Pharmacokinetics and Therapeutic Index in Rodent Models. Mol Pharm 2015;12(6):1863–71.

22. Malamut G, Meresse B, Verkarre V, et al. Large granular lymphocytic leukemia: a treatable form of refractory celiac disease. Gastroenterology 2012;143(6):1470-1472.e2.

23. Cellier C, Patey N, Mauvieux L, et al. Abnormal intestinal intraepithelial lymphocytes in refractory sprue. Gastroenterology 1998;114(3):471–81.

24. Diefenbach A, Colonna M, Koyasu S. Development, differentiation and diversity of innate lymphoid cells. Immunity 2014;41(3):354–65.

25. Yu J, Mitsui T, Wei M, et al. NKp46 identifies an NKT cell subset susceptible to leukemic transformation in mouse and human. J Clin Invest 2011;121(4):1456–70.

26. Nairismägi M-L, Tan J, Lim JQ, et al. JAK-STAT and G-protein-coupled receptor signaling pathways are frequently altered in epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma. Leukemia 2016;30(6):1311–9.

27. 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.

28. Nicolae A, Xi L, Pham TH, et al. Mutations in the JAK/STAT and RAS signaling pathways are common in Intestinal T-cell Lymphomas. Leukemia 2016;30(11):2245–7.

29. 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):1371–86.

30. 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.

31. 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 Off J Am Soc Clin Oncol 2000;18(4):795–803.

32. Sieniawski M, Angamuthu N, Boyd K, et al. Evaluation of enteropathy-associated T-cell lymphoma comparing standard therapies with a novel regimen including autologous stem cell transplantation. Blood 2010;115(18):3664–70.

33. 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):148–55.

34. 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):663–8.

35. Nijeboer P, de Baaij LR, Visser O, et al. Treatment response in enteropathy associated T-cell lymphoma; survival in a large multicenter cohort. Am J Hematol 2015;90(6):493–8.

36. Haedicke W, Ho FCS, Chott A, et al. Expression of CD94/NKG2A and killer immunoglobulin-like receptors in NK cells and a subset of extranodal cytotoxic T-cell lymphomas. Blood 2000;95(11):3628–30.

37. Dukers D, Vermeer M, Jaspars L, et al. Expression of killer cell inhibitory receptors is restricted to true NK cell lymphomas and a subset of intestinal enteropathy-type T cell lymphomas with a cytotoxic phenotype. J Clin Pathol 2001;54(3):224–8.

38. Freud AG, Zhao S, Wei S, et al. Expression of the Activating Receptor, NKp46 (CD335), in Human Natural Killer and T-Cell Neoplasia. Am J Clin Pathol 2013;140(6):853–66.

39. Uemura Y, Isobe Y, Uchida A, et al. Expression of activating natural killer-cell receptors is a hallmark of the innate-like T-cell neoplasm in peripheral T-cell lymphomas. Cancer Sci 2018;109(4):1254–62.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Expression of NK receptors by RCDII intraepithelial lymphocytes

A. Frequency of cells expressing indicated NK receptors among CD45+ intra-epithelial lymphocytes (IEL) isolated from fresh duodenal biopsies in celiac disease (CD, n=15), type I refractory CD (RCDI, n=7) and type II refractory CD patients (RCDII, red, n=21) by multiparameter flow-cytometry (MFC). Medians and ranges are shown.

B. Number of NKp46+ IEL/100 epithelial cells (EC) in CD, RCDI or RCDII patients at diagnosis, by immunohistochemistry (IHC).

C. NKp46 expression by IHC in representative intestinal paraffin–embedded biopsies (x 200) from control (A), CD (B), RCDI (C), and RCDII (D) patients.

Figure 2: Selective expression of NKp46 by RCDII intraepithelial lymphocytes

A. ROC curve analyzing the predictive value of counts of NKp46+ IEL/100 EC for differentiating RCDII from CD and RCDI at diagnosis in the discovery cohort. The estimated area under the ROC curve is 1 for a threshold of 25 NKp46+ IEL/100 EC count ($p<0.0001$).

B. ROC curve analyzing the predictive value of counts of NKp46+ IEL/100 EC for differentiating RCDII from CD and RCDI at diagnosis in the validation cohort. The estimated area under the ROC curve is 0.916 for a threshold of 25 NKp46+ IEL/100 EC count ($p<0.0001$).

C. Discovery and validation cohorts: numbers of NKp46+ IEL/100 EC in histologically normal controls (n=13), celiac disease and RCDI (n=72), RCDII at diagnosis (n=60) and after treatment (n=20), and in control patients with non-celiac enteropathies (n=12). Each dot represents a different patient. The red dotted line represents the diagnostic cut-off identified by ROC analysis.

Figure 3: NKp46 immunohistochemical staining in primary GI T-cell lymphomas

Representative histology (HES) and immunohistochemical staining of paraffin-embedded biopsies in primary GI T-cell lymphomas. Enteropathy-associated T-cell lymphoma (EATL): architecture is disrupted by diffuse infiltrate (HES x 200) of large lymphoid tumor cells positive for CD3, CD30 and negative for CD8. Tumor cells strongly express NKp46, with a dotted pattern. Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma (MEITL) in one duodenal biopsy: infiltrate of lymphoid tumor cells displaying epitheliotropism (HES x 400) and positive for CD3, CD8, CD56 and NKp46. Indolent T-LPD in one duodenal biopsy: massive *lamina propria* infiltrate of lymphoid tumor cells positive for CD3 and CD4 but negative for NKp46.

Figure 4: NKp46 expression and survival rate in celiac disease and primary GI T-cell lymphomas

A. Overall survival of CD and RCD patients with counts of NKp46+ IEL/100 EC above 25 (red solid line) and below 25 (black dashed line).

B. Overall survival of primary GI T-cell lymphoma when tumor cells are positive (red solid line) or negative (black dashed line) for NKp46.

Figure 5: Anti-tumor efficacy of 8B6A-PBD antibody

A. Representative experiment of internalization assay of the anti-NKp46 antibody by NKp46+ primary tumor cells *ex-vivo*. The CypHer5E signal was assessed on sCD3- CD103+ NKp46+ IEL untreated (in grey), treated with the anti-NKp46 (in red) or the corresponding isotype control (in green) labeled with the pH-sensitive fluorescent dye CypHer5E after 24 hours of incubation.

B. *Ex-vivo* cytotoxicity of 8B6A-PBD against primary tumor NKp46+ IEL isolated from fresh duodenal biopsies of 5 RCDII patients. IEL were incubated in the presence of IL-15 (grey) alone or in combination with anti-8B6A-PBD (red), IC-PBD (grey), deglycosylated anti-NKp46 (grey) or PBD alone (white). Box plots compare the frequencies of malignant sCD3-CD7+ IEL negative for annexin V and propidium iodide and therefore still alive after 96 hours. Horizontal bars indicate median values obtained in 5 experiments performed with IEL from distinct RCDII patients.

Figure 6: Scheme proposing an algorithm based on NKp46 expression for primary gastrointestinal T-cell lymphoproliferative diseases diagnosis orientation

*: Consider other peripheral T-cell lymphoma with secondary intestinal localization as a differential diagnosis.

Figure 1: Expression of NK receptors by RCDII intraepithelial lymphocytes

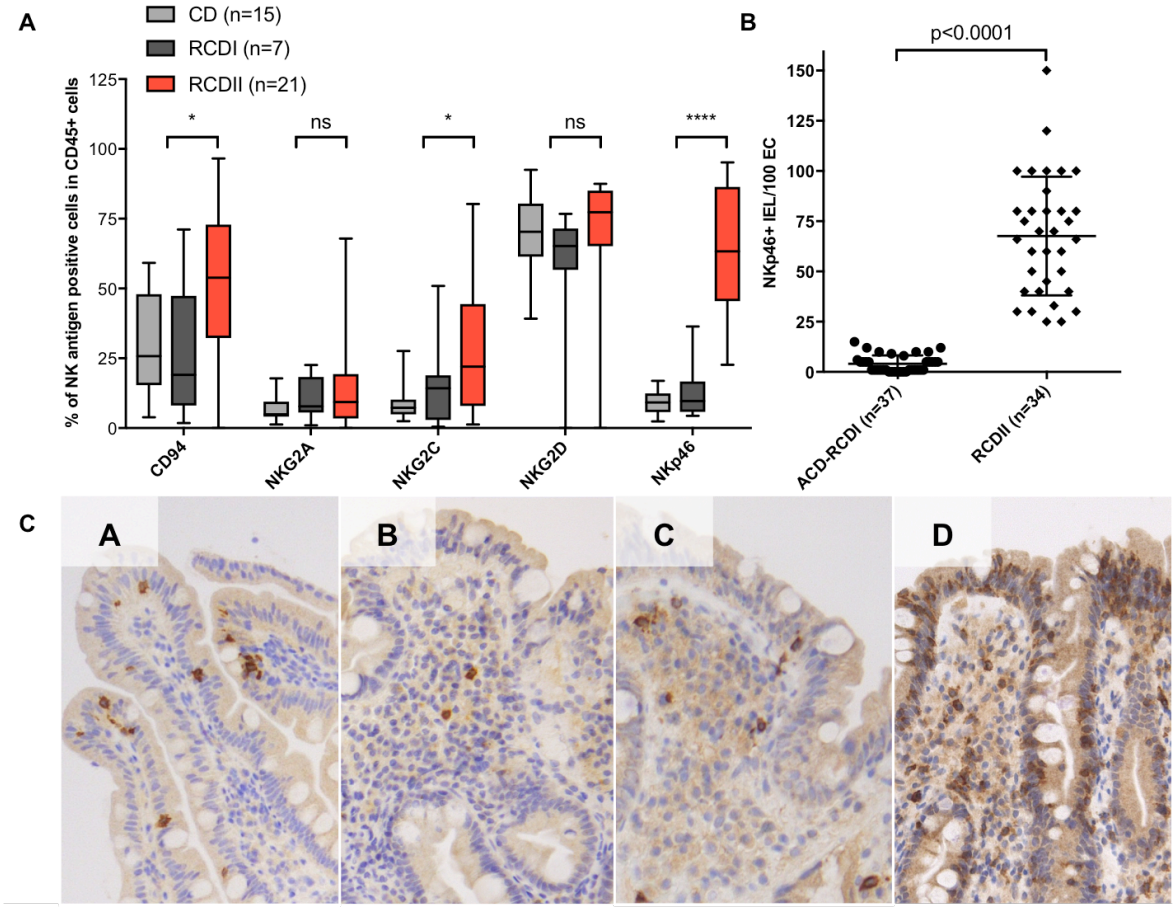


Figure 2: Selective expression of NKp46 by RCDII intraepithelial lymphocytes

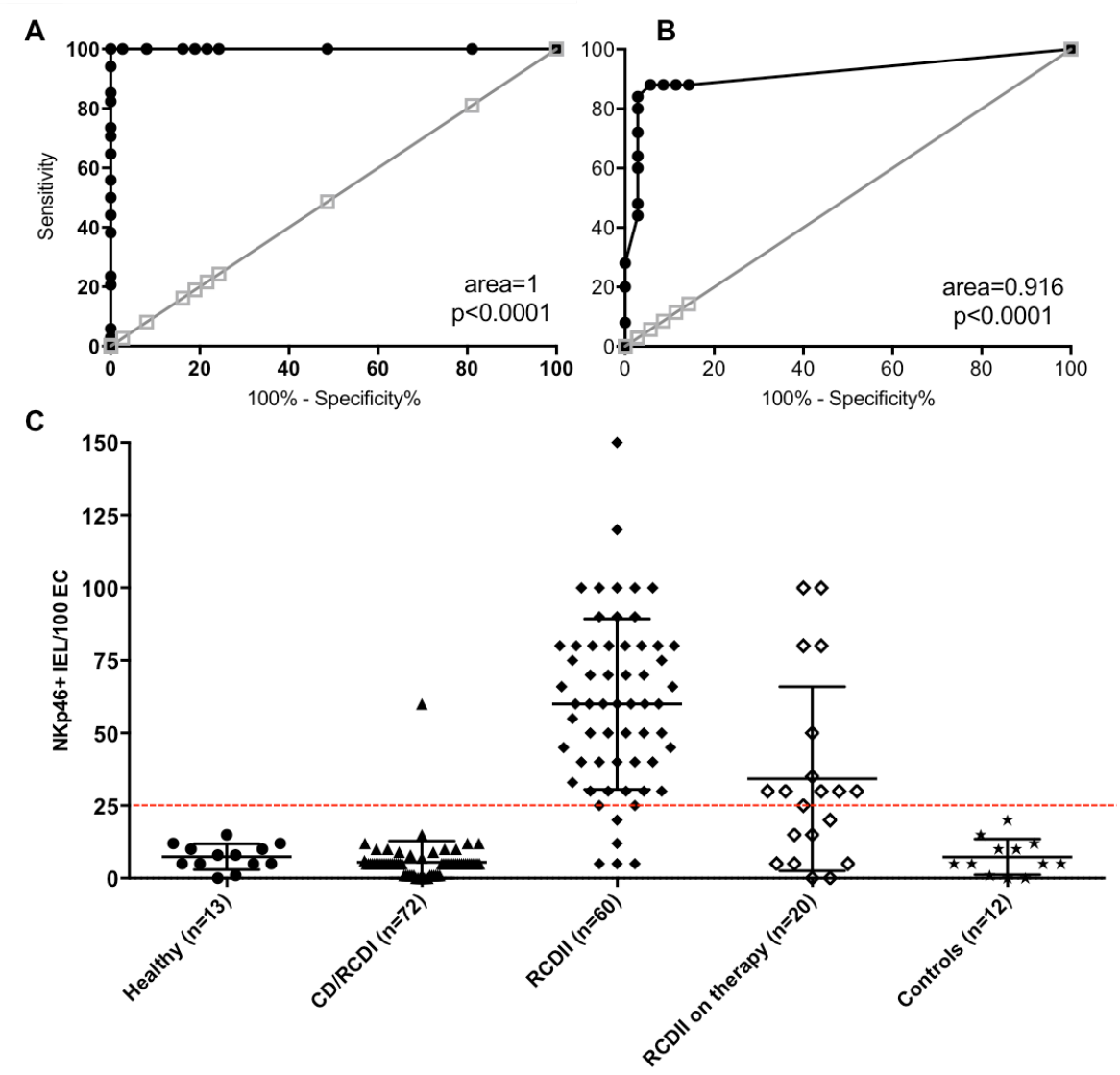


Figure 3: NKp46 immunohistochemical staining in primary GI T-cell lymphomas

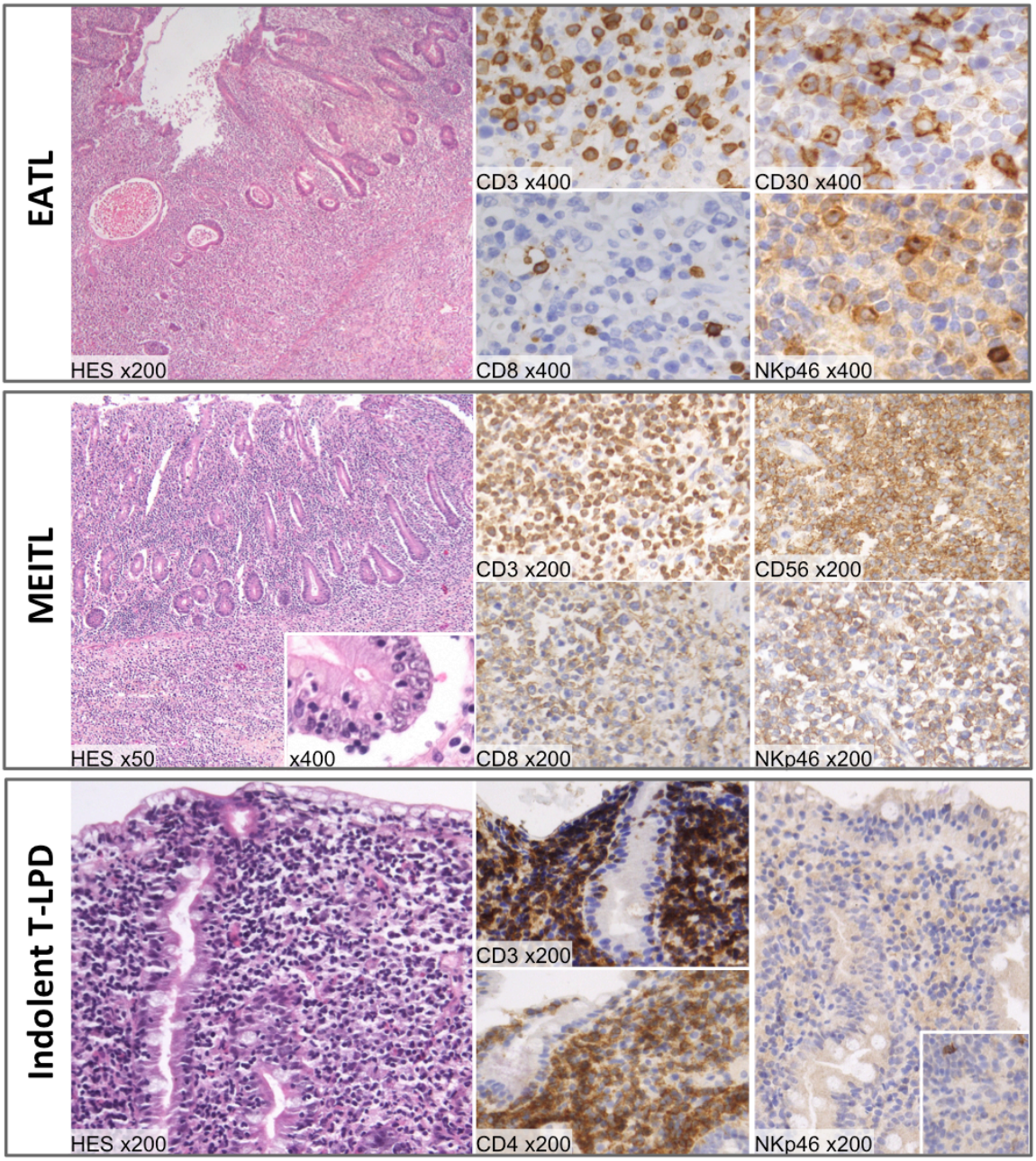


Figure 4: NKp46 expression and survival rate in celiac disease and primary GI T-cell lymphomas

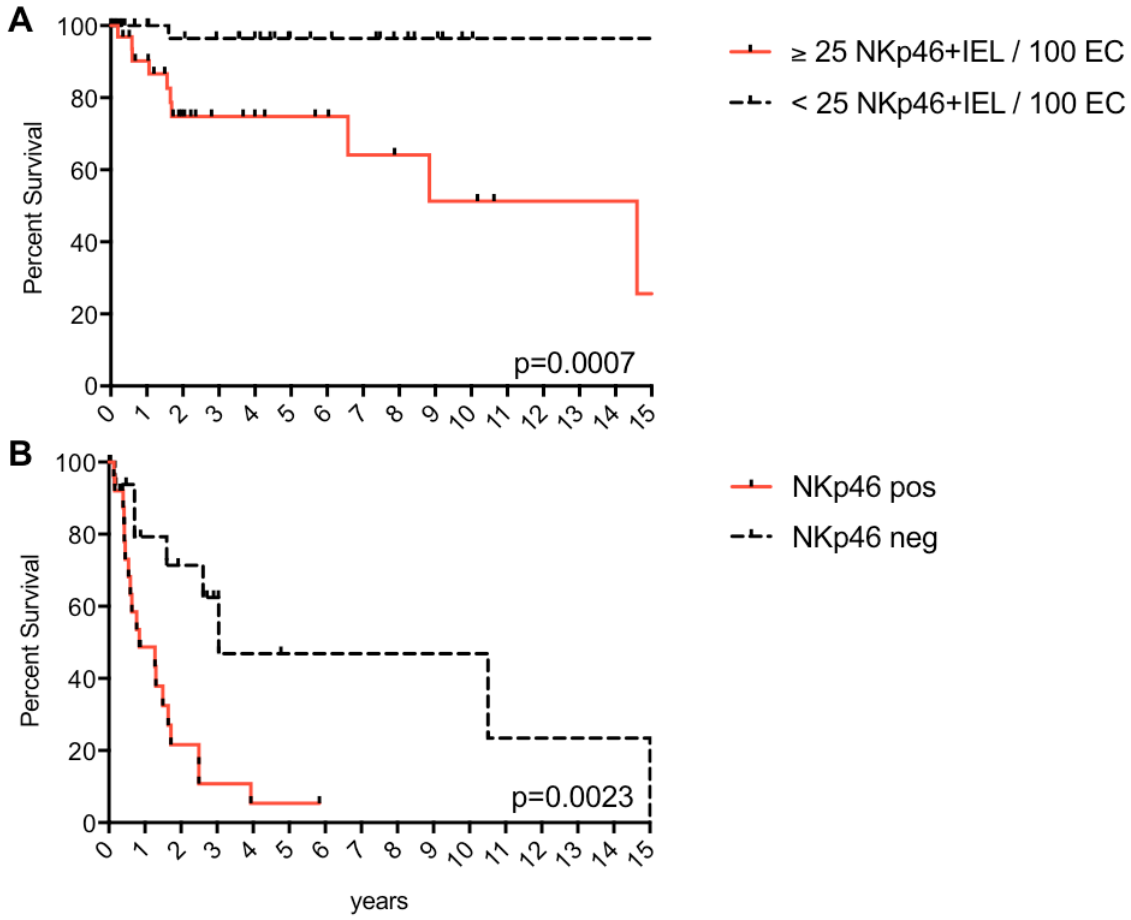


Figure 5: Anti-tumor efficacy of 8B6A-PBD antibody (n=5)

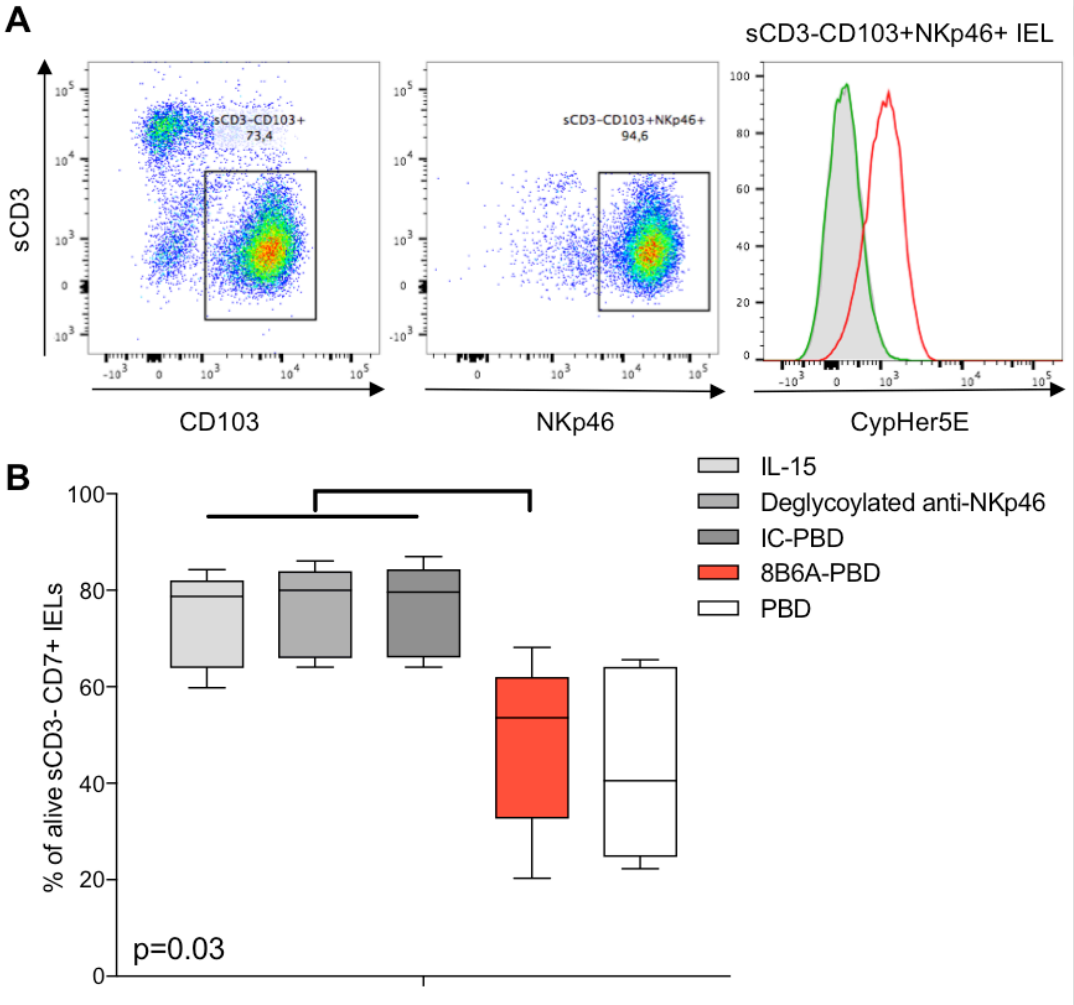
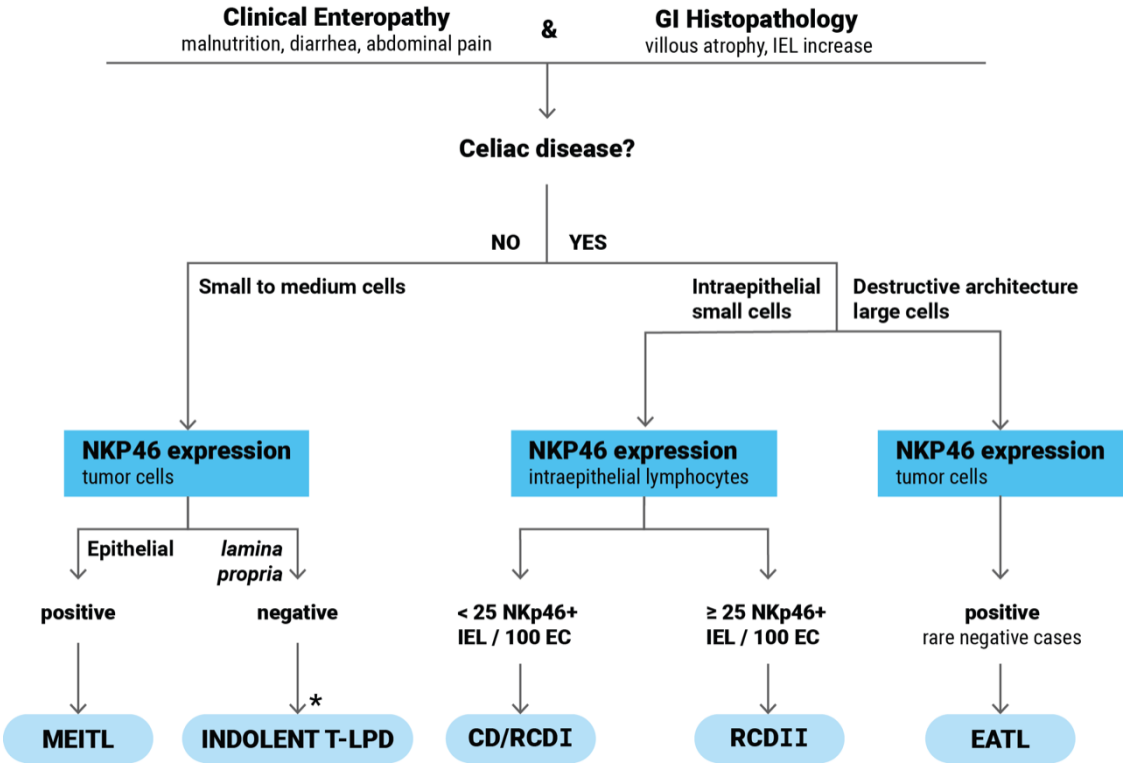


Figure 6: Scheme proposing an algorithm based on NKp46 expression for primary gastrointestinal T-cell lymphoproliferative diseases diagnosis orientation.



*: Consider other peripheral T-cell lymphoma with secondary intestinal localization as a differential diagnosis.

SUPPLEMENTARY DATA

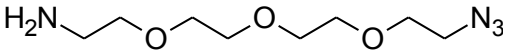
SUPPLEMENTARY METHODS

Conjugate preparation

A two-step process based on Click chemistry reactive groups was used. A lysine based linker with a reactive group was first bound to the acceptor glutamines of the antibodies (in the absence of organic solvent), followed by reaction with a second compound that includes the val-ala-PBD and a complementary reactive group (in the presence of organic solvent). To obtain the intermediate antibody bound to a reactive linker, 5 mg/mL mutant monoclonal antibody (mAb) was incubated with 20 equivalents of a reactive lysine based linker (amino-PEG-azide, structure below) per site of coupling and 2 U/mL Bacterial Transglutaminase (BTG) overnight at 37 °C in PBS. The antibody comprised an acceptor glutamine at amino acid residue 295 (Kabat EU numbering) of their heavy chains, such that the reactive linker was conjugated to residue Q295 on each heavy chain of the antibodies (each antibody has two conjugated moieties; DAR=2), and lacked significant effector function.

The structure of the reactive linker was as follows:

NH2-PEG-N3 spacer

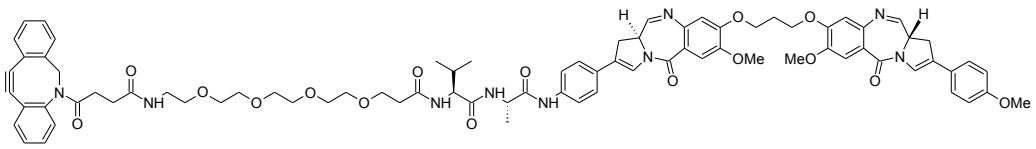


The mAb-reactive linker conjugate was purified by affinity chromatography on protA.

In order to produce the final antibody drug conjugate (ADC) comprising a pyrrolobenzodiazepine (PBD) dimer, the azide-functionalized antibody above (2 mg/mL in PBS/1,2-propane-diol 50/50 v/v) was then incubated with 1.75 molar equivalent of DBCO-derivatized-val-ala-PBD per site of coupling (the DBCO reacts with the azide). The mixture was incubated for 48-72h at RT with gentle agitation. Completion of the reaction was controlled by LC-ESI-MS (DAR > 1.9). Excess of derivatized-PBD was removed by dialysis (MWCO=10kDa), followed by purification by size exclusion chromatography (Superdex 200 10/300GL column, GEHealthcare). The final compound was concentrated on Amicon 30K devices.

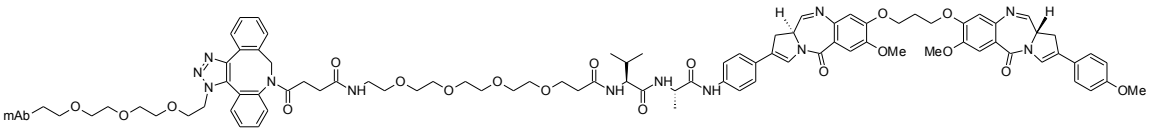
The structure of the DBCO-derivatized-PBD compound was as follows:

DBCO-val-ala –PBD



The final structure of the compound linked to the glutamine was as follows:

mAb-PEG-DBCO-PBD



Drug Antibody Ratio (DAR) of ADCs was determined by LC-ESI-MS analysis of the reduced antibody. ADCs were reduced with DTT. ADC products were eluted on a BEH300-C4 (2.1 x 50 mm, 1.7 µm, Waters) heated to 80 °C, at a flowrate of 0.2 mL/min, using the following gradient: 0-2 min, 10% B; 2-20 min, 10-40% B; 20-21 min, 40-90% B; 21-24 min, 90% ; 24-25 min, 90-10% B; 25-30 min, 10% B (A: water + 0.1% formic acid; B: acetonitrile + 0.1% formic acid). Analytes were ionized by electrospray and detected by a Xevo G2S_QT of mass spectrometer (Waters) operating in positive TOF-MS mode. Raw data were analyzed with MassLynx software (Waters) and deconvolution was performed using MaxEnt1.

SUPPLEMENTARY RESULTS – TABLES

Supplementary Table 1: Characteristics of RCDII patients in the discovery cohort.

RCDII Patients	Villous atrophy (Marsh)	Count of CD3+ IEL (per 100 EC)	Count of CD8- IEL (per 100 EC)	Count of NKp46+ IEL (per 100 EC)	NKp46+ in CD45+ IEL (MFC)	Type of NKp46 expression	*TCRγ* rearrangement
R1	IIIa	75	75	75	ND	membranous	monoclonal
R2	IIIa	100	100	100	ND	membranous	monoclonal
R3	IIIb	100	100	80	ND	membranous	monoclonal
R4	IIIb	108	80	100	ND	membranous	monoclonal
R5	IIIa	93	93	100	86.5	membranous	monoclonal
R6	IIIa	90	90	40	ND	intracellular	monoclonal
R7	IIIb	150	150	100	ND	membranous	monoclonal
R8	IIIb	43	40	40	ND	membranous	monoclonal
R9	IIIa	60	50	50	ND	membranous	monoclonal
R10	IIIc	90	78	75	45.9	membranous	monoclonal
R11	IIIa	40	40	60	90.3	membranous	monoclonal
R12	IIIb	62	60	66	ND	membranous	monoclonal
R13	IIIa	40	38	30	63.5	membranous	monoclonal
R14	IIIa	80	78	66	33	membranous	monoclonal
R15	IIIc	50	50	30	1	membranous	monoclonal
R16	IIIa	70	70	70	68.7	membranous	monoclonal
R17	IIIc	80	65	80	61.4	membranous	monoclonal
R18	IIIb	50	40	150	ND	membranous	monoclonal
R19	IIIa	25	25	25	95.2	intracellular	monoclonal
R20	IIIc	70	65	70	86.3	membranous	monoclonal
R21	IIIc	60	55	60	73	membranous	monoclonal
R22	IIIb	30	30	30	25	membranous	monoclonal
R23	None	63	48	50	63.3	membranous	monoclonal
R24	IIIa	83	80	80	ND	membranous	monoclonal
R25	IIIa	40	40	40	81.7	membranous	monoclonal
R26	IIIa	50	33	33	22.7	membranous	monoclonal
R27	IIIb	90	50	90	35.6	membranous	monoclonal
R28	IIIc	80	80	60	40.3	intracellular	monoclonal
R29	IIIc	60	50	25	0	intracellular	monoclonal
R30	IIIa	120	120	120	90.3	membranous	monoclonal
R31	IIIb	100	80	45	54.2	membranous	monoclonal
R32	IIIa	80	80	80	72.9	membranous	monoclonal
R33	IIIb	90	80	80	45	membranous	monoclonal
R34	IIIa	120	100	100	ND	membranous	monoclonal

RCDII: type II refractory coeliac disease; IEL: intra-epithelial lymphocytes; EC: epithelial cells; MFC: multiparameter flow cytometry; ND: not done.

Supplementary Table 2: NKp46 expression assessed in 12 patients with histological differential diagnoses of celiac disease.

Patients	Diagnosis	Count of NKp46+ IEL (per 100 EC)
C1	Collagenous Colitis	5
C2	Primary Eosinophilic Colitis	1
C3	CMV Colitis	5
C4	Idiopathic Duodenitis	5
C5	Idiopathic Duodenitis	10
C6	Olmesartan-associated Enteropathy	12
C7	Olmesartan-associated Enteropathy	10
C8	Olmesartan-associated Enteropathy	15
C9	Helicobacter pylori Infection	20
C10	Autoimmune Enteropathy	5
C11	Helicobacter pylori Infection	1
C12	Helicobacter pylori Infection	5

CMV: cytomegalovirus; IEL: intra-epithelial lymphocytes; EC: epithelial cells

Supplementary Table 3: Details on validation cohort. Forty-eight patients from VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands and 16 patients from Necker Hospital, Paris, France were assessed blinded at diagnosis. Two patients were excluded due to the absence of analyzable epithelium (in one), the absence of villous atrophy and increase of IEL (in one). Another patient already treated by cladribine was also excluded.

NKp46+ IEL / 100 EC	RCDII Diagnosis	ACD/RCDI Diagnosis	Total
≥ 25 (positive test)	22	1	23
< 25 (negative test)	5	34	39
Total	26	35	61

Supplementary Table 4: Characteristics of the 6 discordant cases in the validation cohort.

Patients	Diagnosis	NKp46 count (IHC)	HLA	CD Antibodies	Villous atrophy	Count of IEL (per 100 EC) (IHC)	CD7+sCD3-iCD3+ IEL (MFC)	*TCR*γ rearrangement
A12	RCDII	**<5**	DQ2 heterozygote	EMA neg, TGA 3,8 (N <3.0)	Marsh IIIB	50	59%	Polyclonal
A13	RCDII	**12**	DQ2 heterozygote	EMA neg, TGA neg	Marsh IIIA	70	20%	NA
A28	RCDII	**<5**	DQ 2.2 and DQ 2.5 heterozygote	EMA pos, TGA 17 (N <10.0)	Marsh IIIA	80	75%	NA
A29	RCDII	**20**	DQ2 heterozygote	EMA neg, TGA neg	Marsh IIIA	30	37%	NA
A48	RCDII	**<5**	DQ2 homozygote	EMA neg, TGA 5,5 (N <3,0)	Marsh IIIA, no crypt hyperplasia	40	59%	Monoclonal
A36	CD/RCD1	**60**	NA	EMA and TGA pos	Marsh IIIC	100	0.6%	NA

CD/RCDI: celiac disease / type I refractory celiac disease; RCDII: type II refractory celiac disease; MFC: multiparameter flow-cytometry; *TCR*: T-Cell Receptor gene; IEL: intraepithelial lymphocytes; NA: not available; EMA: anti-IgA endomysial antibodies; TGA: anti-transglutaminase antibodies; neg: negative; pos: positive.

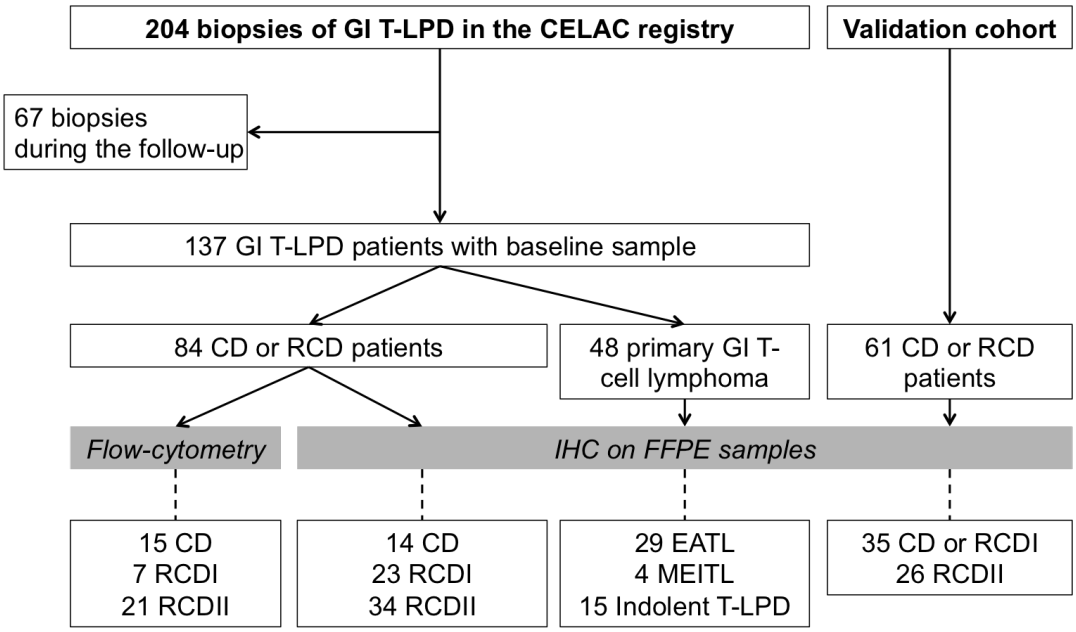
Supplementary Table 5: Characteristics of NKp46 expression in EATL and MEITL patients.

Patients	Diagnosis	Count of NKp46+ tumor cell (%)	Intracellular NKp46 expression (dot)	Membranous NKp46 expression	NKp46 intensity expression
E1	EATL	50	No	Yes	weak
E2	EATL	100	No	Yes	strong
E3	EATL	100	Yes	Yes	strong
E4	EATL	0	NA	NA	NA
E5	EATL	100	Yes	Yes	strong
E6	EATL	100	No	Yes	strong
E7	EATL	100	Yes	Yes	intermediate
E8	EATL	100	No	Yes	intermediate
E9	EATL	80	No	Yes	strong
E10	EATL	100	Yes	Yes	strong
E11	EATL	100	Yes	Yes	strong
E12	EATL	66	Yes	No	intermediate
E13	EATL	80	Yes	No	strong
E14	EATL	100	No	Yes	strong
E15	EATL	100	Yes	No	strong
E16	EATL	100	No	Yes	intermediate
E17	EATL	100	No	Yes	weak
E18	EATL	60	Yes	No	weak
E19	EATL	90	No	Yes	weak
E20	EATL	90	No	Yes	weak
E21	EATL	0	NA	NA	NA
E22	EATL	90	Yes	No	weak
E23	EATL	90	No	Yes	strong
E24	EATL	0	NA	NA	NA
E25	EATL	0	NA	NA	NA
E26	EATL	90	Yes	No	strong
E27	EATL	100	Yes	Yes	intermediate
E28	EATL	0	NA	NA	NA
E29	EATL	100	No	Yes	intermediate
M1	MEITL	80	No	Yes	intermediate
M2	MEITL	100	No	Yes	strong
M3	MEITL	50	No	Yes	intermediate
M4	MEITL	100	No	Yes	strong

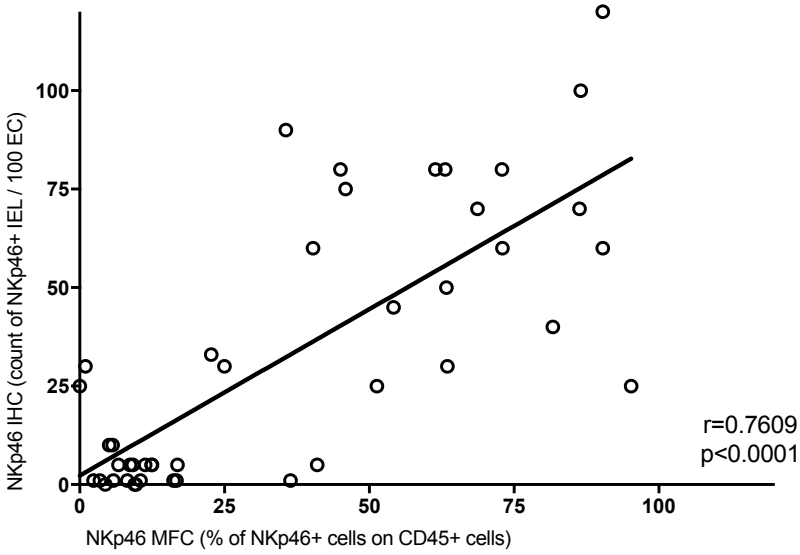
EATL: enteropathy-associated T-cell lymphoma; MEITL: monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma; ND: not done.

SUPPLEMENTARY RESULTS - FIGURES

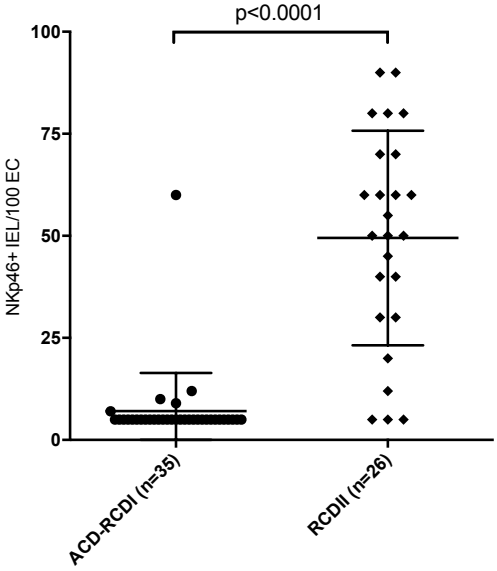
Supplementary Figure 1: Flow chart of patients with gastrointestinal T-cell lymphoproliferative diseases: experimental and validation cohort.



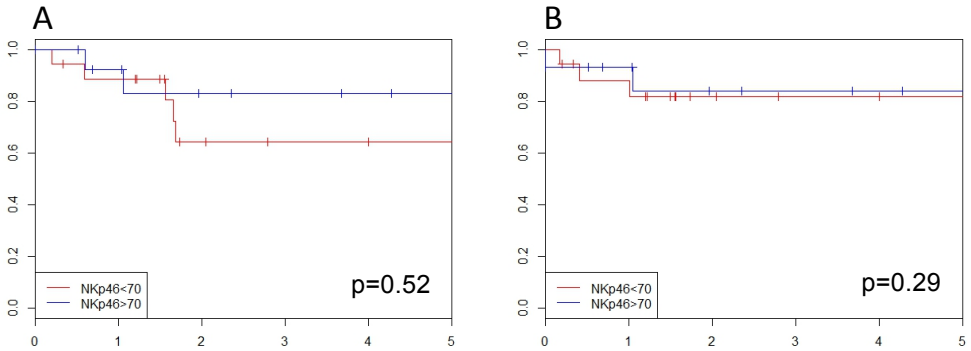
Supplementary Figure 2: Correlation between immunohistochemistry (IHC) and multiparameter flow cytometry (MFC) in CD, RCDI and RCDII samples. Underlined numbers refer to the total number of samples in the corresponding quadrant. The correlation coefficient of the count of NKp46+ IEL/100 EC by IHC and percentage of NKp46+ IEL in CD45+ cells by MFC was calculated with the Pearson's correlation test.



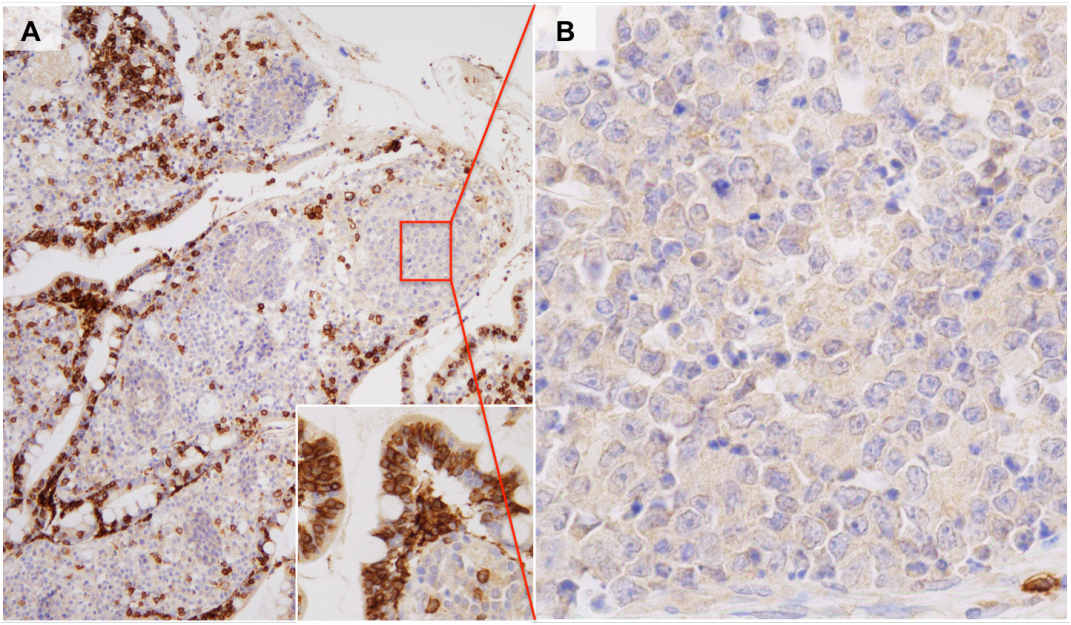
Supplementary Figure 3: Validation cohort: number of NKp46 positive intra-epithelial lymphocytes (IEL) per 100 epithelial cells (EC) among celiac disease (CD) or type I refractory celiac disease (RCD) and RCDII patients at diagnosis. The median NKp46+ IEL/100 EC count was higher in RCDII than in CD and RCDI patients (50 [5-90] vs. 5 [5-60], p<0.0001).



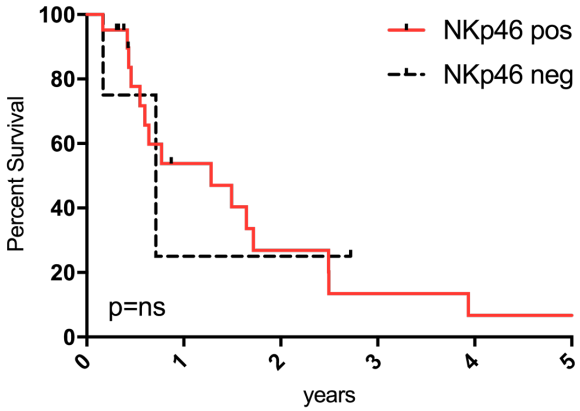
Supplementary Figure 4: Association between NKp46+ IEL count and occurrence of EATL (A) and/or death (B) in RCDII patients. Using Cox's regression, there was no association between the count of NKp46+ IEL and the risk of EATL (p=0.52), or the risk of EATL and/or death (p=0.19). Using a log-rank test comparing patients with NKp46+ IEL/100 EC below and above the median NKp46+ IEL in RCDII patients (median=70), there was no survival difference (A, p=0.29) and/or EATL transformation (B, p=0.52).



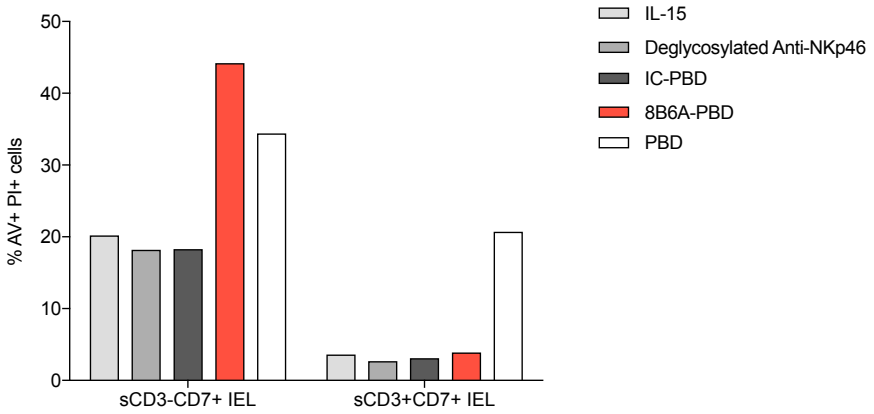
Supplementary Figure 5: Two out of the 5 NKp46 negative EATL patients were diagnosed on a predisposing RCDII. NKp46 was expressed on IEL of the RCDII (A, NKp46 x100 and x400) but was absent on tumor EATL cells (B, NKp46 x400).



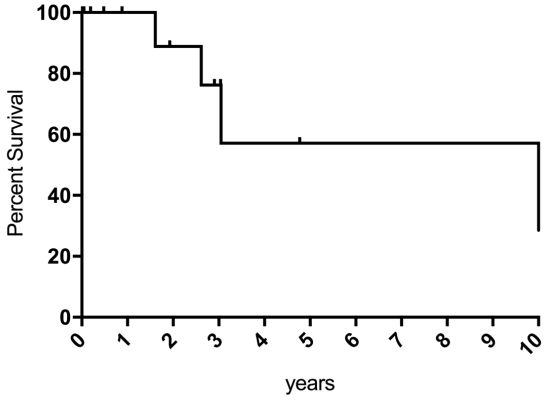
Supplementary Figure 6: Survival of EATL patients according to NKp46 expression. In EATL, the 2-years OS was similar in the 24 NKp46 positive cases (red solid line) compared to the 5 NKp46 negative cases (blue dashed line) (OS-2years 26% vs. 33%, p=ns).



Supplementary Figure 7: Efficacy *ex-vivo* of 8B6A-PBD (anti-NKp46-PBD ADC) in primary NKp46+ tumor intraepithelial lymphocytes (IEL) isolated from fresh small bowel biopsies of RCDII patients. Representative experiment of aberrant lymphoid sCD3- CD7+ IEL and normal sCD3+ CD7+ T-cells apoptosis with PBD compared to 8B6A-PBD using the same molar concentration.



Supplementary Figure 8: Survival of the 15 Indolent T-LPD patients (OS-5years=57%).



ARTICLE 2 (en préparation)

MEMBRANE EXPRESSION OF NK RECEPTOR KIR3DL2 CONTRIBUTES TO DELINEATE THE ACUTE ATL AND IS A THERAPEUTIC TARGET IN ATL

INTRODUCTION

Les leucémies/lymphomes T de l'adulte associés à l'HTLV-1 (ATL) sont des hémopathies lymphoïdes T CD4 + causée par l'infection du rétrovirus HTLV-1. L'ATL est classée en 4 sous-types cliniques (smoldering, chronique, aiguë et lymphome) sur la base de critères cliniques et biologiques proposés par Shimoyama et al (Shimoyama, 1991). Les formes agressives sont caractérisées par une hypercalcémie et des LDH élevées, et sont séparées entre forme aiguë ou lymphome selon l'existence ou non d'une hyperlymphocytose pathologique. Ces sous-types diffèrent dans la réponse au traitement et la survie globale, mais on connait peu les déterminants moléculaires viraux ou de l'hôte responsables de cette évolution.

Le génome d'HTLV-1 code pour une oncoprotéine virale, appelée Tax, qui active divers gènes cellulaires et modifie de nombreuses voies transcriptionnelles de l'hôte. Tax peut en particulier activer les facteurs de transcription NF-kB et CREB (cAMP response element-binding protein) (Matsuoka and Jeang, 2011; Sun and Yamaoka, 2005). Il est probable que ces multiples fonctions participent à l'immortalisation des cellules infectées par l'HTLV-1 et que Tax joue donc un rôle primordial dans l'initiation de la lymphomagénèse. Néanmoins le rôle de Tax à un stade avancé de l'ATL est moins clair, car Tax est indétectable dans environ 40% des cas ATL (Tamiya et al., 1996), probablement en raison de la réponse immunitaire de lymphocytes T cytotoxique anti-Tax (Bangham, 2009) et des modifications subies par le génome viral (Cook et al., 2014; Taniguchi et al., 2005).

KIR3DL2 (CD158K) est un récepteur Immunoglobulin-like Killer (KIR) inhibiteur exprimé par les cellules natural killer (NK) et une minorité de lymphocytes T CD4 + et CD8 +. Il a été montré récemment qu'il pouvait être exprimé de manière aberrante sur les cellules tumorales du syndrome de Sézary (SS), du mycosis fungoïde transformé (tMF) et du lymphome cutané anaplasique à grandes cellules (pcALCL) (Battistella et al., 2017). Chez quelques patients ATL, il a été suggéré que les cellules tumorales circulantes pouvaient également exprimer KIR3DL2 (Obama et al., 2007), ce qui a été récemment confirmé par immunohistochimie (IHC) chez 12 patients ATL supplémentaires (Hurabielle et al.). Chez les patients SS, la détection de l'expression de KIR3DL2 sur les cellules tumorales circulantes est utile pour le diagnostic, le pronostic et le suivi de la charge tumorale circulante (Battistella et al., 2016; Hurabielle et al., 2017; Michel et al., 2013; Ortonne et al., 2008, 2012). De plus, un anticorps monoclonal dirigé contre KIR3DL2, IPH4102, a démontré une activité antitumorale *in vitro* dans des études précliniques (Marie-Cardine et al., 2014) et *in vivo* dans l'étude de phase 1 IPH4102-101 (NCT02593045) (Bagot et al., 2017).

Les options thérapeutiques disponibles dans les ATL sont actuellement limitées avec des survies mauvaises dans les formes agressives. Grâce à une collaboration avec une société de biotechnologie, Innate Pharma, nous avons étudié l'expression des récepteurs NK, en particulier KIR3DL2, et les caractéristiques d'efficacité préclinique de IPH4102 dans une cohorte de patients ATL. Les objectifs secondaires étaient d'étudier l'association entre l'expression de KIR3DL2 et le type d'ATL, et d'examiner les mécanismes pouvant expliquer l'expression de KIR3DL2 et son rôle dans la lymphomagénèse.

Membrane Expression of NK Receptor KIR3DL2 Contributes to Delineate the Acute-type ATL and is a Therapeutic Target in ATL

Morgane Cheminant[1, 2], Ludovic Lhermitte[3], Julie Bruneau[2,4], Hélène Sicard[5], Cécile Bonnafous[5], Amélie Trinquand[3], Patricia Palmic[2], Mickaël Dussiot[2], Laetitia Waast[6], Véronique Avettand-Fenoel[7], Chantal Brouzes[3], Yves Lepelletier[2], Vahid Asnafi[3], Ambroise Marçais[1], Olivier Hermine[1,2]

Affiliations: [1]Clinical Hematology, Paris Descartes – Sorbonne Paris Cité University, Institut Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris, France; [2]INSERM UMR 1163, Laboratory of cellular and molecular mechanisms of hematological disorders and therapeutical implications, Paris Descartes – Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France; [3]Biological Hematology, Paris Descartes – Sorbonne Paris Cité University, Institut Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris, France; [4]Department of Pathology, Paris Descartes – Sorbonne Paris Cité University, Institut Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris, France; [5]Innate Pharma, Marseille, F-13009, France; [6]INSERM U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Institut Cochin, Paris, France ; [7]Paris Descartes University, EA 7327, Sorbonne Paris Cité, APHP, Necker Hospital, Virology Department, Paris, France.

ABSTRACT

Background

Adult T-cell leukemia (ATL) is a malignant disorder of CD4+ T lymphocytes caused by an infection of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) and is classified into 4 clinical subtypes (ie, smoldering, chronic, acute, and lymphoma). Natural killer (NK) receptors were identified primarily on NK cells, but also on a small proportion of T cells and on cutaneous T-cell lymphoma. We assessed NK receptors on ATL cells.

Methods

NK receptors expression was assessed by flow-cytometry and immunohistochemistry on peripheral blood (PB) samples (n=55), cutaneous, hepatic and lymph node (LN)

biopsies (n=21) obtained from 58 patients. Array-based analysis of genomic DNA methylation patterns of *KIR3DL2* promoter was assessed. To explore the role of HTLV-1 infection on KIR3DL2 expression, we assessed KIR3DL2 and *TAX* mRNA expressions in primary ATL cells and in activated CD4+ T cells that were infected with HTLV-1 *in vitro*. *Ex-vivo* autologous antibody dependent cell cytotoxicity (ADCC) was performed on sorted primary ATL cells with IPH4102, a monoclonal anti-KIR3DL2 antibody.

Results

KIIR3DL2 was the only NK receptor expressed on primary ATL cells. No KIR3DL2 expression was found on CD4+ CD7- T-lymphocytes (that represent 7% of lymphocytes [3.7-9.9]) from 19 healthy controls. KIR3DL2 was mainly expressed on acute-type ATL compared to lymphoma and chronic-types (28/30 vs. 2/8 and 2/12 respectively) and was associated with a shorter survival (OS-5years 12.9% vs. 54.5% respectively, p=0.0001). KIR3DL2 expression correlated with the demethylation status in its promoter, and treatment by 5-Aza increased KIR3DL2 expression. *TAX* mRNA and KIR3DL2 expressions were correlated on primary ATL cells. Infection of CD4+ T cells with HTLV-1 induced expression of KIR3DL2 and *TAX* mRNA was found to be express on KIR3DL2+ CD4+ T-cells but not on KIR3DL2 negative CD4+ T-cells. Treatment with anti-KIR3DL2 IPH4102 could efficiently and selectively kill human KIR3DL2+ primary ATL cells *ex-vivo*.

Conclusion

KIR3DL2 expression is mainly associated with acute-type ATL. HTLV-1 has a preferential tropism for KIR3DL2+ lymphocytes and may play a role in KIR3DL2 expression induction, combined with the hypomethylation status of *KIR3DL2* promoter. The benefit of targeting KIR3DL2 by IPH4102 should be further investigating in acute ATL patients.

INTRODUCTION

Adult T-cell leukemia (ATL) is a malignant and fatal disorder of CD4+ T lymphocytes caused by an infection of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1). It remains uncertain why a minority of infected individuals develops aggressive clinical disease, whereas most HTLV-1 carriers remain lifelong healthy carriers. ATL is classified into 4 clinical subtypes (ie, smoldering, chronic, acute, and lymphoma) based on clinical and biological criteria proposed by Shimoyama et al[1]. Aggressive forms are separated into acute or lymphoma-type depending on the presence of abnormal hyperlymphocytosis. These subtypes differ in the response to treatment and overall survival, but little is known about either viral or host molecular determinants of disease.

HTLV-1 encodes a transcriptional activator called Tax, which activates various cellular genes and alters many transcriptional pathways. It activates cyclic AMP (adenosine monophosphate) response element binding protein (CREB), nuclear factor-kB (NFKB), represses p53 and interferes with several cell cycle regulators, including cyclins and cdk inhibitors[2,3]. These multiple functions are believed to participate in the immortalization of HTLV-1–infected cells. In contrast, the role of Tax in advanced ATL cells is unclear, as Tax is undetectable in ≈ 40% of ATL cases[4], probably under selection from the strong anti-Tax cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response[5]. In addition, the HTLV-1 provirus is inactivated in ATL cells either by methylation in its 5' LTR, by mutation or by deletion of the proviral DNA in more than half of patients with ATL[6,7].

KIR3DL2 (CD158K), a killer immunoglobulin-like receptor (KIR) normally expressed by a subset of natural killer (NK) cells and a minority of CD4+ and CD8+ T lymphocytes, is aberrantly expressed in Sezary syndrome (SS) and several other cutaneous T-cell lymphomas[8]. In few ATL patients, it has been suggested that circulating tumor cells may also express KIR3DL2[9], a report that has been recently confirmed by immunohistochemistry (IHC) in 12 additional ATL patients[10]. In SS patients, the detection of KIR3DL2 expression on circulating tumor cells is useful for diagnosis, prognosis and follow-up of circulating tumor cell burden[11–15]. Moreover, a monoclonal antibody directed against KIR3DL2, IPH4102, demonstrated *in vitro* and

ex vivo antitumor activity in preclinical studies[16]. IPH4102 was well tolerated and had beneficial clinical activity in the IPH4102-101 phase 1 study (NCT02593045)[17].

In a context of unmet medical need for therapy of patients with ATL, we studied the expression of NK receptors, especially KIR3DL2, and the preclinical efficacy features of IPH4102 in a cohort of ATL patients. The secondary objectives were to study the association between KIR3DL2 expression and type of ATL, and examine the role of KIR3DL2 in lymphomagenesis.

METHODS

Patients

This study was approved by the ethic committee (CPP Ile de France II) and all living patients gave written informed consent. Patients' details and clinical features are summarized in **Supplementary Table 1**. Clinical data were collected retrospectively. Samples were obtained at diagnosis and, with the exception of ATL11 who received chemotherapy; all patients received no prior treatment. Depending on the patients, samples at different time points of the disease or samples from different tissues (blood and lymph node) collected at the same time point were analyzed (**Supplementary Table 1**). Except one patient with Kikuchi disease, all HTLV-1 carriers were asymptomatic and were from French Guyana, French West Indies or West Africa, matching the ethnic origins of the ATL patients.

Cell lines, primary ATL cells and cell culture

All cells were cultured at 37°C in 7% CO2 in RPMI-1640 (RPMI, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), penicillin/streptomycin and glutamine. HLTV-1 positive cell lines were cultured with non-essential amino acids (Thermofisher), glucose (25mM, Sigma), sodium pyruvate, Hepes (Thermofisher) in addition. The KIR3DL2-positive T-cell line HuT 78 and the KIR3DL2-negative Jurkat T-cell lines were both purchased from the American Type Culture Collection (ATCC TIB-161). HUT-102 and MT-4 are HTLV-1-positive human T-cell lines. MT-2 and C91/PL are HTLV-1 virus–producing T-cell lines. TL-OmI, C8166 are HTLV-1-positive, ATL-derived cell lines. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors and ATL patients were separated by Ficoll Hypaque density gradient centrifugation.

Quantification of HTLV-1 proviral load

HTLV-1 proviral load (PVL) was quantified by realtime PCR using primers specific for the pX region as previously described[18] (pX-F; 5'-CAAACCGTCAAGCACAGCTT-3' and pX-R; 5'-TCTCCAAACACGTAGACTGGGT-3') and the following probe: 5′ 6-FAM-TTCCCAGGGTTTGGACAGAGTCTTCT-TAMRA-3′. Runs were performed in a 50 µL volume containing 1 µg of total DNA extract, primers and probe (a 200nM

concentration of each), 1X PCR buffer (Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG). Thermocycling conditions were 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, followed by 50 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. Quantification was standardized with the Tarl2 cell line (HTLV-1, single proviral copy). Albumin was used for normalization. The following primers: forward 5′-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3′ and reverse 5′-AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT-3′, respectively and probe: 5′-FAM-CCTGTCATGCCCACACAAATCTCTCC-TAMRA-3′. Results are expressed as HTLV-1 proviral copies per 100 PBMCs (PVL).

HTLV-1 infection *in vitro*

PBMC were cultured alone, with 1 µg/ml of phytohemagglutinin (PHA-M; Sigma, France) in the presence of 20 U/ml IL-2 (Roche, France) (PHA/IL-2) or with purified HTLV-1 from MT-2 supernatant. MT-2 cells were seeded at 10^6/mL overnight in culture medium, then supernatants were collected and ultra centrifuged for 2 hours at 100 000g. HTLV-1 viruses were resuspended in 100 µL of culture media and quantified by the use of the HTLV-1-p19 Elisa Kit (Gentaur). Several concentrations of p19-equivalent (0-900 ng/mL) were used to stimulate PBMC *in vitro*.

RNA extraction and RT-qPCR

RNAs were isolated from thawed PBMC with the "all PREP DNA/RNA mini kit" (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed with the "Maxima first strand cDNA synthesis kit" (Thermo scientific) according to the manufacturer's instructions. *KIR3DL2* mRNA expression was detected using the Roche Real time Ready assay ID 136820. PCR were conducted using the following conditions: pre-incubation 95° 10 min ×1, amplification ×45: denaturation 95° 10 sec, annealing 60° 30 sec acquisition, extension 72° 1 sec, cooling. Housekeeping genes *EEF1G* (forward primer AGATGGCCCAGTTTGATGCTAA / reverse primer GCTTCTCTTCCCGTGAACCCT) or *HPRT* (forward primer TGACACTGGCAAAACAATGCA / reverse primer GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT) were quantified using the SYBR green method using the following conditions: pre-incubation 95° 5 min x1; amplification x45: denaturation 95° 10 sec; annealing 60° 10 sec; extension 72° 10 sec; acquisition,

melting curve, cooling. The normalized relative quantity (NRQ) were calculated according to the following formula: $NQR=2^{\Delta Ct\ sample\ -\ (\Delta Ct\ ref1+\ \Delta Ct\ ref2)/2}$. Mean NRQ were calculated from two independent experiments performed in triplicates.

Methylation

DNA extraction was performed using the Blood DNA Qiagen extraction kit. Microarray-based DNA methylation analysis from 28 ATL and 4 AC patients as well as sorted CD4+ T lymphocytes from 4 healthy donors, was performed using the Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA). The DNA methylation score for each locus of the translation start site of the *KIR3DL2* gene is presented as a beta (β) value (β = (M/(M+U)) in which M and U indicate the mean methylated and unmethylated signal intensities for each locus, respectively. β-values range from zero to one, with scores of zero indicating no DNA methylation and scores of one indicating complete DNA methylation. Cell lines, PBMC from healthy donors and ATL patients, were treated with 5-aza-2-deoxycytidine (5Aza; Sigma-Aldrich) and analyzed for KIR3DL2 expression by flow cytometry after 72 hours of incubation.

Immunohistochemistry analysis

Tissues sections were colored with hematoxylin and eosin staining (HE) and immunohistochemistry was performed with the following antibodies: anti-CD3 (Dako, polyclonal, 1/200), anti-CD7 (Novocastra, LP15, 1/100). KIR3DL2 expression was assessed on frozen lymph node (LN) or cutaneous biopsies with KIR3DL2-specific MOG1-MK323-12B11 monoclonal antibody (provided by Innate Pharma, Marseille, France), at 10µg/ml dilution. All staining were performed with an automated Stainer Leica Biosystem Bond III.

Multiparameter flow cytometry

Multiparameter staining of lymphocytes was performed with 8-color mixes of the following commercial reagents anti -CD3-A700, -CD4-V450, -CD8-PerCP-Cy5.5, -CD45-V500, -CD20-PB, -TCRαβ-PE, -CD7-APC, -CD25-PE-Cy7, -HLA-DR-FITC, -KIR2DL1/2DS1-PE (11BP6 Miltenyi), -KIR2DL3/2DL2/2DS2-PE (GL183 Beckmann), -NKG2A-PE (Z199 Beckmann), -NKG2C-PE (134591 R&D). KIR3DL2 and NKp46 detections in flow cytometry were performed using anti-KIR3DL2 mAb

clone 13E4 and anti-NKp46 mAb clone 9E2-PE (Innate Pharma) conjugated to R-Phycoerythrin (13E4- PE; PhycoPro #PB31; ProZyme). Data were analyzed on a FACSCanto II using FlowJo v10.2 software (BD Biosciences).

PrimeFlow RNA assay

PrimeFlow RNA assay, a flow cytometry–based RNA detection technology using the branched-DNA technology to amplify the signal from the *TAX* mRNA, was conducted following the manufacturer's instructions (Prime RNA flow, Affymetrix Inc.). Briefly, $1x10^6$ PBMCs were stained with viability dye (eBioscience) for 30 minutes at room temperature, and by surface antibodies (anti-CD3-FITC, anti-CD4-APC-Cy7, anti-KIR3DL2-PE) for 1 h at 4 °C. Cells were fixed with a first fixation buffer for 30 min, permeabilized and fixed a second time for 1 h. To detect mRNA, probes comprised of ~20 oligonucleotide base pairs against the mRNA of interest were used. We used two different types of probes with unique tag sequences, named type 1 and type 4, which allows the hybridization of specific complementary branched DNA nanostructure with different excitation/emission spectra (type 1 – 650/668 and type 4 – 495/519). Following washing, cells were then incubated with the corresponding probes *TAX* mRNA (#VF1-19939 – type 1) and RPL13A (#63129-08 – type 4) as internal positive control for 2 h at 40 °C, allowing effective target probes hybridization to the respective viral RNA strands. Following several washing steps, signal amplification was achieved by performing sequential hybridization with DNA branches (i.e. Pre-Amplifier and Amplifier). Each incubation was conducted for 1.5 h at 40 °C. For signal detection, fluorochrome-conjugated Label Probes were diluted 1:100 in Label Probe diluent, added to the samples and allowed to hybridize for 1 h at 40°C. Following several washing steps, antibody and probe fluorescent signals were then quantified by flow cytometry and analyzed on a LSR Fortessa, using FACS DIVA software version 7 (BD Biosciences, San Jose CA).

Imaging flow cytometry (ImageStream)

Cells were stained and fixed as described in the "prime flow RNA assay" section. Image acquisition was performed using the ImageStream system and analyzed on an Imagestream ISX mkII (Amnis Corp. Millipore). Between 30 000 and 50 000 events were collected in all experiments. Single stain controls were run for each fluorochrome used, and spectral compensation was performed in IDEAS software

(version 6.2, Amnis Corp. Millipore). Specific masks were designed for the analysis of the nuclear or the cytoplasmic localization of *KIR3DL2* and *TAX* mRNA on viable cells.

Ex vivo autologous ADCC assays

Autologous killing experiments were performed on sorted cells with the indicated monoclonal antibodies (mAbs). For the sorted cell setting, PBMCs were split into two samples to purify CD4+ T cells and autologous NK cells by negative selection with the respective MACS isolation kits (Miltenyi Biotech). Sorted CD4+ T cells were preincubated for 30 minutes at room temperature with anti-KIR3DL2 IPH4102, negative control HUC-IC or positive control anti-CD52 alemtuzumab at 20 µg/mL and then mixed with the autologous NK lymphocytes at the indicated E/T ratios. Incubation was conducted for 4 to 6 hours at 37°C in RPMI/10% FBS. For ADCC assays on PBMC, NK and KIR3DL2+ CD4+ T-cells contents were determined by flow cytometry to evaluate the initial E/T ratio. ATL cells death was monitored by multicolor flow cytometry through the incorporation of 7-aminoactinomycin D (7-AAD; eBioscience).

Statistical analysis

Continuous data were summarized using median and compared using the unpaired t-test. Confidence intervals were estimated using a continuity correction. The KIR3DL2 was assessed as positive or negative to define two groups. Survivals were estimated using the Kaplan-Meier method on these two groups and comparisons were made using the log-rank test. Graphics and statistical analysis were performed using GraphPad/Prism7 and R software. P-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

KIR3DL2 protein expression is associated with acute-type ATL

First, expression of NK receptors (KIR2DL1/2DS1, KIR2DL2/2DL3/2DS2, KIR3DL2, NKG2A, NKG2C, NKp46) was assessed on peripheral blood (PB) in 21 ATL patients by MFC. Lymphocytes were selected by FSC/SSC properties. After exclusion of doublets, ATL cells were identified by the low expression of CD3, the expression of CD4 and activation markers (CD25 and/or HLA-DR) and the absence of CD7 (**Fig. 1A**). KIR3DL2 was the only NK receptor that was expressed by CD4+ CD7- CD25+ ATL tumor cells (**Fig. 1B**). KIR3DL2 expression was next assessed by IHC in 21 FFPE biopsies. In 11 ATL patients, abnormal lymphocytes harbored heterogeneous KIR3DL2 expression by IHC (**Fig. 1C**). In total, KIR3DL2 was assessed on 75 samples from a cohort of 50 ATL patients and 8 HTLV-1 asymptomatic carriers (AC) by MFC and/or IHC (**Supplementary Table 1**). In almost all acute ATL patients, abnormal lymphocytes harbored KIR3DL2 positivity (n=28/30, 93%). In contrast, lymphoma and chronic/smoldering cases were often negative for KIR3DL2 (n=2/8 and n=2/12 KIR3DL2+ respectively). Moreover, KIR3DL2 became positive during the acute transformation in two patients initially diagnosed with a chronic-type ATL and in another patient initially diagnosed with a lymphoma-type ATL. KIR3DL2 expression was not expressed on normal CD4+ lymphocytes from PB of 7 HTLV-1 infected patients. Some rare scattered cells expressed KIR3DL2 on lymph node biopsy from one HTLV-1 infected patient who presented a Kikuchi disease. KIR3DL2 expression was next assessed on the normal population of CD4+ CD7- T-lymphocytes from PB of 19 healthy donors as control and was negative (median MFI 22 [3.9-68.3] vs. 307 [65.9-695.6] in ATL patients, p=0.0002). *KIR3DL2* mRNA expression was assessed by RT-qPCR on PB from 48 ATL patients with a tumor infiltration higher than 85% and 5 HTLV-1 AC. *KIR3DL2* mRNA was expressed in most of acute (n=23/30, 74%) and chronic-type (n=8/14, 57%) ATL cases but was absent in lymphoma-type ATL (n=0/5). PB cells expressed *KIR3DL2* mRNA in 3 HTLV-1 carriers (n=3/5) (**Fig. 1D**). In contrast, KIR3DL2 was not expressed neither at a protein nor mRNA level in HTLV-1 infected cell lines (HUT-102, MT-2, MT-4, C91PL) or ATL derived cell line (TL-OmI, C8166).

The diagnostic value of KIR3DL2 expression was confirmed by the associated-prognostic impact of KIR3DL2 expression in the whole ATL cohort. The 5-year rate of OS was significantly shorter in KIR3DL2+ cases compared to KIR3DL2 negative cases (5-year OS 12.9% vs. 54.5% respectively, p=0.0001) (**Fig. 1E**). KIR3DL2+ cases included 25 acute-type, 2 lymphoma-type and 2 chronic/smoldering-type ATL that explain the extremely dismal prognosis associated with KIR3DL2 expression. KIR3DL2 negative cases included 2 acute-type, 6 lymphoma-type and 8 chronic/smoldering-type ATL. In the subgroup of aggressive subtypes, the 5-year rate of OS was significantly shorter in KIR3DL2+ cases compared to KIR3DL2 negative cases (5-year OS 7% vs. 37% respectively, p=0.0132) (**Supplementary Fig. 1**).

In sum, KIR3DL2 protein expression was mainly associated with acute-type ATL without mRNA expression correlation. In addition, KIR3DL2 is associated with shorter survival among aggressive subtypes of ATL.

KIR3DL2 expression correlated with *KIR3DL2* gene promoter hypomethylation in primary ATL cells

We assessed the DNA methylation profiles of *KIR3DL2* promoter in 28 ATL samples (19 acute PB samples, 2 lymphoma lymph node samples and 7 chronic PB samples subtypes), 4 HTLV-1 AC PB samples and CD4+ TL from 4 healthy controls. The tumor infiltration was higher than 85% in acute-type ATL samples. The *KIR3DL2* promoter (pobe ID: cg12304663, 4 sites) was significantly hypomethylated in acute ATL compared to lymphoma, chronic/smoldering types and HTLV-1 AC (p=0.0119, p<0.0001, and p<0.0001, respectively; unpaired t-test) that was consistent with KIR3DL2 expression (**Fig. 2A**). To test whether *KIR3DL2* transcription is a consequence of DNA hypomethylation, we next assessed induction of KIR3DL2 transcription in KIR3DL2 positive (Hut 78) and KIR3DL2 negative (Jurkat) T-cell lines following 5Aza treatment, an inhibitor of DNA methylases. Flow cytometric analyses demonstrated that upon 5Aza treatment for 72 h, KIR3DL2 protein expression was efficiently induced with a dose-dependent effect on the cell surface of Hut 78 but not on Jurkat cells (**Fig. 2B**). Moreover, KIR3DL2 expression was not increased on primary PBMC from healthy donors and from 4 KIR3DL2+ ATL patients upon 5Aza treatment *in vitro* (**Fig. 2C**). Finally, CD4+ T cells from 2 patients treated by 5Aza *in vivo* for a myelodysplastic syndrome, did not express KIR3DL2.

In sum, KIR3DL2 protein expression may be maintained through DNA hypomethylation at the *KIR3DL2* promoter locus in ATL cells. However DNA-demethylating treatment is not sufficient to induce KIR3DL2 expression from a negative basal state.

TAX mRNA and KIR3DL2 expressions are correlated in primary ATL cells

Using a prime-flow RNA assay combined with immunolabeling of KIR3DL2, we assessed the correlation of *TAX* mRNA and KIR3DL2 expressions in primary ATL cells from 3 acute-type ATL patients. Succinctly, the prime-flow RNA assay is based on the binding of a *TAX* specific oligonucleotide probe set to *TAX* RNA sequence, followed by hybridization of multiple amplifier molecules for signal amplification and conjugation to fluorescent dye that can be quantified by flow cytometry. Lymphocytes were identified by FSC/SSC properties and alive cells were selected after exclusion of doublets. CD3 and CD4 positive lymphocytes were then assessed for *TAX* mRNA and KIR3DL2 expressions. For two patients, analyses were performed using the ImageStream X Mark II imaging flow cytometer and the IDEAS v6 software (Amnis) that combines flow cytometry with detailed cell-imaging to analyze a very high number of events. A correlation between *TAX* mRNA and KIR3DL2 expressions was found on ATL tumor cells (**Fig. 3C**). Of note, it is known that Tax expression is faint in fresh primary ATL cells[19], but nearly 50% of ATL cases express viral antigens after *ex vivo* culture[20]. Due to our methodology, the primary ATL cells were cultured *in vitro* for 12-15 hours after the ficoll and before the prime-flow RNA assay that could explain the *TAX* positivity in our results.

In sum, HTLV-1 has a preferential tropism for KIR3DL2 positive T-cells in ATL patients.

HTLV-1 infection induced KIR3DL2 expression on CD4+ T-cells

To explore the role of HTLV-1 infection on the KIR3DL2 expression, we assessed KIR3DL2 expression by MFC in activated primary PBMC, obtained from healthy donors that were uninfected or infected with HTLV-1 *in vitro*. We used a purification method for HTLV-1 viruses by ultracentrifugation of the MT-2 supernatants. We then quantified purified virions by using HTLV-1 p19 protein titration by an Elisa kit.

Purified HTLV-1 virions induced KIR3DL2 expression by CD4+ T-cells that was dependent on the quantity of HTLV-1 (p19 equivalent, n=3; **Fig. 3A**). In contrast, KIR3DL2 expression was not induced by activation of CD4+ T-cells with PHA/IL-2. The induced KIR3DL2 expression was observed only in "late" infected cells after 7 days of culture but not in "early" infected cells after 24 hours of culture. Quantification of HTLV-1 PVL by RT-PCR was positive in infected-PBMC samples, which attests the existence of a retrotranscription and probably HTLV-1 integration. Of note, KIR2DS4 but not KIR3DS1 nor NKp46 was induced by HTLV-1 infection (**Supplementary Fig. 2**).

Using the prime-flow RNA assay combined with immunolabeling of KIR3DL2, we assessed the correlation of *TAX* mRNA and KIR3DL2 expressions in CD4+ infected T-cells. As expected, *TAX* mRNA was induced by HTLV-1 infection, in a dose-dependent manner. KIR3DL2 and *TAX* mRNA expressions were correlated on CD4 lymphocytes. Moreover, *TAX* mRNA was mostly expressed in KIR3DL2 positive CD4+ lymphocytes, while KIR3DL2 negative CD4+ lymphocytes were also negative for *TAX* mRNA (**Fig. 3B and supplementary Fig. 3**).

In sum, infection of CD4+ T-cells with HTLV-1 is able to induce KIR3DL2 expression, particularly in 'late-infected' CD4+ T-cells.

IPH4102 efficiently eliminates KIR3DL2+ primary ATL tumor cells by autologous NK cells *ex vivo*

IPH4102 is a humanized IgG1 directed against KIRDL2 that was selected to exert potent antitumor effector functions. We evaluated the antitumor efficacy of IPH4102 using tumor cells from ATL patient as targets (T) and autologous NK cells as effectors (E). This autologous model is relevant, as it takes into account both the actual functional state of NK cells in ATL patients, and the intrinsic sensitivity of tumor cells to IPH4102-mediated ADCC. Antitumor activity of IPH4102 against primary ATL cells was observed in all KIR3DL2 positive patient samples tested (n=3) and increased with the E/T ratio (**Fig. 4, patient 3**). In most cases, IPH4102 antitumor effect is evidenced at an E/T ratio equal or superior to 1/1. Regardless of the E/T ratio, the unspecific baseline of NK-mediated cytotoxicity remained negligible, as shown by the absence of increased killing with HUX-IC. Moreover, IPH4102 did not mediated killing of KIR3DL2 negative ATL patient samples (n=5)

(**Fig. 4, patient 6**). In the same assay, we also evaluated the detrimental cell death of patients' effector NK cells induced by the incubated antibodies. For all patients, IPH4102 did not promote NK cell death.

In sum, primary KIR3DL2+ ATL cells are selectively sensitive to ADCC mediated by IPH4102 through KIR3DL2 targeting. NK cells from ATL patients are functional and able to mediate potent IPH4102-driven ADCC.

DISCUSSION

Based on the retrospective analysis of a French cohort, we showed that KIR3DL2 expression is a useful biomarker for identifying acute-type ATL. In addition, the HTLV-1 may play a role in KIR3DL2 expression in ATL cells, combined to DNA methylation of the *KIR3DL2* gene promoter. Finally, we provide here evidence that KIR3DL2 might represent a novel therapeutic target in KIR3DL2-positive ATL, a disease lacking efficient therapy.

It has been recently demonstrated that high KIR3DL2 expression is a characteristic feature of Sezary syndrome[12–14] and transformed mycosis fungoides but significant KIR3DL2 expression has been identified in all cutaneous T-cell lymphoma[8]. We show that KIR3DL2 expression is also a hallmark of acute-type ATL cells. Moreover, KIR3DL2 expression was associated with decreased survival rate (5-year rate of OS 12.9% vs. 54.5%, p=0.0001) in keeping with the poor outcome of acute-type ATL patients[21]. Since KIR3DL2 can be easily detected in frozen tissue sections and in flow cytometry by the specific anti-KIR3DL2 13E4 antibody, KIR3DL2 represents a robust marker to facilitate the diagnosis of acute-type ATL. ATL cells usually express CD3, CD4, and CD25 but lack CD7[22]. Moreover, the ectopic expression of TSLC1/CADM1 could provide a biomarker for HTLV-I–infected cells and acute-type ATL[23,24]. In the early stage of ATL development (from asymptomatic carriers to indolent ATL), the CADM1+ subpopulation increases concomitantly with clonal growth of these subpopulations. Loss of CD7 in the CADM1+ subpopulation is associated with onset of aggressive ATL[25,26] but no positive marker of acute-type ATL has been identified. Despite some positivity in rare lymphoma and chronic-type ATL, KIR3DL2 expression might thus easily identify acute-type ATL, as well as transformation from chronic to acute-type ATL.

KIR expressions display a clonally distributed and stable expression in human NK cells but can be acquired in T-lymphocytes under chronic antigenic stimulation or after exposition to cytokines[27,28]. KIR3DL2 expression may be also acquired by transformed malignant T cells, but the mechanisms leading to its expression remains to be explained[29]. Although activation of CD4+ T-cells did not induce the surface expression of KIR3DL2 protein, we showed that HTLV-1 infection triggered the

KIR3DL2 expression by CD4+ cells. It remains unknown whether HLTV-1 induced KIR3DL2 transcription in CD4+ cells or whether HTLV-1 is able to induce specific proliferation of a preexisting KIR3DL2+ CD4+ T cells subpopulation. Indeed, the origin of the ATL cells remains a subject under debate[30] and a small population of KIR3DL2+ CD4 T cells has been identified in healthy donors. Moreover, this effect is only seen in late infection, and is associated to viral integration that may be due either to an HTLV-1-dependant chronic antigenic stimulation or to a transcriptional activity of viral proteins. We showed a correlation between *TAX* mRNA and KIR3DL2 protein expressions in HTLV-1 infected CD4+ cells *in vitro*, as well as in primary ATL cells *ex vivo* after 4-6 hours of culture, that suggest a role for Tax in KIR3DL2 expression induction. In addition, DNA methylation of *KIR3DL2* promoter is shown to be critically involved in KIR3DL2 expression in ATL cells. Analysis of the methylation patterns of CpG islands surrounding the transcriptional start site of *KIR3DL2* gene revealed that its hypomethylating status consistently correlates with its transcriptional activity in primary ATL cells. The methyltransferase inhibitor 5Aza enabled experimental increase of KIR3DL2 expression in a KIR3DL2+ cell line, but not in primary CD4+ normal lymphocytes, ATL cells or other KIR3DL2 negative T-cell line. Taken together, these results suggest that induction of *KIR3DL2* gene transcription may be triggered by HTLV-1 infection followed by transcription maintenance due to DNA hypomethylation of the gene promoter. This scheme in two steps may explain why KIR3DL2 expression was restricted to acute-type ATL despite an HTLV-1 integration in all ATL subtypes. Whether Tax may itself plays a role in KIR3DL2 expression remains to be explored. Indeed, there are some binding sites for NFkB and CREB, two transcription factors known to be activated by Tax[2], in the *KIR3DL2* gene promoter. Along with the mechanisms responsible for ectopic KIR3DL2 expression, elucidation of its role in lymphomagenesis is required. KIR3DL2 is a member of the KIR family, whose ligand specificity was assigned to HLA-A3 and HLA-A11 through a peptide–specific interaction[31], to the open conformers of the MHC class I molecule HLA-F[32] and to HLA-B27 homodimer through a peptide–independent recognition[33]. Because of its primary amino acid sequence, KIR3DL2 engagement is supposed to induce an inhibitory role in NK cells. However, CpG oligodeoxynucleotides (ODNs) were also identified as KIR3DL2 ligands on NK cells, the interaction between CpG DNA and KIR3DL2 leading to endocytosis and to NK cell activation[34]. In SS, KIR3DL2 has a possible role in the

maintenance of a high circulating malignant-cell burden by preventing activation-induced cell death (AICD)[35], but KIR3DL2 engagement by CpG ODNs may also promotes the internalization of the receptor leading to apoptotic signals in Sezary cells[36].

International consensus for ATL treatment strategy is based on the clinical subtype, prognostic factors, and response to initial therapy[37]. Despite intensive chemotherapy regimens, up-front allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for relatively young patients[21], arsenic trioxide combined to interferon alpha and zidovudine for chronic-type ATL[38,39] and defucosylated humanized anti-CC chemokine receptor 4 (CCR4) monoclonal antibody (mogamulizumab) for relapsed/refractory CCR4-positive aggressive ATL[40], the prognosis of ATL remains very poor, with median survival of acute-type ATL of only 8.3 months[21]. As a proof of concept, we showed that IPH4102 was effective in autologous killing assays *ex vivo*, in which it induces NK cell–based lysis of autologous primary ATL cells, demonstrating both the sufficient functional integrity of patients' NK cells, and the sensitivity of primary tumor cells to ADCC through KIR3DL2 targeting. Therefore these data provide an experimental rationale for considering clinical studies using anti-KIR3DL2 ADCC in the treatment of acute-type ATL patients.

In conclusion, this study demonstrates that KIR3DL2 delineates most acute-type ATL. The induction of KIR3DL2 by HTLV-1 infection has identified a previously unknown trigger by which CD4+ cells can express KIR protein. Further studies will be needed to determine the role of KIR3DL2 in lymphomagenesis. In addition, our findings open the path to a novel therapy in acute-type ATL.

REFERENCES

1. Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br. J. Haematol.* 1991;79(3):428–437.
2. Watanabe T. Adult T-cell leukemia: molecular basis for clonal expansion and transformation of HTLV-1–infected T cells. *Blood*. 2017;129(9):1071–1081.
3. Matsuoka M, Jeang K-T. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene*. 2011;30(12):1379–1389.
4. Tamiya S, Matsuoka M, Etoh K, et al. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood*. 1996;88(8):3065–3073.
5. Bangham CRM. CTL quality and the control of human retroviral infections. *Eur. J. Immunol.* 2009;39(7):1700–1712.
6. Cook LB, Melamed A, Niederer H, et al. The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2014;123(25):3925–3931.
7. Taniguchi Y, Nosaka K, Yasunaga J, et al. Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. *Retrovirology*. 2005;2:64.
8. Battistella M, Leboeuf C, Ram-Wolff C, et al. KIR3DL2 expression in cutaneous T-cell lymphomas: expanding the spectrum for KIR3DL2 targeting. *Blood*. 2017;130(26):2900–2902.
9. Obama K, Kubota R, Tara M, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor/3DL2 expression in adult T-cell leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2007;138(5):666–667.
10. Hurabielle C, Leboeuf C, Ram-Wolff C, et al. KIR3DL2 expression in patients with adult T-cell lymphoma/leukaemia. *Br. J. Dermatol.* 0(0):
11. Bouaziz J-D, Remtoula N, Bensussan A, Marie-Cardine A, Bagot M. Absolute CD3+ CD158k+ lymphocyte count is reliable and more sensitive than cytomorphology to evaluate blood tumour burden in Sézary syndrome. *Br. J. Dermatol.* 2010;162(1):123–128.
12. Michel L, Jean-Louis F, Begue E, Bensussan A, Bagot M. Use of PLS3, Twist, CD158k/KIR3DL2, and NKp46 gene expression combination for reliable Sézary syndrome diagnosis. *Blood*. 2013;121(8):1477–1478.
13. Ortonne N, Le Gouvello S, Mansour H, et al. CD158K/KIR3DL2 transcript detection in lesional skin of patients with erythroderma is a tool for the diagnosis of Sézary syndrome. *J. Invest. Dermatol.* 2008;128(2):465–472.
14. Ortonne N, Le Gouvello S, Tabak R, et al. CD158k/KIR3DL2 and NKp46 are frequently expressed in transformed mycosis fungoides. *Exp. Dermatol.* 2012;21(6):461–463.
15. Battistella M, Janin A, Jean-Louis F, et al. KIR3DL2 (CD158k) is a potential therapeutic target in primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma. *Br. J. Dermatol.* 2016;n/a-n/a.
16. 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.
17. Bagot M, Porcu P, Ram-Wolff C, et al. Phase I Study of IPH4102, Anti-KIR3DL2 Mab, in Relapsed/Refractory Cutaneous T-Cell Lymphomas (CTCL): Dose-

escalation Safety, Biomarker and Clinical Activity Results. *Hematol. Oncol.* 2017;35:48–49.
18. Marçais A, Waast L, Bruneau J, et al. Adult T cell leukemia aggressivenness correlates with loss of both 5-hydroxymethylcytosine and TET2 expression. *Oncotarget*. 2016;8(32):52256–52268.
19. Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, et al. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat. Genet.* 2015;47(11):1304–1315.
20. Kurihara K, Harashima N, Hanabuchi S, et al. Potential immunogenicity of adult T cell leukemia cells in vivo. *Int. J. Cancer*. 2005;114(2):257–267.
21. Katsuya H, Ishitsuka K, Utsunomiya A, et al. Treatment and survival among 1594 patients with ATL. *Blood*. 2015;126(24):2570–2577.
22. Hattori T, Uchiyama T, Toibana T, Takatsuki K, Uchino H. Surface phenotype of Japanese adult T-cell leukemia cells characterized by monoclonal antibodies. *Blood*. 1981;58(3):645–647.
23. Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, et al. CADM1 Expression and Stepwise Downregulation of CD7 Are Closely Associated with Clonal Expansion of HTLV-I–Infected Cells in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2014;20(11):2851–2861.
24. Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, et al. Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood*. 2005;105(3):1204–1213.
25. Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, et al. Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3(dim) CD7(low) subpopulation of CD4(+) T cells in acute-type adult T-cell leukemia. *Cancer Sci.* 2011;102(3):569–577.
26. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, et al. The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I. *PloS One*. 2013;8(1):e53728.
27. Björkström NK, Béziat V, Cichocki F, et al. CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells. *Blood*. 2012;120(17):3455–3465.
28. Correia MP, Costa AV, Uhrberg M, Cardoso EM, Arosa FA. IL-15 induces CD8+ T cells to acquire functional NK receptors capable of modulating cytotoxicity and cytokine secretion. *Immunobiology*. 2011;216(5):604–612.
29. Ortonne N, Huet D, Gaudez C, et al. Significance of circulating T-cell clones in Sézary syndrome. *Blood*. 2006;107(10):4030–4038.
30. Nagai Y, Kawahara M, Hishizawa M, et al. T memory stem cells are the hierarchical apex of adult T-cell leukemia. *Blood*. 2015;125(23):3527–3535.
31. Hansasuta P, Dong T, Thananchai H, et al. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur. J. Immunol.* 2004;34(6):1673–1679.
32. Garcia-Beltran WF, Hölzemer A, Martrus G, et al. Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1. *Nat. Immunol.* 2016;17(9):1067–1074.
33. Kollnberger S, Chan A, Sun M-Y, et al. Interaction of HLA-B27 homodimers with KIR3DL1 and KIR3DL2, unlike HLA-B27 heterotrimers, is independent of the sequence of bound peptide. *Eur. J. Immunol.* 2007;37(5):1313–1322.
34. Sivori S, Falco M, Carlomagno S, et al. A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2. *Blood*. 2010;116(10):1637–1647.

35. Thonnart N, Caudron A, Legaz I, et al. KIR3DL2 is a coinhibitory receptor on Sézary syndrome malignant T cells that promotes resistance to activation-induced cell death. *Blood*. 2014;124(22):3330–3332.
36. Ghazi B, Thonnart N, Bagot M, Bensussan A, Marie-Cardine A. KIR3DL2/CpG ODN Interaction Mediates Sézary Syndrome Malignant T Cell Apoptosis. *J. Invest. Dermatol.* 2015;135(1):229–237.
37. Tsukasaki K, Hermine O, Bazarbachi A, et al. Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2009;27(3):453–459.
38. Kchour G, Tarhini M, Kooshyar M-M, et al. Phase 2 study of the efficacy and safety of the combination of arsenic trioxide, interferon alpha, and zidovudine in newly diagnosed chronic adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). *Blood*. 2009;113(26):6528–6532.
39. Dassouki Z, Sahin U, Hajj HE, et al. ATL response to arsenic/interferon therapy is triggered by SUMO/PML/RNF4-dependent Tax degradation. *Blood*. 2015;125(3):474–482.
40. Ishida T, Joh T, Uike N, et al. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter phase II study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2012;30(8):837–842.

FIGURES

Figure 1: Expression of NK receptors by ATL tumor cells

A. Gating strategy to assess ATL involvement and KIR3DL2 expression on tumor cells in a peripheral blood (PB) sample.

B. Heatmap of NK receptors expression by multiparameter flow cytometry in PB samples from 21 ATL patients.

C. KIR3DL2 protein expression by immunohistochemistry in representative lymph node frozen biopsies (x 200) from one acute-type and one lymphoma-type ATL patients.

D. *KIR3DL2* mRNA expression assessed by RT-qPCR on peripheral blood (PB) from 48 ATL patients and 5 HTLV-1 AC, as well as in CD4+ TL from 4 healthy donors and Hut 78 cell lines.

E. Overall survival of ATL when tumor cells are positive (red solid line) or negative (black dashed line) for KIR3DL2.

Figure 2: Role of DNA methylation in KIR3DL2 expression

A. Differential methylation at the *KIR3DL2* locus (cg12304663_2, cg12304663_3, cg12304663_4, cg12304663_5) using beta-value method measured by Illumina 450K array-based methylome analysis in a total sample set of 19 acute, 2 lymphoma, 7 chronic/smoldering forms of ATL patients, 4 HTLV-1 carriers and 4 control CD4+ TL. Each dot represents an individual CpG per patient from beta-value analysis. *P* value was determined using unpaired t-test testing. Bars indicate median.

B. KIR3DL2 protein expression change determined by flow-cytometry, assessed by mean fluorescent intensity (MFI) change in Hut 78 (black) and Jurkat (grey) cells incubated with 0, 1, 2, 4, 8 or 16 µmol/L of 5-azacytidine for 3 days. Error bars represent the standard deviation. Asterisks indicate a statistically significant difference ($p \leq 0.05$)

C. KIR3DL2 protein expression change quantified by flow-cytometry, assessed by mean fluorescent intensity (MFI), on ATL cells incubated with 0 and 8 µmol/L of 5-azacytidine for 3 days.

Figure 3: Correlation between *TAX* mRNA and KIR3DL2 expressions in infected CD4+ TL and on primary ATL tumor cells

A. Cell-free HTLV-1 virions induced KIR3DL2 expression by CD4+ T-cells. PBMC from healthy donor were cultured in the absence or presence of several concentrations of HTLV-1 (p19-equivalent), and surface KIR3DL2 expression was quantified by flow-cytometry.

B. Correlation between *TAX* mRNA and KIR3DL2 protein expressions in CD4+ T-cells from healthy donors infected by HTLV-1 virions *in vitro*, after 7 days of culture, quantified by prime-flow RNA assay combined with immunolabeling of KIR3DL2. *TAX* mRNA was mostly expressed in KIR3DL2 positive CD4+ lymphocytes, while KIR3DL2 negative CD4+ lymphocytes were also negative for *TAX* mRNA.

C. The primary ATL cells from 3 patients were cultured *in vitro* for 12-15 hours after the ficoll, before the prime-flow RNA assay. *TAX* mRNA and KIR3DL2 surface expressions were quantified by the ImageStream X Mark II imaging flow cytometer for 2 acute-type ATL patients.

Figure 4: Targeted *ex vivo* antitumor efficacy of IPH4102 against primary ATL cells in an autologous ADCC assay.

CD4+ T cells from KIR3DL2 positive ATL acute patients (n=3) and from KIR3DL2 negative ATL chronic patient (n=5) were preincubated with alemtuzumab (triangles, positive control), rituximab (circles, negative control), or anti-KIR3DL2 mAb 2B12 (red diamonds) at a unique concentration of 20 µg/mL. After the addition of autologous NK cells at the indicated E/T ratio, incubation was conducted for 4 to 6 hours and CD4+ KIR3DL2+ ATL, CD4+ KIR3DL2- or NK cells death was monitored through the incorporation of 7-AAD. Results are expressed as the percentage of 7-AAD positive cells among each population at a given E/T ratio for one KIR3DL2 positive ATL patient (patient 3) and one KIR3DL2 negative ATL patient (patient 6).

Figure 1: Expression of NK receptors by ATL tumor cells

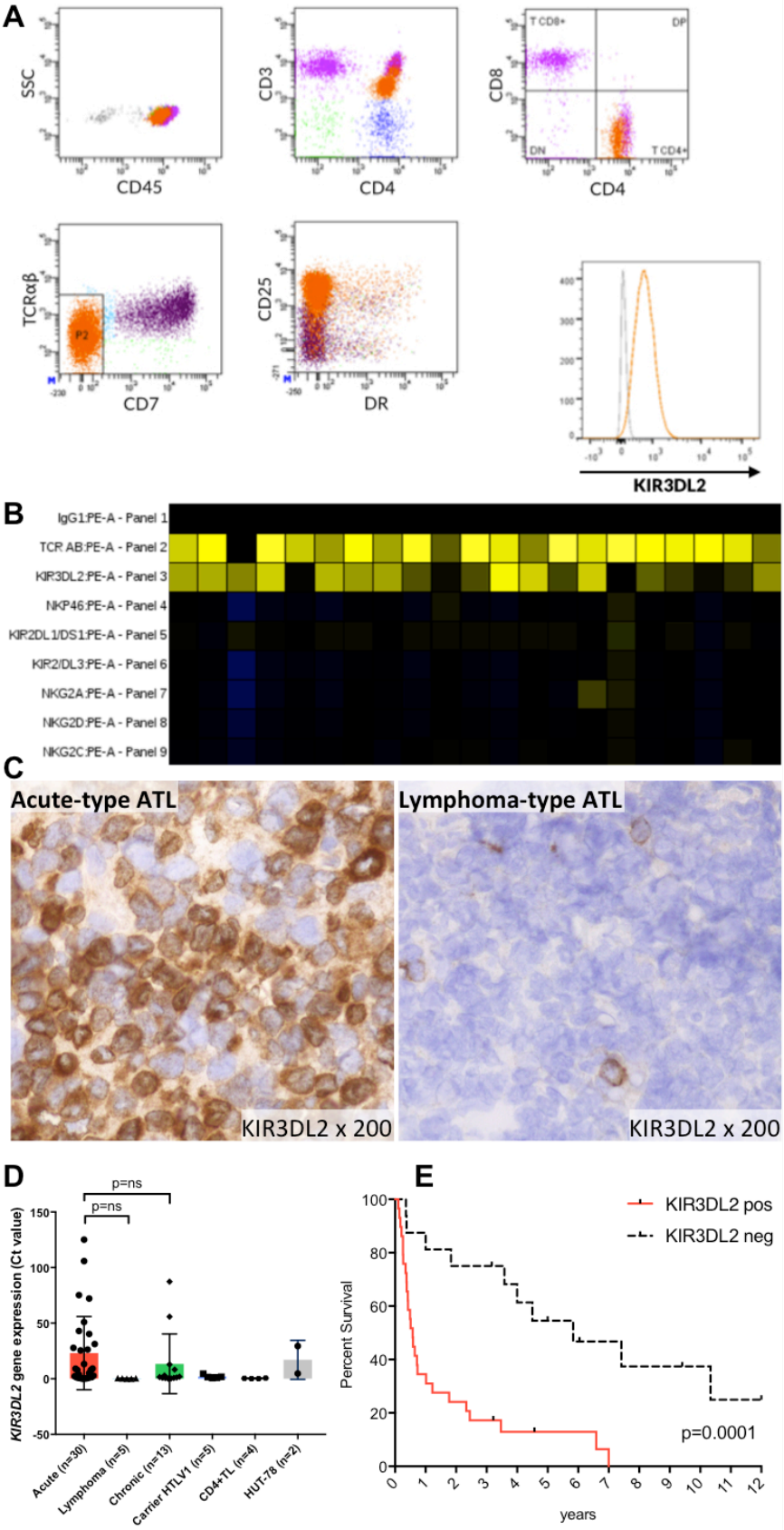


Figure 2: Role of DNA methylation in KIR3DL2 expression

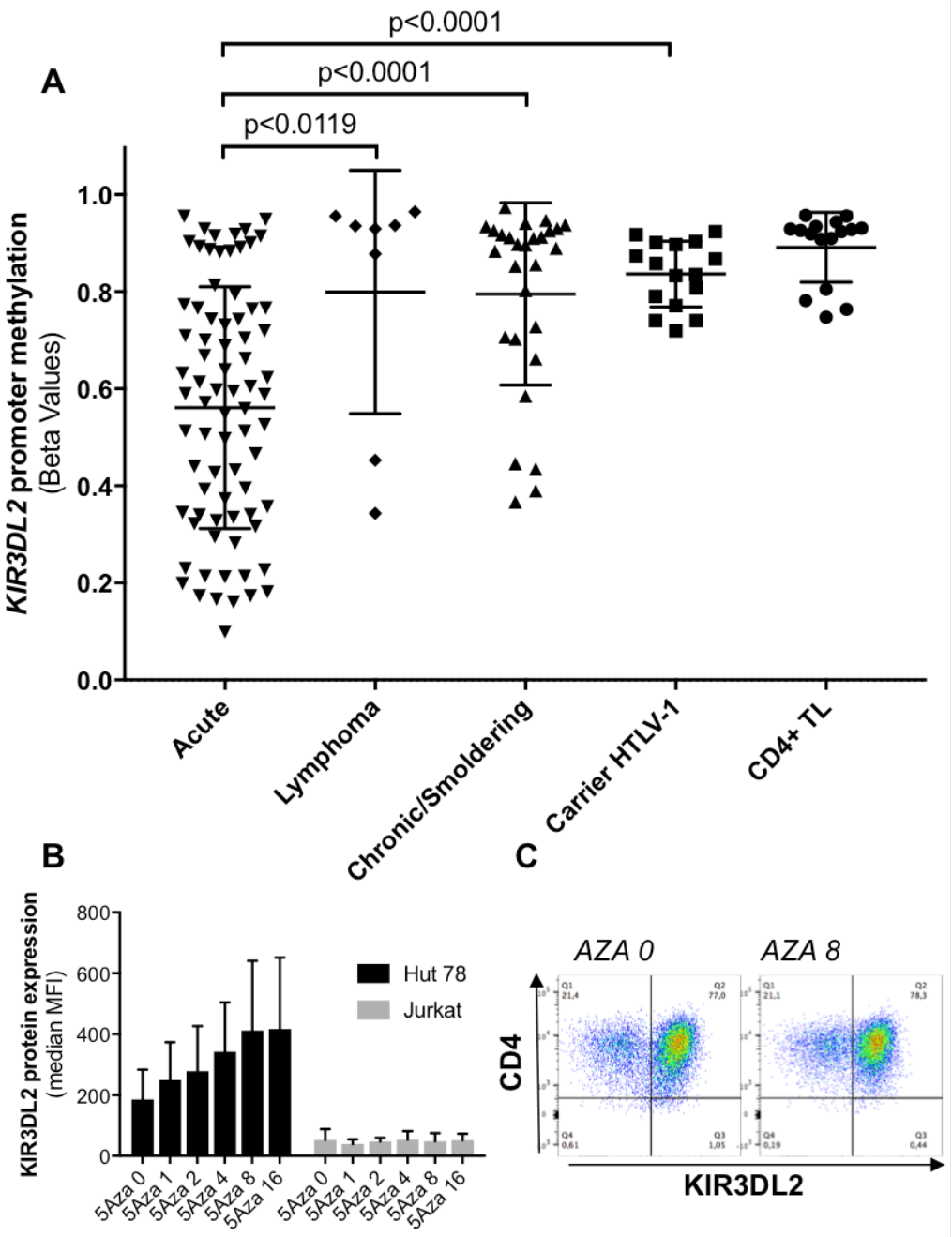


Figure 3: Correlation between *TAX* mRNA and KIR3DL2 protein expressions in infected CD4+ TL and on primary ATL tumor cells

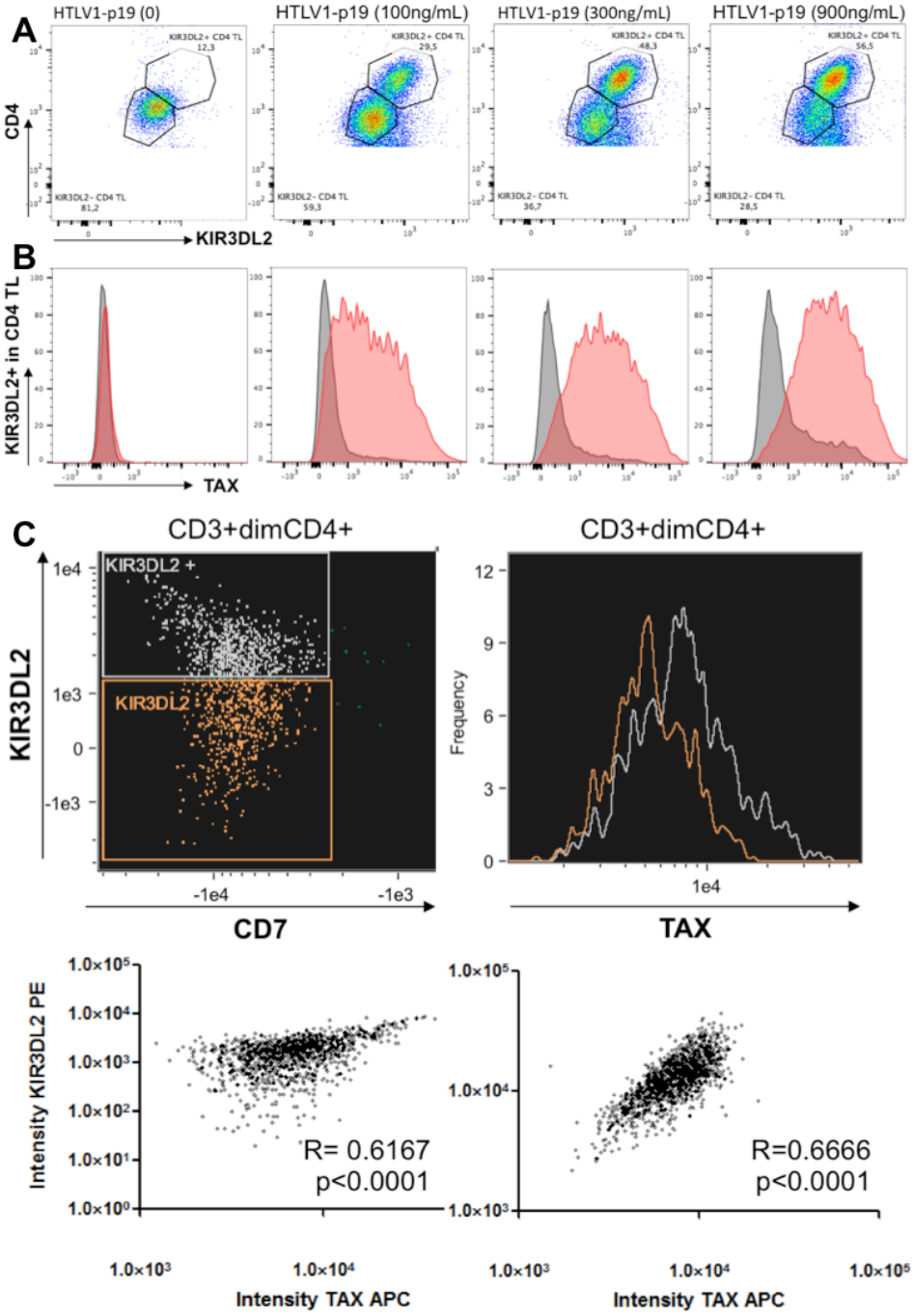
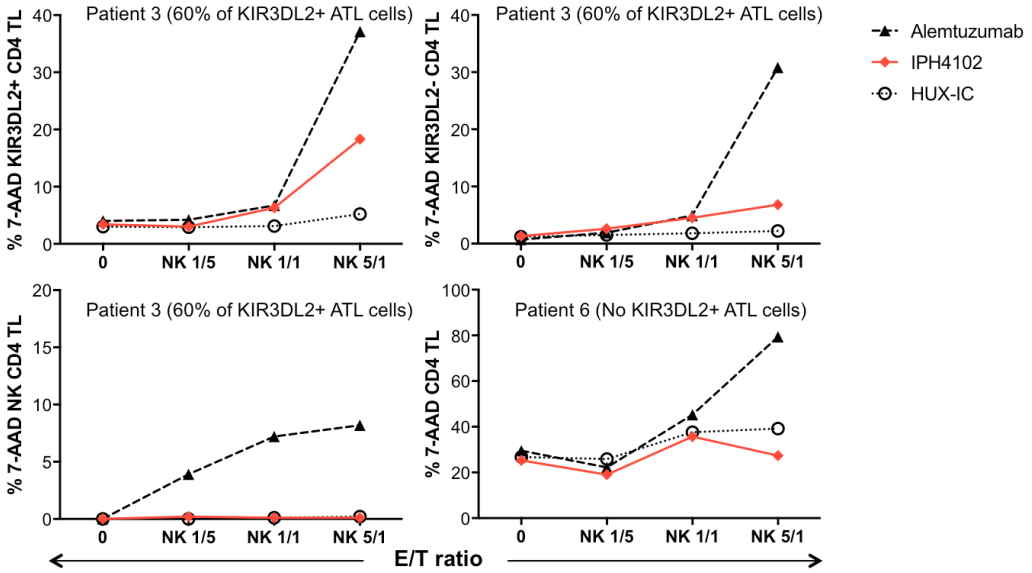


Figure 4: Targeted *ex vivo* antitumor efficacy of IPH4102 against primary ATL cells in an autologous ADCC assay.



SUPPLEMENTARY DATA

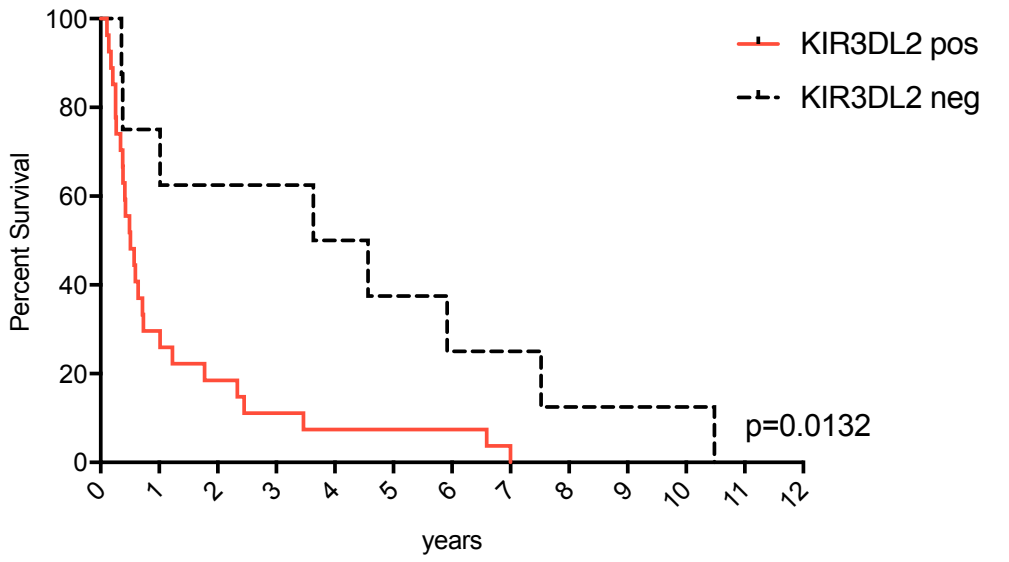
<u>Supplementary Table 1:</u> Details of the ATL patients and KIR3DL2 expression included in the cohort

Patients	Subtype	% tumor cells	PVL	KIR3DL2 protein expression	Sample type	Method	Survival (months)
ATL02	Acute	85%	355	1	PB	MFC	28
ATL04	Acute	NA	NA	1	PB	MFC	29,4
ATL05	Acute	85%	104	1	PB	MFC	1,7
ATL07	Acute	>80%	83	1	PB	MFC	8,8
ATL10	Acute	95%	175	1	PB	MFC	6,9
ATL11	Acute	80%	33	1	LN	MFC	84
ATL26	Acute	100%	NA	1	PB	MFC	Unknown
ATL28	Acute	96%	24	1	PB	MFC	4,6
ATL30	Acute	100%	290	1	PB	MFC	7,7
ATL36	Acute	95%	172	1	PB	MFC	5,9
ATL58	Acute	20%	NA	1	LN	IHC	14,7
ATL59	Acute	>60%	164	1	PB	MFC	3,2
ATL60	Acute	100%	NA	1	PB	MFC	41,6
ATL61	Acute	90%	97	0	PB	MFC	4,3
ATL62	Acute	90%	99	1	PB	MFC	2,5
ATL66	Acute	97%	449	1	PB	MFC	1,3
ATL68	Acute	40%	NA	1	LIVER	IHC	5
ATL69	Acute	80%	NA	1	PB	MFC	4,5
ATL71	Acute	95%	556	0	CUT	IHC	4,5
ATL87	Acute	96%	296	1	PB	MFC	21,3
ATL88	Acute	98%	109	1	PB	MFC	8,6
Dre.	Acute	25%	41	1	PB	MFC	12,2
Duv.	Acute	85%	182	1	PB	MFC	2,1
Hou.	Acute	à voir	NA	1	PB	MFC	Unknown
Joh.	Acute	50%	57	1	PB	MFC	3,1
Luz.	Acute	98%	131	1	PB	MFC	Unknown
Mic.	Acute	52%	264	1	PB	MFC	6,1
Tou.	Acute	10%	NA	1	LN	IHC	79,1
Tur.	Acute	6%	223	1	LN	IHC	3,1
Val.	Acute	50%	2901	1	LN	IHC	5,1
C1	Carrier	0%	NA	1	LN	IHC	37,5
C2	Carrier	4%	7	0	PB	MFC	Unknown
C3	Carrier	14%	30	0	PB	MFC	27,3
C4	Carrier	3%	41	0	PB	MFC	114,6
C5	Carrier	5%	8	0	PB	MFC	76,1
C6	Carrier	5%	41	0	PB	MFC	16,3
C7	Carrier	3%	1	0	PB	MFC	Unknown
C8	Carrier	3%	26	0	PB	MFC	Unknown

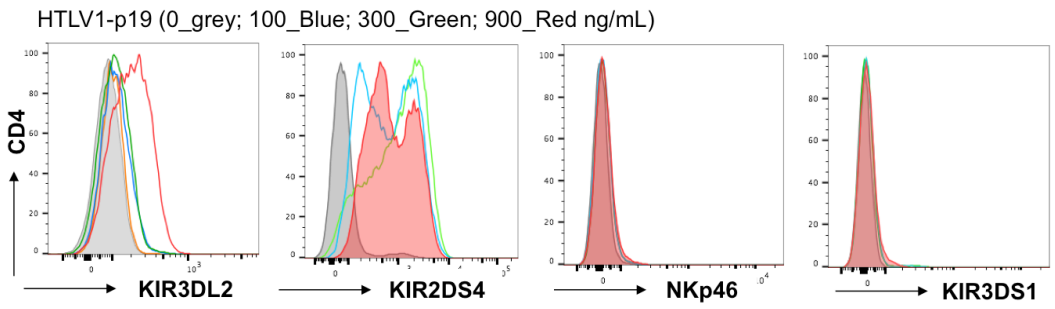
ATL08	Chronic	83%	79	0	PB	MFC	114,6
ATL56	Chronic	70%	99	0	PB	MFC	46
ATL95	Chronic	45%	44	1	CUT	IHC	38,6
ATL95	Chronic	50%	140	0	PB	MFC	38,6
De C.	Chronic	8%	6	0	PB	MFC	287,1
Gre.	Chronic	NA	NA	0	PB	MFC	Unknown
Gro.	Chronic	50%	51	1	CUT	IHC	Unknown
Rad.	Chronic	1%	18	0	PB	MFC	Unknown
ATL03	Lymphoma	6%	NA	0	LN	IHC	71
ATL06	Lymphoma	30%	NA	0	LN	IHC	54,8
ATL13	Lymphoma	NA	NA	0	LN	IHC	90,3
ATL43	Lymphoma	7%	NA	0	LN	IHC	125,8
ATL65	Lymphoma	4%	NA	0	LN	IHC	43,6
ATL90	Lymphoma	0%	NA	1	LN	IHC	4,1
Bui.	Lymphoma	13%	60	1	LN	IHC	7,1
Col.	Lymphoma	10%	19	0	LN	IHC	12,2
ATL09	Smoldering	25%	NA	0	PB	MFC	48,7
ATL63	Smoldering	25%	68	0	PB	MFC	60,9
ATL67	Smoldering	48%	NA	1	PB	MFC	54,8
Bel.	Smoldering	1%	NA	0	LN	IHC	22,3
Per.	Smoldering	10%	8	0	PB	MFC	146,1

PVL: proviral load is expressed as number of proviral copies per 100 PBMC; PB: peripheral blood; LN: lymph node; CUT: cutaneous; MFC: multiparameter flow-cytometry; IHC: immunohistochemistry; NA: not available

<u>Supplementary Figure 1:</u> Overall survival of aggressive ATL patients (acute- and lymphoma-types) when tumor cells are positive (red solid line) or negative (black dashed line) for KIR3DL2.

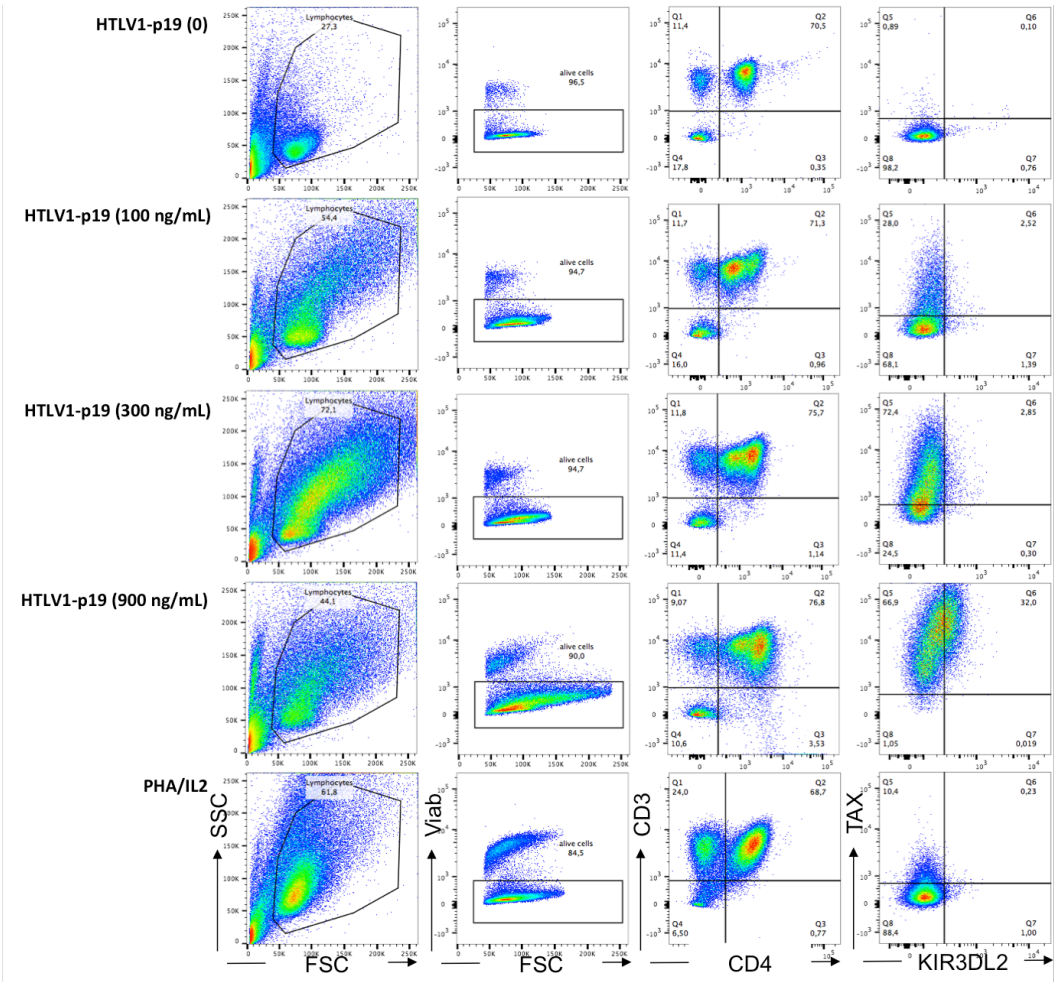


<u>Supplementary Figure 2:</u> Cell-free HTLV-1 virions induced KIR3DL2 and KIR2DS4 expressions by CD4+ T-cells but not NKp46 nor KI3DS1 expressions. PBMC from healthy donor were cultured in the absence or presence of several concentrations of HTLV-1 (p19-equivalent), and surface KIR3DL2, KIR2DS4, NKp46 and KIR3DS1 expressions were quantified by flow-cytometry.



Supplementary Figure 3: Correlation between *TAX* mRNA and KIR3DL2 expressions on infected CD4+ TL

Correlation between *TAX* mRNA and KIR3DL2 protein expressions in CD4+ T-cells from healthy donors infected by HTLV-1 virions at indicated concentrations *in vitro* or activated by PHA/IL2, after 7 days of culture, quantified by prime-flow RNA assay combined with immunolabeling of KIR3DL2.



DISCUSSION

Nous avons donc montré que le récepteur KIR3DL2 était associé aux formes aiguës d'ATL, pouvait être utilisé comme marqueur diagnostique et pourrait être utile dans le suivi des patients. En outre, il est possible d'obtenir une cytotoxicité dépendante de l'anticorps en utilisant des cellules NK autologues, sans toxicité de l'anticorps sur les cellules KIR3DL2 négatives. Enfin, l'expression de KIR3DL2 semble déterminée par un rôle combiné de l'HTLV-1 et de la méthylation de son promoteur. Néanmoins, plusieurs questions restent ouvertes.

Ainsi, si l'expression de KIR3DL2 semble associée aux formes acute, quelques formes chroniques et lymphomes expriment ce marqueur sans que ces résultats soient dépendants de la technique de détection utilisée. Il est possible que les ATL indolents exprimant ce récepteur soient en fait en voie de transformation. Un suivi longitudinal prolongé de ces patients permettrait de répondre à cette question. Par ailleurs, KIR3DL2 semble associé à un mauvais pronostic dans les ATL agressifs, que nous confirmerons par analyse multivariée. Il serait également intéressant d'analyser le profil mutationnel des ATL en fonction de l'expression de KIR3DL2. Il est possible que ce récepteur soit associé à des anomalies génétiques connues pour être de mauvais pronostic, comme les mutation de IRF4 (Kataoka et al., 2018).

Nous montrons que les expressions de KIR3DL2 et *TAX* (en ARN messager) sont corrélées dans les cellules primaires d'ATL et après infection de LT *in vitro*. Tax est réputé ne pas être exprimé dans les ATL à ce stade, mais on sait que la culture de cellules d'ATL *in vitro* induit la transcription de gènes viraux (Kurihara et al., 2005; Tochikura et al., 1985), ce qui explique qu'on retrouve cette protéine au cours de nos expériences. En outre, il est probable que Tax soit exprimé par quelques cellules au sein du pool tumoral d'ATL car on sait qu'il existe une immunité anti-Tax efficace chez les patients ATL (Bangham, 2009) et que les cellules tumorales restent dépendantes de Tax pour leur survie (Dassouki et al., 2015; Suehiro et al., 2015). Grâce à des expériences préliminaires, nous avons également retrouvé l'expression de *TAX* en ARN messager sur des coupes de biopsies congelées ganglionnaires chez des patients avec un ATL (**Fig. 13**).

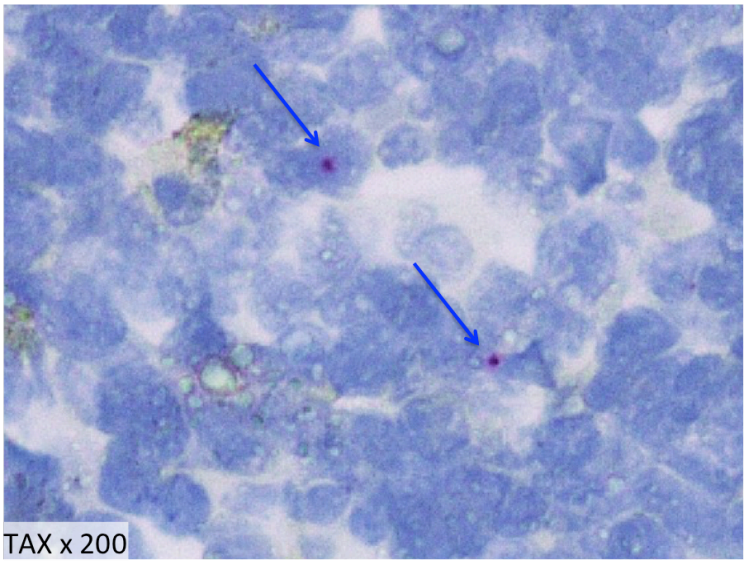


Figure 13 : Expression de l'ARN messager de TAX (en rose) dans deux cellules tumorales d'une biopsie ganglionnaire chez une patiente porteuse d'un ATL aiguë.

Il a été montré que l'ATL dérivait d'un lymphocyte T_{SCM} CD45RA+ CD45RO- CCR7+ CD27+, dont on ne sait s'il exprime KIR3DL2. Dans notre étude, nous ne pouvons déterminer si l'HTLV-1 est capable d'induire l'expression de KIR3DL2 sur des LT CD4+ qui pourraient être ce lymphocyte T_{SCM}, ou bien s'il a un tropisme pour une population minime de LT CD4+ KIR3DL2+ qu'il serait capable de faire proliférer. Il serait intéressant de trier les cellules des patients ATL sur l'expression de KIR3DL2 et analyser l'intégration clonale de chacune des sous-populations afin d'évaluer la population cellulaire portant le clone majoritaire. Mais les essais de tri ont été infructueux car l'expression de KIR3DL2 est faible sur les cellules primaires. Enfin, il faudrait éliminer un rôle transactivateur direct de Tax sur l'expression de KIR3DL2. On sait en effet que Tax est capable d'activer les facteurs de transcription NF-kB et CREB (Matsuoka and Jeang, 2011; Sun and Yamaoka, 2005) pour lesquels il existe des sites de fixation dans le promoteur de KIR3DL2.

Par ailleurs, si l'HTLV-1 est bien capable d'induire KIR3DL2, pourquoi les formes lymphome et chronique seraient-elles négatives ? Il est possible que la méthylation joue un rôle combiné à celui de l'HTLV-1. On sait ainsi que le profil de méthylation dépend de l'évolution de l'ATL, les formes les plus agressives ayant un phénotype plus méthylé (**Fig. 14**) (Kataoka et al., 2015). Nous montrons que le promoteur de

KIR3DL2 est au contraire moins méthylé dans les formes acute que dans les formes chroniques.

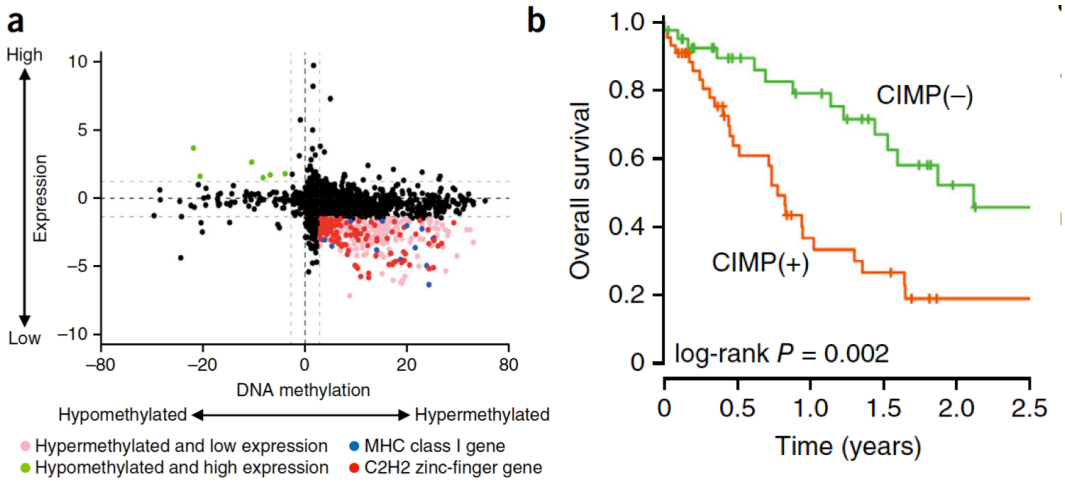


Figure 14 : Phénotype de méthylation des ilôts CpG dans les ATL (CIMP). Le statut hyperméthylé du CIMP était associé au phénotype agressif et à une moins bonne survie. *Kataoka et al. Nat Gen 2015.*

Il reste néanmoins possible que l'expression de KIR3DL2 dans les cellules d'ATL soit due à l'évolution physiologique du LT. On sait en effet que l'activation chronique du TCR peut jouer un rôle dans l'expression des KIR sur les LT normaux (Anfossi et al., 2001; van Bergen et al., 2009; Björkström et al., 2012; Michel et al., 2016). Nous n'avons pas pu montrer d'induction de KIR3DL2 *ex vivo* par l'activation PHA/IL2 sur les lymphocytes CD4+ normaux ou sur les cellules primaires d'ATL. En revanche, dans une expérience préliminaire, une stimulation CD3-CD28 avait permis d'augmenter l'expression de KIR3DL2 chez un patient porteur d'un ATL KIR3DL2+. Cela reste à confirmer.

Enfin, nous n'avons pu évaluer le rôle éventuel de KIR3DL2 dans la lymphomagénèse, en raison de l'absence d'un ligand agoniste bien identifié. HLA-F pourrait être le ligand d'intérêt (Garcia-Beltran et al., 2016; Song et al., 2016), mais les outils actuellement à disposition ne sont pas spécifiques. Nous montrons ainsi que HLA-F est exprimé dans les ATL, après infection des LT CD4+ et après activation cellulaire sans pouvoir être certains de la spécificité des anticorps. Enfin, il est possible que la signalisation de KIR3DL2 soit interrompue au sein des cellules

tumorales. Il a en effet été montré que la phosphatase SHP-1 n'est pas fonctionnelle dans les cellules des ATL agressifs en raison d'une hyperméthylation de son promoteur (Sato et al. AJP January 2010).

Les données de cytotoxicité induite par l'anti-KIR3DL2 IPH4102 *ex vivo* apportent un rationnel pré-clinique à un essai de IPH4102 dans les ATL. La balance bénéfice-risque en faveur de cet essai est bonne car la toxicité attendue est minime. En revanche le traitement risque de ne pas être suffisamment efficace car les ADCC marchent peu souvent dans l'ATL en raison de l'immunodépression sous-jacente. Néanmoins, les NK autologues étaient capables d'induire une lyse *in vitro*. Finalement l'anticorps devrait être testé en combinaison, en consolidation sur une maladie résiduelle ou en attente d'une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques.

DISCUSSION GÉNÉRALE et PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a eu pour but de discuter la physiopathologie et l'origine cellulaire de certains PTCLs, de proposer de nouveaux outils diagnostiques de PTCLs primitifs intestinaux rares et des formes aiguës d'ATL et enfin d'ouvrir des possibilités thérapeutiques. Je détaille ci-dessous les questions qui se posent et les perspectives possibles.

A. ORIGINES CELLULAIRES ET CLASSIFICATION DES LYMPHOMES T PERIPHERIQUES

La mise en évidence de NKRs dans des lymphomes T permet de discuter l'origine cellulaire de certains PTCLs ainsi que leur physiopathologie (**Fig. 15**).

Dans les **lymphoproliférations T intestinales**, nous avons ainsi montré que l'expression de NKRs était spécifique des MCRII et des lymphomes T agressifs EATL et MEITL. Par analogie avec l'expression physiologique de NKRs dans les lymphocytes intestinaux, nous pouvons ainsi discuter la cellule d'origine de ces lymphoproliférations. Grâce au travail de l'équipe de Nadine Cerf-Bensussan, nous savons ainsi que la **MCRII** a pour origine un lymphocyte T non conventionnel ayant soit acquis des propriétés NK soit perdu des propriétés de différenciation T, sous la dépendance de signaux combinés de NOTCH et Granzyme B. L'existence d'un réarrangement du TCR tronqué suggère en effet la mise en œuvre d'un programme de différenciation T avorté. De plus, malgré l'expression de NKp46, le développement de ces cellules étant indépendant du FT ID2, on ne peut considérer qu'elles dérivent du groupe 1 ou 3 NCR positif des ILCs . La transformation de ces cellules est en outre dépendante d'un contexte cytokinique particulier, avec un rôle démontré pour l'IL-15 (Ettersperger et al., 2016; Malamut et al., 2010). Contrairement au rôle présumé de la stimulation TCR chronique dans l'acquisition d'un phénotype inné par les LT physiologiques, les cellules tumorales de MCRII ne sont pas dépendantes d'une reconnaissance antigène-spécifique par le TCR, puisqu'elles n'expriment pas de TCR fonctionnel (Tjon et al., 2008). En outre, une étude récente de leur répertoire a montré que celui-ci était réduit mais sans être biaisé vers une reconnaissance antigénique spécifique (en particulier du gluten) (Ritter et al., 2018). Néanmoins, l'existence de

mutations dans les voies de signalisation JAK/STAT, pourrait jouer ce rôle d'activation chronique cellulaire. Ce travail de thèse pourrait finalement être un argument supplémentaire pour introduire les MCRII dans la classification OMS des PTCLs.

En raison du lien de clonalité en MCRII et **EATL**, il est probable que la cellule d'origine soit le même LT de type inné, et que l'EATL reflète l'évolution ultime du processus de lymphomagénèse. Une étude de l'architecture clonale des rares lymphocytes NKp46 positifs présents dans l'épithélium de la MC, des lymphocytes tumoraux NKp46 positifs de la MCRII et de l'EATL permettrait de mettre en évidence une éventuelle acquisition d'anomalies génétiques au cours de la transformation en lymphome agressif.

Par analogie, il est tentant de proposer une même cellule d'origine pour le **MEITL**. Néanmoins, celui-ci est dépendant d'une signalisation TCR chroniquement active (Mutzbauer et al., 2018). En outre, des réarrangements T fonctionnels ont été mis en évidence dans la plupart des MEITL, avec l'expression d'un TCRγδ (Chan et al., 2011). Celui-ci pourrait donc dériver d'un LT non conventionnel puisqu'ayant acquis des marqueurs NK, et plus particulièrement d'un lymphocyte T γδ. On sait en effet que ces lymphocytes présents chez les individus sains peuvent exprimer des NKRs. Ce processus ressemble à ce qui a été décrit physiologiquement sous l'effet d'une stimulation antigénique chronique, médiée par la reconnaissance TCR. Contrairement à la MCRII et à l'EATL, la lymphomagénèse du MEITL pourrait donc être liée à une activation chronique du TCR.

Dans l'**ATL**, l'expression spécifique de KIR3DL2 est soit lié au processus de lymphomagénèse, soit lié à la cellule d'origine. L'acquisition physiologique de multiples KIR dans des LT au répertoire restreint au cours du vieillissement est probablement secondaire à une activation chronique du TCR. Un mécanisme similaire pourrait être mis en œuvre au cours de la lymphomagénèse de l'ATL. Néanmoins, j'ai montré que l'HTLV-1 en lui-même permettait d'induire l'expression de KIR3DL2 sur les cellules d'ATL, qui en outre n'expriment pas d'autres KIR. L'HTLV-1 pourrait

donc en lui-même être responsable de l'acquisition de ce phénotype particulier. Tax, en particulier, pourrait jouer un rôle transactivateur direct de l'expression de KIR3DL2. Il reste incertain que l'HTLV-1 n'ait pas un tropisme particulier pour une population minoritaire de LT CD4+ KIR3DL2+ préexistante qu'il pourrait faire proliférer préférentiellement. Finalement, la découverte de ce récepteur KIR3DL2 sur les ATL ne remet pas en cause l'origine présumée de type LT souche mémoire (T_{SCM}) CD45RA+ CD45RO- CCR7+ CD27+, représentant 2 à 4% des LT CD4+ et CD8+, dont on ne sait pas s'ils expriment KIR3DL2 physiologiquement. Dans l'idéal, il faudrait donc trier la population T KIR3DL2 positive chez les patients ATL pour la caractériser plus largement, en particulier vérifier son phénotype mémoire et l'intégration provirale, mais les essais de tri sur le marqueur KIR3DL2 se sont avérés pour l'instant infructueux.

L'expression de NKRs pourrait permettre de questionner l'origine cellulaire d'autres **PTCLs**, pour lequel nous avons débuté un travail collaboratif.

Brièvement, nous montrons que NKp46 est exprimé dans la plupart des lymphomes **T/NK de type nasal (Fig. 16)**. Il est possible que la transformation de ces lymphomes se fasse sur un mode similaire aux lymphomes T intestinaux. Ainsi, les cellules tumorales peuvent parfois exprimer un CD3 intra-cellulaire, des réarrangements non fonctionnels du TCR. En outre, on sait que l'EBV a un rôle dans la lymphomagénèse sans qu'il soit bien compris. La cellule d'origine de ces lymphomes pourrait donc être représenté par un lymphocyte T non conventionnel.

Enfin, l'expression de NKp46 ou d'autres NKRs pourrait identifier un groupe particulier au sein des **lymphomes T périphériques non spécifiés** qui sont actuellement mal définis.

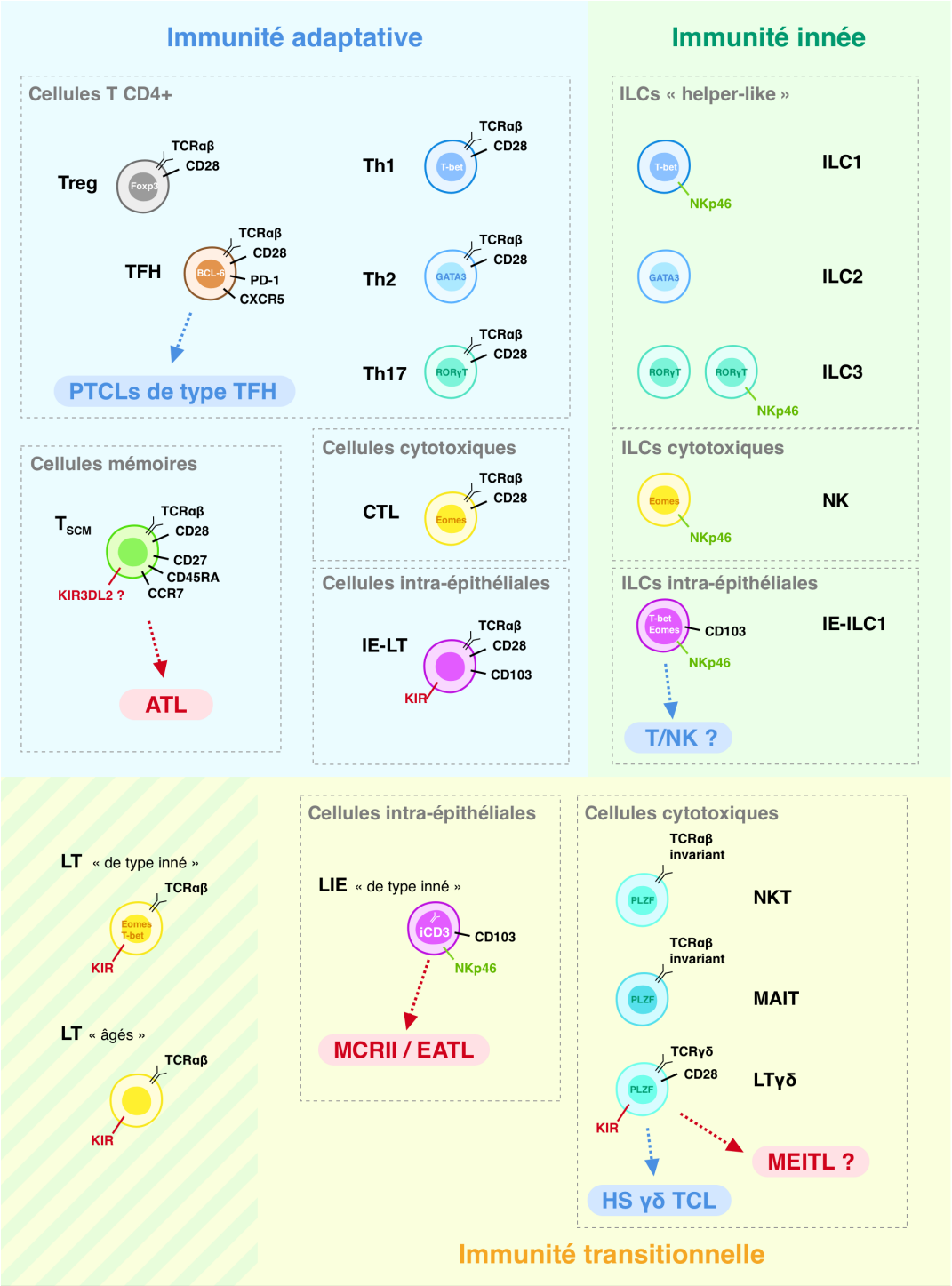


Figure 15 : Origines cellulaires présumées de lymphomes T périphériques. ILCs : cellules lymphoïdes innées ; Treg : lymphocytes T régulateurs ; T_{SCM} : LT souches mémoires ; CTL : LT cytotoxiques ; NK : natural killer ; IE : intra-épithélial ; LIE : lymphocyte intra-épithélial ; MAIT : LT invariants associés aux muqueuses ; PTCL : lymphome T périphérique; TFH : T folliculaire helper ; ATL : leucémie/lymphome T de l'adulte associé à l'HTLV-1 ; T/NK : lymphome T/NK de type nasal ; MCRII : maladie coeliaque réfractaire de type II ; EATL : lymphome T intestinal associé aux entéropathies ;

MEITL : lymphome T monomorphe épithéliotrope intestinal ; HS γδ TCL : lymphome T γδ hépato-splénique. Adapté de *Spits et al., Nat Rev Immunol 2013*

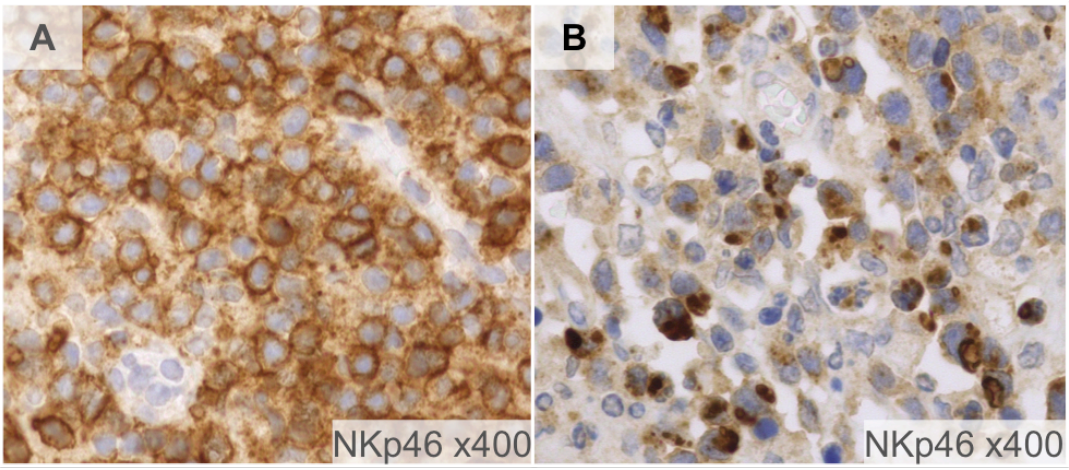


Figure 16 : Expression de NKp46 en immunohistochimie sur des biopsies paraffinées d'une cohorte de lymphomes T/NK de type nasal. NKp46 est exprimé sur la membrane des cellules tumorales (A) ou en dots cytoplasmiques (B)

B. ASPECTS DIAGNOSTIQUES

Les lymphoproliférations T primitives intestinales sont des pathologies rares, mal définies dont la symptomatologie clinique et l'aspect morphologique n'est pas spécifique et peut correspondre à des pathologies tumorales mais aussi inflammatoires, infectieuses ou auto-immunes. Identifier la MCRII parmi les complications de la MC et savoir les discriminer de la lymphoprolifération T indolente, est particulièrement important. Actuellement, ce diagnostic repose sur une approche multidisciplinaire nécessitant temps et expertise. La cytométrie en flux des LIE triés à partir de biopsies digestives fraiches n'est en outre accessible que dans un nombre restreint de laboratoires.

Avec ce travail de thèse, nous proposons un nouvel outil diagnostique de la MCRII extrêmement simple d'utilisation et facile à interpréter. La réalisation d'un anticorps monoclonal utilisable sur des biopsies en paraffine est possible dans tous les laboratoires d'anatomopathologie, et permet d'éviter de réaliser de nouvelles biopsies afin d'organiser la cytométrie de flux. Une simple relecture pourrait ainsi suffire à redresser un diagnostic erroné.

En outre, NKp46 étant exprimé sur les lymphomes agressifs, nous pensons que son absence d'expression permet d'éviter de conclure à tort à l'existence d'un lymphome agressif et donc d'éviter des traitements intensifs inutiles. On sait en effet que des patients porteurs de lymphoproliférations indolentes ont été traités par des chimiothérapies inutiles, générant une iatrogénie non négligeable. En conséquence, si une histologie digestive est évocatrice de lymphome mais sans expression de NKp46, il faut savoir prendre le temps de reconsidérer le diagnostic avant de mettre en route un traitement intensif. Les hypothèses diagnostiques à discuter dans ce cas sont donc la lymphoprolifération T indolente du tube digestif ou l'existence d'une rare localisation secondaire d'un autre PTCL, sans méconnaitre la possibilité d'une pathologie non tumorale.

Dans les ATL, nous pensons que l'expression de KIR3DL2 peut servir au diagnostic des formes acute, même si cette expression peut parfois être retrouvée dans les formes lymphome et indolentes. La caractérisation de la population tumorale par cytométrie en flux repose actuellement sur une étude 8 couleurs et l'absence d'expression du CD7. L'étude de KIR3DL2 permet d'avoir un marqueur positif des cellules tumorales, ce qui est plus simple d'interprétation. L'évaluation plus large de l'expression de KIR3DL2 est grevée par l'absence d'anticorps utilisable en histologie et efficace en paraffine. Par ailleurs, KIR3DL2 pourrait être un marqueur d'évolution vers un ATL aigu à partir d'une forme chronique, ce qui pose la question d'un projet d'allogreffe en cas d'expression de ce marqueur. Nous ne sommes pas en mesure de répondre à cette question en raison d'une incidence faible de l'ATL en France. Nous sommes donc en train de monter une collaboration avec les équipes japonaises afin d'évaluer cette question.

Finalement, l'étude de l'expression de NKRs doit être évaluée sur les autres entités de PTCLs, afin d'évaluer leurs intérêts diagnostiques. Les **figures 17 et 18** montrent les résultats préliminaires d'expression de NKp46 et KIR3DL2 sur une cohorte de PTCLs. Il faut ainsi noter que très peu de MCRDII (3/12) et d'EATL (1/5) expriment le récepteur KIR3DL2.

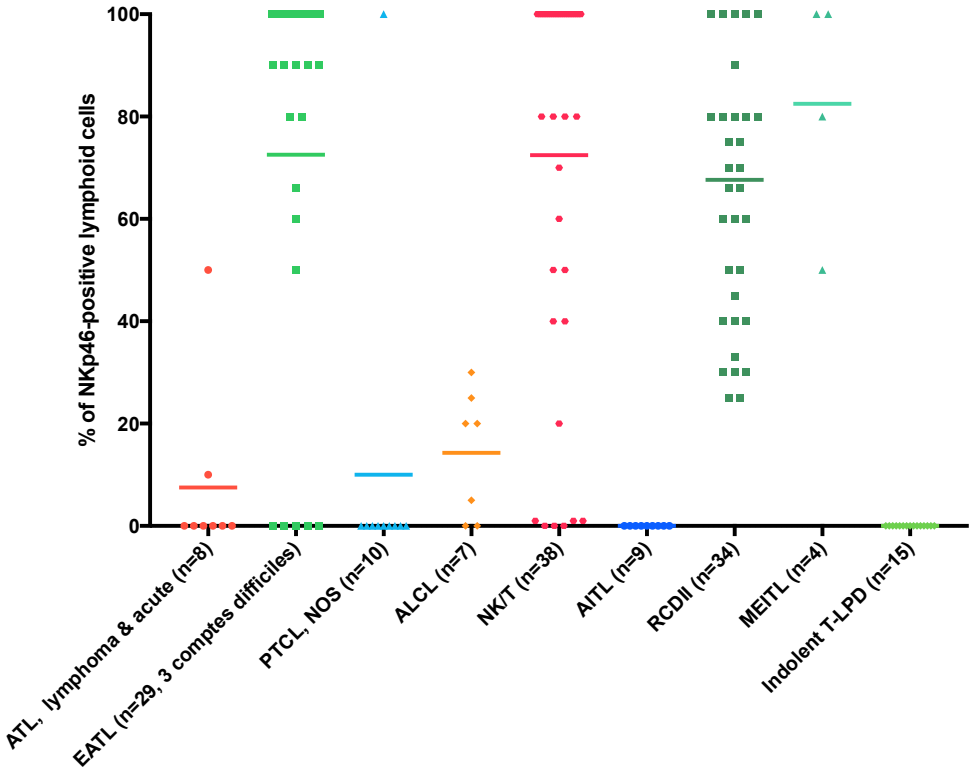


Figure 17. Résultats préliminaires d'expression de NKp46 en immunohistochimie sur des biopsies d'une cohorte de PTCLs.

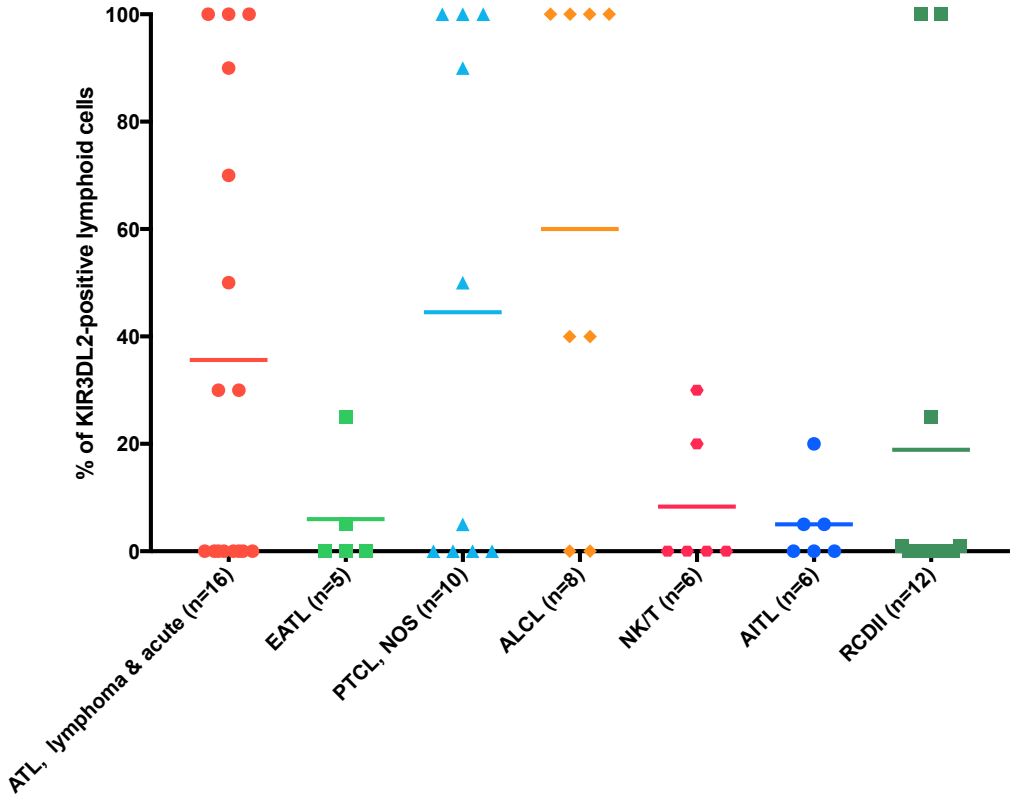


Figure 18. Résultats préliminaires d'expression de KIR3DL2 en immunohistochimie sur des biopsies d'une cohorte de PTCLs.

C. ASPECTS THERAPEUTIQUES

Les lymphomes T primitifs intestinaux, comme les ATL sont marqués par des pronostics extrêmement sévères. Grâce à une collaboration avec une société de biotechnologie française Innate Pharma, nous avons pu tester des anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs KIR3DL2 et NKp46.

Nous montrons ainsi qu'il est possible d'induire une cytotoxicité grâce à des effecteurs NK autologues dans des cellules primaires d'**ATL** par IPH4102, un anticorps dirigé contre KIR3DL2. Nous pensons donc qu'il est intéressant d'évaluer cet anticorps qui est actuellement testé en phase 2 chez des patients porteurs d'un lymphome T cutané. En effet, cet anticorps n'est pas toxique et induit des réponses chez des patients multitraités. De plus, les possibilités thérapeutiques sont limitées dans l'ATL, et un tel anticorps pourrait être testé dès la première rechute et évalué en

terme de réponse globale. En revanche, on sait que les ADCC sont rarement suffisamment efficaces dans l'ATL agressif. Cet anticorps pourrait donc être intéressant en consolidation chez des patients gardant une maladie résiduelle après un traitement intensif, en « bridge to allo » afin d'attendre une allogreffe chez un patient en rémission partielle, ou en combinaison avec de la chimiothérapie. Nous pouvons d'ors et déjà proposer IPH4102 à un patient en ATU si les conditions sont réunies et la balance bénéfice-risque en faveur du patient. Nous discutons en outre de la mise en place d'un protocole thérapeutique dans les ATL avec Innate Pharma. Par ailleurs, nous avons suggéré à cette société de développer des anticorps couplés à une toxine ou de mettre en place des cellules T porteuses d'un récepteur chimérique dirigé spécifiquement contre KIR3DL2, dont on pense que l'efficacité pourrait être plus intéressante dans les PTCLs qu'un mécanisme d'ADCC.

Dans les **lymphoproliférations T intestinales**, nous montrons qu'un anticorps couplé à une toxine et dirigé contre NKp46 est efficace sur des cellules primaires de MCRII. Cet anticorps est actuellement en développement pré-clinique. Il pourrait être particulièrement intéressant dans les MCRII ne répondant pas à un traitement immunosuppresseur, dans les EATL et MEITL mais aussi dans d'autres PTCLs exprimant NKp46, comme le NK/T de type nasal ou certains PTCLs, NOS. Si la phase de développement pré-clinique se passe bien, nous envisageons donc un essai dans les lymphomes T intestinaux agressifs exprimant NKp46 (EATL et MEITL). Cette phase 1 « first-in-human » serait nécessairement en monothérapie chez des patients en rechute, avec une évaluation de la toxicité mais aussi du taux de réponse globale. En terme de toxicité, nous prévoyons une toxicité induite par la toxine, une toxicité du à l'anticorps monoclonal similaire à celle du rituximab, et enfin une toxicité due à la cible choisie. Compte-tenu du profil physiologique d'expression de NKp46, l'anticorps pourrait dépléter les cellules NK, les ILC1 et un sous-groupe d'ILC3. Nous n'attendons pas une toxicité majeure de cette déplétion en raison de la redondance fonctionnelle de ces populations avec l'immunité adaptative. En effet, des patients porteurs d'un déficit immunitaire combiné sévère qui restaure une immunité lymphocytaire T mais pas NK ou ILC après une allogreffe n'ont pas d'augmentation du risque d'infection ou de cancer des années après la greffe. Par ailleurs, le pronostic de ces lymphomes étant particulièrement sévère et les traitements utilisés

actuellement très toxiques, la balance bénéfice-risque est clairement en faveur d'une thérapie ciblée dirigée contre NKp46.

BIBLIOGRAPHIE

Abe, M., Uchihashi, K., Kazuto, T., Osaka, A., Yanagihara, K., Tsukasaki, K., Hasegawa, H., Yamada, Y., and Kamihira, S. (2008). Foxp3 expression on normal and leukemic CD4+CD25+ T cells implicated in human T-cell leukemia virus type-1 is inconsistent with Treg cells. Eur. J. Haematol. *81*, 209–217.

Alonzo, E.S., Gottschalk, R.A., Das, J., Egawa, T., Hobbs, R.M., Pandolfi, P.P., Pereira, P., Nichols, K.E., Koretzky, G.A., Jordan, M.S., et al. (2010). Development of promyelocytic zinc finger and ThPOK-expressing innate gamma delta T cells is controlled by strength of TCR signaling and Id3. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *184*, 1268–1279.

Alves, N.L., Hooibrink, B., Arosa, F.A., and van Lier, R.A.W. (2003). IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8+ T cells in vitro. Blood *102*, 2541–2546.

Anfossi, N., Pascal, V., Vivier, E., and Ugolini, S. (2001). Biology of T memory type 1 cells. Immunol. Rev. *181*, 269–278.

Arlettaz, L., Villard, J., de Rham, C., Degermann, S., Chapuis, B., Huard, B., and Roosnek, E. (2004a). Activating CD94:NKG2C and inhibitory CD94:NKG2A receptors are expressed by distinct subsets of committed CD8+ TCR alphabeta lymphocytes. Eur. J. Immunol. *34*, 3456–3464.

Arlettaz, L., Degermann, S., De Rham, C., Roosnek, E., and Huard, B. (2004b). Expression of inhibitory KIR is confined to CD8+ effector T cells and limits their proliferative capacity. Eur. J. Immunol. *34*, 3413–3422.

Armitage, J.O. (2017). The aggressive peripheral T-cell lymphomas: 2017. Am. J. Hematol. *92*, 706–715.

Arosa, F.A. (2002). CD8+CD28- T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset. Immunol. Cell Biol. *80*, 1–13.

Arosa, F.A., Esgalhado, A.J., Padrão, C.A., and Cardoso, E.M. (2017). Divide, Conquer, and Sense: CD8+CD28− T Cells in Perspective. Front. Immunol. *7*.

Artis, D., and Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. Nature *517*, 293–301.

Augusto, D.G., O'Connor, G.M., Lobo-Alves, S.C., Bass, S., Martin, M.P., Carrington, M., McVicar, D.W., and Petzl-Erler, M.L. (2015). Pemphigus is associated with KIR3DL2 expression levels and provides evidence that KIR3DL2 may bind HLA-A3 and A11 in vivo. Eur. J. Immunol. *45*, 2052–2060.

Azran, I., Schavinsky-Khrapunsky, Y., and Aboud, M. (2004). Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. Retrovirology *1*, 20.

Bachy, E., Urb, M., Chandra, S., Robinot, R., Bricard, G., de Bernard, S., Traverse-Glehen, A., Gazzo, S., Blond, O., Khurana, A., et al. (2016). CD1d-restricted peripheral T cell lymphoma in mice and humans. J. Exp. Med. *213*, 841–857.

Bagot, M., Porcu, P., Ram-Wolff, C., Khodadoust, M., Basem, W., Battistella, M., Marie-Cardine, A., Vermeer, M., Mathieu, S., Whittaker, S., et al. (2017). Phase I Study of IPH4102, Anti-KIR3DL2 Mab, in Relapsed/Refractory Cutaneous T-Cell Lymphomas (CTCL): Dose-escalation Safety, Biomarker and Clinical Activity Results. Hematol. Oncol. *35*, 48–49.

Bangham, C.R.M. (2003). The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. J. Gen. Virol. *84*, 3177–3189.

Bangham, C.R.M. (2009). CTL quality and the control of human retroviral infections. Eur. J. Immunol. *39*, 1700–1712.

Bangham, C.R.M., Cook, L.B., and Melamed, A. (2014). HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. Semin. Cancer Biol. *26*, 89–98.

Battistella, M., Janin, A., Jean-Louis, F., Collomb, C., Leboeuf, C., Sicard, H., Bonnafous, C., Dujardin, A., Ram-Wolff, C., Kadin, M. e., et al. (2016). KIR3DL2 (CD158k) is a potential therapeutic target in primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma. Br. J. Dermatol. n/a-n/a.

Battistella, M., Leboeuf, C., Ram-Wolff, C., Hurabielle, C., Bonnafous, C., Sicard, H., Bensussan, A., Bagot, M., and Janin, A. (2017). KIR3DL2 expression in cutaneous T-cell lymphomas: expanding the spectrum for KIR3DL2 targeting. Blood *130*, 2900–2902.

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science *285*, 727–729.

Bedoui, S., Gebhardt, T., Gasteiger, G., and Kastenmüller, W. (2016). Parallels and differences between innate and adaptive lymphocytes. Nat. Immunol. *17*, 490–494.

Belhadj, K., Reyes, F., Farcet, J.-P., Tilly, H., Bastard, C., Angonin, R., Deconinck, E., Charlotte, F., Leblond, V., Labouyrie, E., et al. (2003). Hepatosplenic γδ T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: report on a series of 21 patients. Blood *102*, 4261–4269.

Bensussan, A., Remtoula, N., Sivori, S., Bagot, M., Moretta, A., and Marie-Cardine, A. (2011). Expression and Function of the Natural Cytotoxicity Receptor NKp46 on Circulating Malignant CD4+ T Lymphocytes of Sézary Syndrome Patients. J. Invest. Dermatol. *131*, 969–976.

van Bergen, J., Kooy-Winkelaar, E.M.C., van Dongen, H., van Gaalen, F.A., Thompson, A., Huizinga, T.W.J., Feltkamp, M.C.W., Toes, R.E.M., and Koning, F. (2009). Functional killer Ig-like receptors on human memory CD4+ T cells specific for cytomegalovirus. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *182*, 4175–4182.

Bernink, J.H., Peters, C.P., Munneke, M., te Velde, A.A., Meijer, S.L., Weijer, K., Hreggvidsdottir, H.S., Heinsbroek, S.E., Legrand, N., Buskens, C.J., et al. (2013). Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. Nat. Immunol. *14*, 221–229.

Björklund, Å.K., Forkel, M., Picelli, S., Konya, V., Theorell, J., Friberg, D., Sandberg, R., and Mjösberg, J. (2016). The heterogeneity of human CD127$^+$ innate lymphoid cells revealed by single-cell RNA sequencing. Nat. Immunol. *17*, 451–460.

Björkström, N.K., Béziat, V., Cichocki, F., Liu, L.L., Levine, J., Larsson, S., Koup, R.A., Anderson, S.K., Ljunggren, H.-G., and Malmberg, K.-J. (2012). CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells. Blood *120*, 3455–3465.

Boos, M.D., Yokota, Y., Eberl, G., and Kee, B.L. (2007). Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. J. Exp. Med. *204*, 1119–1130.

Bowness, P., Ridley, A., Shaw, J., Chan, A.T., Wong-Baeza, I., Fleming, M., Cummings, F., McMichael, A., and Kollnberger, S. (2011). Th17 cells expressing KIR3DL2+ and responsive to HLA-B27 homodimers are increased in ankylosing spondylitis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *186*, 2672–2680.

Buzon, M.J., Sun, H., Li, C., Shaw, A., Seiss, K., Ouyang, Z., Martin-Gayo, E., Leng, J., Henrich, T.J., Li, J.Z., et al. (2014). HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. Nat. Med. *20*, 139–142.

Carbonnel, F., d'Almagne, H., Lavergne, A., Matuchansky, C., Brouet, J.C., Sigaux, F., Beaugerie, L., Nemeth, J., Coffin, B., Cosnes, J., et al. (1999). The clinicopathological features of extensive small intestinal CD4 T cell infiltration. Gut *45*, 662–667.

Cella, M., Otero, K., and Colonna, M. (2010). Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1beta reveals intrinsic functional plasticity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 10961–10966.

Cerf-Bensussan, N., Jarry, A., Brousse, N., Lisowska-Grospierre, B., Guy-Grand, D., and Griscelli, C. (1987). A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. Eur. J. Immunol. *17*, 1279–1285.

Chan, A.T., Kollnberger, S.D., Wedderburn, L.R., and Bowness, P. (2005). Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondylarthritis. Arthritis Rheum. *52*, 3586–3595.

Chan, H.-W., Kurago, Z.B., Stewart, C.A., Wilson, M.J., Martin, M.P., Mace, B.E., Carrington, M., Trowsdale, J., and Lutz, C.T. (2003). DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. J. Exp. Med. *197*, 245–255.

Chan, J.K.C., Chan, A.C.L., Cheuk, W., Wan, S.-K., Lee, W.-K., Lui, Y.-H., and Chan, W.-K. (2011). Type II enteropathy-associated T-cell lymphoma: a distinct aggressive lymphoma with frequent γδ T-cell receptor expression. Am. J. Surg. Pathol. *35*, 1557–1569.

Chaushu, S., Wilensky, A., Gur, C., Shapira, L., Elboim, M., Halftek, G., Polak, D., Achdout, H., Bachrach, G., and Mandelboim, O. (2012). Direct recognition of Fusobacterium nucleatum by

the NK cell natural cytotoxicity receptor NKp46 aggravates periodontal disease. PLoS Pathog. *8*, e1002601.

Chien, Y., Meyer, C., and Bonneville, M. (2014). γδ T cells: first line of defense and beyond. Annu. Rev. Immunol. *32*, 121–155.

Chiu, W.K., Fann, M., and Weng, N. (2006). Generation and growth of CD28nullCD8+ memory T cells mediated by IL-15 and its induced cytokines. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *177*, 7802–7810.

Chu, D.H., Spits, H., Peyron, J.F., Rowley, R.B., Bolen, J.B., and Weiss, A. (1996). The Syk protein tyrosine kinase can function independently of CD45 or Lck in T cell antigen receptor signaling. EMBO J. *15*, 6251–6261.

Chu, T., Tyznik, A.J., Roepke, S., Berkley, A.M., Woodward-Davis, A., Pattacini, L., Bevan, M.J., Zehn, D., and Prlic, M. (2013). Bystander-activated memory CD8 T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner. Cell Rep. *3*, 701–708.

Constantinides, M.G., McDonald, B.D., Verhoef, P.A., and Bendelac, A. (2014). A committed precursor to innate lymphoid cells. Nature *508*, 397–401.

Cook, L.B., Melamed, A., Niederer, H., Valganon, M., Laydon, D., Foroni, L., Taylor, G.P., Matsuoka, M., and Bangham, C.R.M. (2014). The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. Blood *123*, 3925–3931.

Correia, D.V., Fogli, M., Hudspeth, K., da Silva, M.G., Mavilio, D., and Silva-Santos, B. (2011a). Differentiation of human peripheral blood Vδ1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. Blood *118*, 992–1001.

Correia, M.P., Costa, A.V., Uhrberg, M., Cardoso, E.M., and Arosa, F.A. (2011b). IL-15 induces CD8+ T cells to acquire functional NK receptors capable of modulating cytotoxicity and cytokine secretion. Immunobiology *216*, 604–612.

Dassouki, Z., Sahin, U., Hajj, H.E., Jollivet, F., Kfoury, Y., Lallemand-Breitenbach, V., Hermine, O., Thé, H. de, and Bazarbachi, A. (2015). ATL response to arsenic/interferon therapy is triggered by SUMO/PML/RNF4-dependent Tax degradation. Blood *125*, 474–482.

De Smedt, M., Taghon, T., Van de Walle, I., De Smet, G., Leclercq, G., and Plum, J. (2007). Notch signaling induces cytoplasmic CD3 epsilon expression in human differentiating NK cells. Blood *110*, 2696–2703.

Delabie, J., Holte, H., Vose, J.M., Ullrich, F., Jaffe, E.S., Savage, K.J., Connors, J.M., Rimsza, L., Harris, N.L., Müller-Hermelink, K., et al. (2011). Enteropathy-associated T-cell lymphoma: clinical and histological findings from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. Blood *118*, 148–155.

Di Sabatino, A., Biagi, F., Gobbi, P.G., and Corazza, G.R. (2012). How I treat enteropathy-associated T-cell lymphoma. Blood *119*, 2458–2468.

Di Santo, J.P. (2006). Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. Annu. Rev. Immunol. *24*, 257–286.

Dukers, D., Vermeer, M., Jaspars, L., Sander, C., Flaig, M., Vos, W., Willemze, R., and Meijer, C. (2001). Expression of killer cell inhibitory receptors is restricted to true NK cell lymphomas and a subset of intestinal enteropathy-type T cell lymphomas with a cytotoxic phenotype. J. Clin. Pathol. *54*, 224–228.

DuPage, M., Chopra, G., Quiros, J., Rosenthal, W.L., Morar, M.M., Holohan, D., Zhang, R., Turka, L., Marson, A., and Bluestone, J.A. (2015). The chromatin-modifying enzyme Ezh2 is critical for the maintenance of regulatory T cell identity after activation. Immunity *42*, 227–238.

Eberl, G., Colonna, M., Di Santo, J.P., and McKenzie, A.N.J. (2015a). Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. Science *348*, aaa6566.

Eberl, G., Di Santo, J.P., and Vivier, E. (2015b). The brave new world of innate lymphoid cells. Nat. Immunol. *16*, 1–5.

Eckle, S.B.G., Birkinshaw, R.W., Kostenko, L., Corbett, A.J., McWilliam, H.E.G., Reantragoon, R., Chen, Z., Gherardin, N.A., Beddoe, T., Liu, L., et al. (2014). A molecular basis underpinning the T cell receptor heterogeneity of mucosal-associated invariant T cells. J. Exp. Med. *211*, 1585–1600.

Ettersperger, J., Montcuquet, N., Malamut, G., Guegan, N., Lopez-Lastra, S., Gayraud, S., Reimann, C., Vidal, E., Cagnard, N., Villarese, P., et al. (2016). Interleukin-15-Dependent T-Cell-like Innate Intraepithelial Lymphocytes Develop in the Intestine and Transform into Lymphomas in Celiac Disease. Immunity *45*, 610–625.

Fan, X., and Rudensky, A.Y. (2016). Hallmarks of Tissue-Resident Lymphocytes. Cell *164*, 1198–1211.

Fauriat, C., Andersson, S., Björklund, A.T., Carlsten, M., Schaffer, M., Björkström, N.K., Baumann, B.C., Michaëlsson, J., Ljunggren, H.-G., and Malmberg, K.-J. (2008). Estimation of the size of the alloreactive NK cell repertoire: studies in individuals homozygous for the group A KIR haplotype. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *181*, 6010–6019.

Fehniger, T.A., Suzuki, K., Ponnappan, A., VanDeusen, J.B., Cooper, M.A., Florea, S.M., Freud, A.G., Robinson, M.L., Durbin, J., and Caligiuri, M.A. (2001). Fatal Leukemia in Interleukin 15 Transgenic Mice Follows Early Expansions in Natural Killer and Memory Phenotype Cd8+ T Cells. J. Exp. Med. *193*, 219–232.

Freud, A.G., Zhao, S., Wei, S., Gitana, G.M., Molina-Kirsch, H.F., Atwater, S.K., and Natkunam, Y. (2013). Expression of the Activating Receptor, NKp46 (CD335), in Human Natural Killer and T-Cell Neoplasia. Am. J. Clin. Pathol. *140*, 853–866.

Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., and Colonna, M. (2013). Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of cytokine responsive interferon-γ-producing cells. Immunity *38*, 769–781.

Fuji, S., Yamaguchi, T., Inoue, Y., Utsunomiya, A., Moriuchi, Y., Uchimaru, K., Owatari, S., Miyagi, T., Taguchi, J., Choi, I., et al. (2017). Development of a modified prognostic index of patients with aggressive adult T-cell leukemia-lymphoma aged 70 years or younger: a

possible risk-adapted management strategies including allogeneic transplantation. Haematologica haematol.2017.164996.

Fujikawa, D., Nakagawa, S., Hori, M., Kurokawa, N., Soejima, A., Nakano, K., Yamochi, T., Nakashima, M., Kobayashi, S., Tanaka, Y., et al. (2016). Polycomb-dependent epigenetic landscape in adult T-cell leukemia. Blood *127*, 1790–1802.

Garcia-Beltran, W.F., Hölzemer, A., Martrus, G., Chung, A.W., Pacheco, Y., Simoneau, C.R., Rucevic, M., Lamothe-Molina, P.A., Pertel, T., Kim, T.-E., et al. (2016). Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1. Nat. Immunol. *17*, 1067–1074.

Garg, A., Barnes, P.F., Porgador, A., Roy, S., Wu, S., Nanda, J.S., Griffith, D.E., Girard, W.M., Rawal, N., Shetty, S., et al. (2006). Vimentin expressed on Mycobacterium tuberculosis-infected human monocytes is involved in binding to the NKp46 receptor. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *177*, 6192–6198.

Gasteiger, G., Fan, X., Dikiy, S., Lee, S.Y., and Rudensky, A.Y. (2015). Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. Science *350*, 981–985.

Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., et al. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. Nat. Med. *17*, 1290–1297.

Gessain, A., and Cassar, O. (2012). Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. Front. Microbiol. *3*, 388.

Ghazi, B., Thonnart, N., Bagot, M., Bensussan, A., and Marie-Cardine, A. (2015). KIR3DL2/CpG ODN Interaction Mediates Sézary Syndrome Malignant T Cell Apoptosis. J. Invest. Dermatol. *135*, 229–237.

Gillet, N.A., Malani, N., Melamed, A., Gormley, N., Carter, R., Bentley, D., Berry, C., Bushman, F.D., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2011). The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. Blood *117*, 3113–3122.

Glatzer, T., Killig, M., Meisig, J., Ommert, I., Luetke-Eversloh, M., Babic, M., Paclik, D., Blüthgen, N., Seidl, R., Seifarth, C., et al. (2013). RORγt^{+} innate lymphoid cells acquire a proinflammatory program upon engagement of the activating receptor NKp44. Immunity *38*, 1223–1235.

Godfrey, D.I., and Berzins, S.P. (2007). Control points in NKT-cell development. Nat Rev Immunol *7*, 505–518.

Gold, M.C., McLaren, J.E., Reistetter, J.A., Smyk-Pearson, S., Ladell, K., Swarbrick, G.M., Yu, Y.Y.L., Hansen, T.H., Lund, O., Nielsen, M., et al. (2014). MR1-restricted MAIT cells display ligand discrimination and pathogen selectivity through distinct T cell receptor usage. J. Exp. Med. *211*, 1601–1610.

Goodman, T., and Lefrançois, L. (1988). Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. Nature *333*, 855–858.

Goodridge, J.P., Burian, A., Lee, N., and Geraghty, D.E. (2010). HLA-F complex without peptide binds to MHC class I protein in the open conformer form. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *184*, 6199–6208.

Guerra, N., Michel, F., Gati, A., Gaudin, C., Mishal, Z., Escudier, B., Acuto, O., Chouaib, S., and Caignard, A. (2002). Engagement of the inhibitory receptor CD158a interrupts TCR signaling, preventing dynamic membrane reorganization in CTL/tumor cell interaction. Blood *100*, 2874–2881.

Gunther, U., Holloway, J.A., Gordon, J.G., Knight, A., Chance, V., Hanley, N.A., Wilson, D.I., French, R., Spencer, J., Steer, H., et al. (2005). Phenotypic Characterization of CD3−7+ Cells in Developing Human Intestine and an Analysis of Their Ability to Differentiate into T Cells. J. Immunol. *174*, 5414–5422.

Gury-BenAri, M., Thaiss, C.A., Serafini, N., Winter, D.R., Giladi, A., Lara-Astiaso, D., Levy, M., Salame, T.M., Weiner, A., David, E., et al. (2016). The Spectrum and Regulatory Landscape of Intestinal Innate Lymphoid Cells Are Shaped by the Microbiome. Cell *166*, 1231-1246.e13.

Haedicke, W., Ho, F.C.S., Chott, A., Moretta, L., Rüdiger, T., Ott, G., and Müller-Hermelink, H.K. (2000). Expression of CD94/NKG2A and killer immunoglobulin-like receptors in NK cells and a subset of extranodal cytotoxic T-cell lymphomas. Blood *95*, 3628–3630.

Hajj, H.E., El-Sabban, M., Hasegawa, H., Zaatari, G., Ablain, J., Saab, S.T., Janin, A., Mahfouz, R., Nasr, R., Kfoury, Y., et al. (2010). Therapy-induced selective loss of leukemia-initiating activity in murine adult T cell leukemia. J. Exp. Med. *207*, 2785–2792.

Hanon, E., Hall, S., Taylor, G.P., Saito, M., Davis, R., Tanaka, Y., Usuku, K., Osame, M., Weber, J.N., and Bangham, C.R. (2000). Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. Blood *95*, 1386–1392.

Hansasuta, P., Dong, T., Thananchai, H., Weekes, M., Willberg, C., Aldemir, H., Rowland-Jones, S., and Braud, V.M. (2004). Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. Eur. J. Immunol. *34*, 1673–1679.

Harashima, N., Kurihara, K., Utsunomiya, A., Tanosaki, R., Hanabuchi, S., Masuda, M., Ohashi, T., Fukui, F., Hasegawa, A., Masuda, T., et al. (2004). Graft-versus-Tax response in adult T-cell leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation. Cancer Res. *64*, 391–399.

Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M.J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H., et al. (2006). Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. Nat. Med. *12*, 466–472.

Hayday, A.C. (2009). Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. Immunity *31*, 184–196.

Hazenberg, M.D., and Spits, H. (2014). Human innate lymphoid cells. Blood *124*, 700–709.

Henel, G., Singh, K., Cui, D., Pryshchep, S., Lee, W.-W., Weyand, C.M., and Goronzy, J.J. (2006). Uncoupling of T-cell effector functions by inhibitory killer immunoglobulin-like receptors. Blood *107*, 4449–4457.

Hong, M., Lee, T., Young Kang, S., Kim, S.-J., Kim, W., and Ko, Y.-H. (2016). Nasal-type NK/T-cell lymphomas are more frequently T rather than NK lineage based on T-cell receptor gene, RNA, and protein studies: lineage does not predict clinical behavior. Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc *29*, 430–443.

Hsu, K.C., Liu, X.-R., Selvakumar, A., Mickelson, E., O'Reilly, R.J., and Dupont, B. (2002). Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *169*, 5118–5129.

Hudspeth, K., Fogli, M., Correia, D.V., Mikulak, J., Roberto, A., Della Bella, S., Silva-Santos, B., and Mavilio, D. (2012). Engagement of NKp30 on Vδ1 T cells induces the production of CCL3, CCL4, and CCL5 and suppresses HIV-1 replication. Blood *119*, 4013–4016.

Hüe, S., Mention, J.-J., Monteiro, R.C., Zhang, S., Cellier, C., Schmitz, J., Verkarre, V., Fodil, N., Bahram, S., Cerf-Bensussan, N., et al. (2004). A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. Immunity *21*, 367–377.

Hurabielle, C., Thonnart, N., Ram-Wolff, C., Sicard, H., Bensussan, A., Bagot, M., and Marie-Cardine, A. (2017). Usefulness of KIR3DL2 to Diagnose, Follow-Up, and Manage the Treatment of Patients with Sézary Syndrome. Clin. Cancer Res. *23*, 3619–3627.

Hurabielle, C., Leboeuf, C., Ram-Wolff, C., Meignin, V., Rivet, J., Vignon-Pennamen, M.-D., Bonnafous, C., Sicard, H., Fite, C., Raffoux, E., et al. KIR3DL2 expression in patients with adult T-cell lymphoma/leukaemia. Br. J. Dermatol. *0*.

Ishibashi, Y., Matsuzono, E., Yokoyama, F., Ohara, Y., Sugai, N., Seki, H., Miura, A., Fujita, J., Suzuki, J., Fujisawa, T., et al. (2013). A case of lymphomatoid gastropathy: a self-limited pseudomalignant natural killer (NK)-cell proliferative disease mimicking NK/T-cell lymphomas. Clin. J. Gastroenterol. *6*, 287–290.

Ishida, T., Joh, T., Uike, N., Yamamoto, K., Utsunomiya, A., Yoshida, S., Saburi, Y., Miyamoto, T., Takemoto, S., Suzushima, H., et al. (2012). Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter phase II study. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *30*, 837–842.

Ishida, T., Jo, T., Takemoto, S., Suzushima, H., Uozumi, K., Yamamoto, K., Uike, N., Saburi, Y., Nosaka, K., Utsunomiya, A., et al. (2015). Dose-intensified chemotherapy alone or in combination with mogamulizumab in newly diagnosed aggressive adult T-cell leukaemia-lymphoma: a randomized phase II study. Br. J. Haematol. *169*, 672.

Ishida, T., Fujiwara, H., Nosaka, K., Taira, N., Abe, Y., Imaizumi, Y., Moriuchi, Y., Jo, T., Ishizawa, K., Tobinai, K., et al. (2016). Multicenter Phase II Study of Lenalidomide in Relapsed or Recurrent Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma: ATLL-002. J. Clin. Oncol. *34*, 4086–4093.

Ishitsuka, K., and Tamura, K. (2014). Human T-cell leukaemia virus type I and adult T-cell leukaemia-lymphoma. Lancet Oncol. *15*, e517-526.

Jabri, B., de Serre, N.P., Cellier, C., Evans, K., Gache, C., Carvalho, C., Mougenot, J.F., Allez, M., Jian, R., Desreumaux, P., et al. (2000). Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. Gastroenterology *118*, 867–879.

Jabri, B., Selby, J.M., Negulescu, H., Lee, L., Roberts, A.I., Beavis, A., Lopez-Botet, M., Ebert, E.C., and Winchester, R.J. (2002). TCR specificity dictates CD94/NKG2A expression by human CTL. Immunity *17*, 487–499.

Jacobson, S., Shida, H., McFarlin, D.E., Fauci, A.S., and Koenig, S. (1990). Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. Nature *348*, 245–248.

Jacomet, F., Cayssials, E., Basbous, S., Levescot, A., Piccirilli, N., Desmier, D., Robin, A., Barra, A., Giraud, C., Guilhot, F., et al. (2015). Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8(+) KIR/NKG2A(+) T cells in human adults and cord blood samples. Eur. J. Immunol. *45*, 1926–1933.

Jacomet, F., Cayssials, E., Barbarin, A., Desmier, D., Basbous, S., Lefèvre, L., Levescot, A., Robin, A., Piccirilli, N., Giraud, C., et al. (2016). The Hypothesis of the Human iNKT/Innate CD8(+) T-Cell Axis Applied to Cancer: Evidence for a Deficiency in Chronic Myeloid Leukemia. Front. Immunol. *7*, 688.

Jahng, A., Maricic, I., Aguilera, C., Cardell, S., Halder, R.C., and Kumar, V. (2004). Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. J. Exp. Med. *199*, 947–957.

Jarahian, M., Watzl, C., Fournier, P., Arnold, A., Djandji, D., Zahedi, S., Cerwenka, A., Paschen, A., Schirrmacher, V., and Momburg, F. (2009). Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. J. Virol. *83*, 8108–8121.

Jensen, K.D.C., Su, X., Shin, S., Li, L., Youssef, S., Yamasaki, S., Steinman, L., Saito, T., Locksley, R.M., Davis, M.M., et al. (2008). Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. Immunity *29*, 90–100.

Juelke, K., and Romagnani, C. (2016). Differentiation of human innate lymphoid cells (ILCs). Curr. Opin. Immunol. *38*, 75–85.

Kannagi, M., Hasegawa, A., Takamori, A., Kinpara, S., and Utsunomiya, A. (2012). The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1-mediated diseases. Front. Microbiol. *3*, 323.

Kannian, P., Fernandez, S., Jones, K.S., and Green, P.L. (2013). Human T Lymphotropic Virus Type 1 SU Residue 195 Plays a Role in Determining the Preferential CD4+ T Cell Immortalization/Transformation Tropism. J. Virol. *87*, 9344–9352.

Karube, K., Ohshima, K., Tsuchiya, T., Yamaguchi, T., Kawano, R., Suzumiya, J., Utsunomiya, A., Harada, M., and Kikuchi, M. (2004). Expression of FoxP3, a key molecule in CD4CD25 regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. Br. J. Haematol. *126*, 81–84.

Kastenmüller, W., Torabi-Parizi, P., Subramanian, N., Lämmermann, T., and Germain, R.N. (2012). A spatially-organized multicellular innate immune response in lymph nodes limits systemic pathogen spread. Cell *150*, 1235–1248.

Kataoka, K., Nagata, Y., Kitanaka, A., Shiraishi, Y., Shimamura, T., Yasunaga, J.-I., Totoki, Y., Chiba, K., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., et al. (2015). Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. Nat. Genet. *47*, 1304–1315.

Kataoka, K., Iwanaga, M., Yasunaga, J., Nagata, Y., Kitanaka, A., Kameda, T., Yoshimitsu, M., Shiraishi, Y., Sato-Otsubo, A., Sanada, M., et al. (2018). Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell leukemia/lymphoma. Blood *131*, 215–225.

Katsuya, H., Ishitsuka, K., Utsunomiya, A., Hanada, S., Eto, T., Moriuchi, Y., Saburi, Y., Miyahara, M., Sueoka, E., Uike, N., et al. (2015). Treatment and survival among 1594 patients with ATL. Blood *126*, 2570–2577.

Kazanji, M., Ureta-Vidal, A., Ozden, S., Tangy, F., de Thoisy, B., Fiette, L., Talarmin, A., Gessain, A., and de Thé, G. (2000). Lymphoid organs as a major reservoir for human T-cell leukemia virus type 1 in experimentally infected squirrel monkeys (Saimiri sciureus): provirus expression, persistence, and humoral and cellular immune responses. J. Virol. *74*, 4860–4867.

Kchour, G., Tarhini, M., Kooshyar, M.-M., El Hajj, H., Wattel, E., Mahmoudi, M., Hatoum, H., Rahimi, H., Maleki, M., Rafatpanah, H., et al. (2009). Phase 2 study of the efficacy and safety of the combination of arsenic trioxide, interferon alpha, and zidovudine in newly diagnosed chronic adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). Blood *113*, 6528–6532.

Killig, M., Glatzer, T., and Romagnani, C. (2014). Recognition Strategies of Group 3 Innate Lymphoid Cells. Front. Immunol. *5*.

Klose, C.S.N., and Artis, D. (2016). Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. Nat. Immunol. *17*, 765–774.

Klose, C.S.N., Flach, M., Möhle, L., Rogell, L., Hoyler, T., Ebert, K., Fabiunke, C., Pfeifer, D., Sexl, V., Fonseca-Pereira, D., et al. (2014). Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. Cell *157*, 340–356.

Kollnberger, S., Bird, L., Sun, M.-Y., Retiere, C., Braud, V.M., McMichael, A., and Bowness, P. (2002). Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. Arthritis Rheum. *46*, 2972–2982.

Kollnberger, S., Chan, A., Sun, M.-Y., Chen, L.Y., Wright, C., di Gleria, K., McMichael, A., and Bowness, P. (2007). Interaction of HLA-B27 homodimers with KIR3DL1 and KIR3DL2, unlike HLA-B27 heterotrimers, is independent of the sequence of bound peptide. Eur. J. Immunol. *37*, 1313–1322.

Kovalovsky, D., Uche, O.U., Eladad, S., Hobbs, R.M., Yi, W., Alonzo, E., Chua, K., Eidson, M., Kim, H.-J., Im, J.S., et al. (2008). The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. Nat. Immunol. *9*, 1055–1064.

Küçük, C., Jiang, B., Hu, X., Zhang, W., Chan, J.K.C., Xiao, W., Lack, N., Alkan, C., Williams, J.C., Avery, K.N., et al. (2015). Activating mutations of *STAT5B* and *STAT3* in lymphomas derived from γδ-T or NK cells. Nat. Commun. *6*, 6025.

Küçük, C., Hu, X., Gong, Q., Jiang, B., Cornish, A., Gaulard, P., McKeithan, T., and Chan, W.C. (2016). Diagnostic and Biological Significance of KIR Expression Profile Determined by RNA-Seq in Natural Killer/T-Cell Lymphoma. Am. J. Pathol. *186*, 1435–1441.

Kurihara, K., Harashima, N., Hanabuchi, S., Masuda, M., Utsunomiya, A., Tanosaki, R., Tomonaga, M., Ohashi, T., Hasegawa, A., Masuda, T., et al. (2005). Potential immunogenicity of adult T cell leukemia cells in vivo. Int. J. Cancer *114*, 257–267.

Lanier, L.L., Corliss, B.C., Wu, J., Leong, C., and Phillips, J.H. (1998). Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. Nature *391*, 703–707.

Lantz, O., and Bendelac, A. (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.

Laurent, C., Baron, M., Amara, N., Haioun, C., Dandoit, M., Maynadié, M., Parrens, M., Vergier, B., Copie-Bergman, C., Fabiani, B., et al. (2017). Impact of Expert Pathologic Review of Lymphoma Diagnosis: Study of Patients From the French Lymphopath Network. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *35*, 2008–2017.

Lawrence, M.S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G.V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S.L., Stewart, C., Mermel, C.H., Roberts, S.A., et al. (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. Nature *499*, 214–218.

Lee, Y.J., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2011). Alternative memory in the CD8 T cell lineage. Trends Immunol. *32*, 50–56.

Li, G., Yu, M., Weyand, C.M., and Goronzy, J.J. (2009). Epigenetic regulation of killer immunoglobulin–like receptor expression in T cells. Blood *114*, 3422–3430.

Li, P., Burke, S., Wang, J., Chen, X., Ortiz, M., Lee, S.-C., Lu, D., Campos, L., Goulding, D., Ng, B.L., et al. (2010). Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. Science *329*, 85–89.

von Lilienfeld-Toal, M., Nattermann, J., Feldmann, G., Sievers, E., Frank, S., Strehl, J., and Schmidt-Wolf, I.G.H. (2006). Activated gammadelta T cells express the natural cytotoxicity receptor natural killer p 44 and show cytotoxic activity against myeloma cells. Clin. Exp. Immunol. *144*, 528–533.

Liu, R.B., Engels, B., Schreiber, K., Ciszewski, C., Schietinger, A., Schreiber, H., and Jabri, B. (2013). IL-15 in tumor microenvironment causes rejection of large established tumors by T cells in a noncognate T cell receptor-dependent manner. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 8158–8163.

Long, E.O., Barber, D.F., Burshtyn, D.N., Faure, M., Peterson, M., Rajagopalan, S., Renard, V., Sandusky, M., Stebbins, C.C., Wagtmann, N., et al. (2001). Inhibition of natural killer cell

activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158). Immunol. Rev. *181*, 223–233.

Lu, Y., Cao, X., Zhang, X., and Kovalovsky, D. (2015). PLZF Controls the Development of Fetal-Derived IL-17+Vγ6+ γδ T Cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *195*, 4273–4281.

Luci, C., Reynders, A., Ivanov, I.I., Cognet, C., Chiche, L., Chasson, L., Hardwigsen, J., Anguiano, E., Banchereau, J., Chaussabel, D., et al. (2009). Influence of the transcription factor RORgammat on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. Nat. Immunol. *10*, 75–82.

Lundell, R., Hartung, L., Hill, S., Perkins, S.L., and Bahler, D.W. (2005). T-cell large granular lymphocyte leukemias have multiple phenotypic abnormalities involving pan-T-cell antigens and receptors for MHC molecules. Am. J. Clin. Pathol. *124*, 937–946.

Mahgoub, M., Yasunaga, J., Iwami, S., Nakaoka, S., Koizumi, Y., Shimura, K., and Matsuoka, M. (2018). Sporadic on/off switching of HTLV-1 Tax expression is crucial to maintain the whole population of virus-induced leukemic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *115*, E1269–E1278.

Malamut, G., Afchain, P., Verkarre, V., Lecomte, T., Amiot, A., Damotte, D., Bouhnik, Y., Colombel, J.-F., Delchier, J.-C., Allez, M., et al. (2009). Presentation and long-term follow-up of refractory celiac disease: comparison of type I with type II. Gastroenterology *136*, 81–90.

Malamut, G., El Machhour, R., Montcuquet, N., Martin-Lannerée, S., Dusanter-Fourt, I., Verkarre, V., Mention, J.-J., Rahmi, G., Kiyono, H., Butz, E.A., et al. (2010). 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. *120*, 2131–2143.

Malamut, G., Chandesris, O., Verkarre, V., Meresse, B., Callens, C., Macintyre, E., Bouhnik, Y., Gornet, J.-M., Allez, M., Jian, R., et al. (2013). Enteropathy associated T cell lymphoma in celiac disease: a large retrospective study. Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver *45*, 377–384.

Malamut, G., Meresse, B., Kaltenbach, S., Derrieux, C., Verkarre, V., Macintyre, E., Ruskone-Fourmestraux, A., Fabiani, B., Radford-Weiss, I., Brousse, N., et al. (2014). Small intestinal CD4+ T-cell lymphoma is a heterogenous entity with common pathology features. Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc. *12*, 599-608.e1.

Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., and Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. Nature *409*, 1055–1060.

Mansoor, A., Pittaluga, S., Beck, P.L., Wilson, W.H., Ferry, J.A., and Jaffe, E.S. (2011). NK-cell enteropathy: a benign NK-cell lymphoproliferative disease mimicking intestinal lymphoma: clinicopathologic features and follow-up in a unique case series. Blood *117*, 1447–1452.

Margolskee, E., Jobanputra, V., Lewis, S.K., Alobeid, B., Green, P.H.R., and Bhagat, G. (2013). Indolent small intestinal CD4+ T-cell lymphoma is a distinct entity with unique biologic and clinical features. PloS One *8*, e68343.

Marie-Cardine, A., Viaud, N., Thonnart, N., Joly, R., Chanteux, S., Gauthier, L., Bonnafous, C., Rossi, B., Bléry, M., Paturel, C., et al. (2014). IPH4102, a Humanized KIR3DL2 Antibody with Potent Activity against Cutaneous T-cell Lymphoma. Cancer Res. *74*, 6060–6070.

Matsuoka, M., and Jeang, K.-T. (2011). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. Oncogene *30*, 1379–1389.

McDonald, B.D., Jabri, B., and Bendelac, A. (2018). Diverse developmental pathways of intestinal intraepithelial lymphocytes. Nat. Rev. Immunol. 1.

Mention, J.-J., Ben Ahmed, M., Bègue, B., Barbe, U., Verkarre, V., Asnafi, V., Colombel, J.-F., Cugnenc, P.-H., Ruemmele, F.M., McIntyre, E., et al. (2003). Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. Gastroenterology *125*, 730–745.

Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T.N., Raulet, D.H., Lanier, L.L., Groh, V., Spies, T., et al. (2004). Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. Immunity *21*, 357–366.

Meresse, B., Curran, S.A., Ciszewski, C., Orbelyan, G., Setty, M., Bhagat, G., Lee, L., Tretiakova, M., Semrad, C., Kistner, E., et al. (2006). Reprogramming of CTLs into natural killer–like cells in celiac disease. J. Exp. Med. *203*, 1343–1355.

Michel, J.J., Griffin, P., and Vallejo, A.N. (2016). Functionally Diverse NK-Like T Cells Are Effectors and Predictors of Successful Aging. Front. Immunol. *7*.

Michel, L., Jean-Louis, F., Begue, E., Bensussan, A., and Bagot, M. (2013). Use of PLS3, Twist, CD158k/KIR3DL2, and NKp46 gene expression combination for reliable Sézary syndrome diagnosis. Blood *121*, 1477–1478.

Michel, M.-L., Pang, D.J., Haque, S.F.Y., Potocnik, A.J., Pennington, D.J., and Hayday, A.C. (2012). Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing γδ cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 17549–17554.

Miller, J.F.A.P. (2011). The golden anniversary of the thymus. Nat. Rev. Immunol. *11*, 489–495.

Mingari, M.C., Ponte, M., Vitale, C., Bellomo, R., and Moretta, L. (2000). Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function. Hum. Immunol. *61*, 44–50.

Mishra, A., Liu, S., Sams, G.H., Curphey, D.P., Santhanam, R., Rush, L.J., Schaefer, D., Falkenberg, L.G., Sullivan, L., Jaroncyk, L., et al. (2012). Aberrant Overexpression of IL-15 Initiates Large Granular Lymphocyte Leukemia through Chromosomal Instability and DNA Hypermethylation. Cancer Cell *22*, 645–655.

Mishra, A., Perle, K.L., Kwiatkowski, S., Sullivan, L.A., Sams, G.H., Johns, J., Curphey, D.P., Wen, J., McConnell, K., Qi, J., et al. (2016). Mechanism, Consequences, and Therapeutic Targeting of Abnormal IL15 Signaling in Cutaneous T-cell Lymphoma. Cancer Discov. *6*, 986–1005.

Moffitt, A.B., Ondrejka, S.L., McKinney, M., Rempel, R.E., Goodlad, J.R., Teh, C.H., Leppa, S., Mannisto, S., Kovanen, P.E., Tse, E., et al. (2017). Enteropathy-associated T cell lymphoma subtypes are characterized by loss of function of SETD2. J. Exp. Med. *214*, 1371–1386.

Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis. Annu. Rev. Immunol. *19*, 197–223.

Musette, P., Michel, L., Jean-Louis, F., Bagot, M., and Bensussan, A. (2003). Polymorphic expression of CD158k/p140/KIR3DL2 in Sézary patients. Blood *101*, 1203.

Mutzbauer, G., Maurus, K., Buszello, C., Pischimarov, J., Roth, S., Rosenwald, A., Chott, A., and Geissinger, E. (2018). SYK expression in monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma. Mod. Pathol. *31*, 505–516.

Nagai, Y., Kawahara, M., Hishizawa, M., Shimazu, Y., Sugino, N., Fujii, S., Kadowaki, N., and Takaori-Kondo, A. (2015). T memory stem cells are the hierarchical apex of adult T-cell leukemia. Blood *125*, 3527–3535.

Nagata, Y., Kontani, K., Enami, T., Kataoka, K., Ishii, R., Totoki, Y., Kataoka, T.R., Hirata, M., Aoki, K., Nakano, K., et al. (2016). Variegated RHOA mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma. Blood *127*, 596–604.

Nairismägi, M.-L., Tan, J., Lim, J.Q., Nagarajan, S., Ng, C.C.Y., Rajasegaran, V., Huang, D., Lim, W.K., Laurensia, Y., Wijaya, G.C., et al. (2016). JAK-STAT and G-protein-coupled receptor signaling pathways are frequently altered in epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma. Leukemia *30*, 1311–1319.

Narni-Mancinelli, E., Gauthier, L., Baratin, M., Guia, S., Fenis, A., Deghmane, A.-E., Rossi, B., Fourquet, P., Escalière, B., Kerdiles, Y.M., et al. (2017). Complement factor P is a ligand for the natural killer cell–activating receptor NKp46. Sci. Immunol. *2*.

Newell, E.W., and Cheng, Y. (2016). Mass cytometry: blessed with the curse of dimensionality. Nat. Immunol. *17*, 890–895.

Nicolae, A., Xi, L., Pham, T.H., Pham, T.-A., Navarro, W., Meeker, H.G., Pittaluga, S., Jaffe, E.S., and Raffeld, M. (2016). Mutations in the JAK/STAT and RAS signaling pathways are common in Intestinal T-cell Lymphomas. Leukemia *30*, 2245–2247.

Nicot, C. (2015). HTLV-I Tax-Mediated Inactivation of Cell Cycle Checkpoints and DNA Repair Pathways Contribute to Cellular Transformation: “A Random Mutagenesis Model.” J. Cancer Sci. *2*.

Niewiesk, S. (2016). Animals Models of Human T Cell Leukemia Virus Type I Leukemogenesis. ILAR J. *57*, 3–11.

Nijeboer, P., Malamut, G., Mulder, C.J., Cerf-Bensussan, N., Sibon, D., Bouma, G., Cellier, C., Hermine, O., and Visser, O. (2015a). Enteropathy-associated T-cell lymphoma: improving treatment strategies. Dig. Dis. Basel Switz. *33*, 231–235.

Nijeboer, P., de Baaij, L.R., Visser, O., Witte, B.I., Cillessen, S.A.G.M., Mulder, C.J., and Bouma, G. (2015b). Treatment response in enteropathy associated T-cell lymphoma; survival in a large multicenter cohort. Am. J. Hematol. *90*, 493–498.

Obama, K., Kubota, R., Tara, M., Furukawa, Y., Osame, M., and Arimura, K. (2007). Killer cell immunoglobulin-like receptor/3DL2 expression in adult T-cell leukaemia. Br. J. Haematol. *138*, 666–667.

Ortonne, N., Huet, D., Gaudez, C., Marie-Cardine, A., Schiavon, V., Bagot, M., Musette, P., and Bensussan, A. (2006). Significance of circulating T-cell clones in Sézary syndrome. Blood *107*, 4030–4038.

Ortonne, N., Le Gouvello, S., Mansour, H., Poillet, C., Martin, N., Delfau-Larue, M.-H., Leroy, K., Farcet, J.-P., Bagot, M., and Bensussan, A. (2008). CD158K/KIR3DL2 transcript detection in lesional skin of patients with erythroderma is a tool for the diagnosis of Sézary syndrome. J. Invest. Dermatol. *128*, 465–472.

Ortonne, N., Le Gouvello, S., Tabak, R., Marie-Cardine, A., Setiao, J., Berrehar, F., Nghe-Tang, A., Martin, N., Bagot, M., and Bensussan, A. (2012). CD158k/KIR3DL2 and NKp46 are frequently expressed in transformed mycosis fungoides. Exp. Dermatol. *21*, 461–463.

Parry, D.A., Holmes, T.D., Gamper, N., El-Sayed, W., Hettiarachchi, N.T., Ahmed, M., Cook, G.P., Logan, C.V., Johnson, C.A., Joss, S., et al. (2016). A homozygous STIM1 mutation impairs store-operated calcium entry and natural killer cell effector function without clinical immunodeficiency. J. Allergy Clin. Immunol. *137*, 955-957.e8.

Perry, A.M., Warnke, R.A., Hu, Q., Gaulard, P., Copie-Bergman, C., Alkan, S., Wang, H.-Y., Cheng, J.X., Bacon, C.M., Delabie, J., et al. (2013). Indolent T-cell lymphoproliferative disease of the gastrointestinal tract. Blood *122*, 3599–3606.

Pobezinsky, L.A., Angelov, G.S., Tai, X., Jeurling, S., Van Laethem, F., Feigenbaum, L., Park, J.-H., and Singer, A. (2012). Clonal deletion and the fate of autoreactive thymocytes that survive negative selection. Nat. Immunol. *13*, 569–578.

Pombo de Oliveira, M.S., Matutes, E., Schulz, T., Carvalho, S.M., Noronha, H., Reaves, J.D., Loureiro, P., Machado, C., and Catovsky, D. (1995). T-cell malignancies in Brazil. Clinico-pathological and molecular studies of HTLV-I-positive and -negative cases. Int. J. Cancer *60*, 823–827.

Porcelli, S., Yockey, C.E., Brenner, M.B., and Balk, S.P. (1993). 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. *178*, 1–16.

Probert, C.S.J., Saubermann, L.J., Balk, S., and Blumberg, R.S. (2007). Repertoire of the alpha beta T-cell receptor in the intestine. Immunol. Rev. *215*, 215–225.

Rahimpour, A., Koay, H.F., Enders, A., Clanchy, R., Eckle, S.B.G., Meehan, B., Chen, Z., Whittle, B., Liu, L., Fairlie, D.P., et al. (2015). Identification of phenotypically and functionally heterogeneous mouse mucosal-associated invariant T cells using MR1 tetramers. J. Exp. Med. *212*, 1095–1108.

Rankin, L.C., Girard-Madoux, M.J.H., Seillet, C., Mielke, L.A., Kerdiles, Y., Fenis, A., Wieduwild, E., Putoczki, T., Mondot, S., Lantz, O., et al. (2016). Complementarity and redundancy of IL-22-producing innate lymphoid cells. Nat. Immunol. *17*, 179–186.

Raulet, D.H., Vance, R.E., and McMahon, C.W. (2001). Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. Annu. Rev. Immunol. *19*, 291–330.

Ritter, J., Zimmermann, K., Jöhrens, K., Mende, S., Seegebarth, A., Siegmund, B., Hennig, S., Todorova, K., Rosenwald, A., Daum, S., et al. (2018). T-cell repertoires in refractory coeliac disease. Gut *67*, 644–653.

Roan, F., Stoklasek, T.A., Whalen, E., Molitor, J.A., Bluestone, J.A., Buckner, J.H., and Ziegler, S.F. (2016). CD4+ Group 1 Innate Lymphoid Cells (ILC) Form a Functionally Distinct ILC Subset That Is Increased in Systemic Sclerosis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *196*, 2051–2062.

Roberti, A., Dobay, M.P., Bisig, B., Vallois, D., Boéchat, C., Lanitis, E., Bouchindhomme, B., Parrens, M.-C., Bossard, C., Quintanilla-Martinez, L., et al. (2016). Type II enteropathy-associated T-cell lymphoma features a unique genomic profile with highly recurrent SETD2 alterations. Nat. Commun. *7*, 12602.

Robinette, M.L., Fuchs, A., Cortez, V.S., Lee, J.S., Wang, Y., Durum, S.K., Gilfillan, S., Colonna, M., and Immunological Genome Consortium (2015). Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. Nat. Immunol. *16*, 306–317.

Robinson, J., Mistry, K., McWilliam, H., Lopez, R., and Marsh, S.G.E. (2010). IPD--the Immuno Polymorphism Database. Nucleic Acids Res. *38*, D863-869.

Roncador, G., Garcia, J.F., Garcia, J.F., Maestre, L., Lucas, E., Menarguez, J., Ohshima, K., Nakamura, S., Banham, A.H., and Piris, M.A. (2005). FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma. Leukemia *19*, 2247–2253.

Rosewick, N., Durkin, K., Artesi, M., Marçais, A., Hahaut, V., Griebel, P., Arsic, N., Avettand-Fenoel, V., Burny, A., Charlier, C., et al. (2017). Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. Nat. Commun. *8*.

Rubio-Tapia, A., Kelly, D.G., Lahr, B.D., Dogan, A., Wu, T.-T., and Murray, J.A. (2009). Clinical staging and survival in refractory celiac disease: a single center experience. Gastroenterology *136*, 99–107; quiz 352–353.

Sako, N., Schiavon, V., Bounfour, T., Dessirier, V., Ortonne, N., Olive, D., Ram-Wolff, C., Michel, L., Sicard, H., Marie-Cardine, A., et al. (2014). Membrane expression of NK receptors CD160 and CD158k contributes to delineate a unique CD4+ T-lymphocyte subset in normal and mycosis fungoides skin. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. *85*, 869–882.

Santourlidis, S., Trompeter, H.-I., Weinhold, S., Eisermann, B., Meyer, K.L., Wernet, P., and Uhrberg, M. (2002). Crucial Role of DNA Methylation in Determination of Clonally Distributed Killer Cell Ig-like Receptor Expression Patterns in NK Cells. J. Immunol. *169*, 4253–4261.

Satake, M., Yamaguchi, K., and Tadokoro, K. (2012). Current prevalence of HTLV-1 in Japan as determined by screening of blood donors. J. Med. Virol. *84*, 327–335.

Satake, M., Iwanaga, M., Sagara, Y., Watanabe, T., Okuma, K., and Hamaguchi, I. (2016). Incidence of human T-lymphotropic virus 1 infection in adolescent and adult blood donors in Japan: a nationwide retrospective cohort analysis. Lancet Infect. Dis. *16*, 1246–1254.

Sato, N., Sabzevari, H., Fu, S., Ju, W., Petrus, M.N., Bamford, R.N., Waldmann, T.A., and Tagaya, Y. (2011). Development of an IL-15–autocrine CD8 T-cell leukemia in IL-15–transgenic mice requires the cis expression of IL-15Rα. Blood *117*, 4032–4040.

Satoh-Takayama, N., Lesjean-Pottier, S., Vieira, P., Sawa, S., Eberl, G., Vosshenrich, C.A.J., and Di Santo, J.P. (2010). IL-7 and IL-15 independently program the differentiation of intestinal CD3-NKp46+ cell subsets from Id2-dependent precursors. J. Exp. Med. *207*, 273–280.

Savage, A.K., Constantinides, M.G., Han, J., Picard, D., Martin, E., Li, B., Lantz, O., and Bendelac, A. (2008). The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. Immunity *29*, 391–403.

Schenkel, J.M., and Masopust, D. (2014). Tissue-Resident Memory T Cells. Immunity *41*, 886–897.

Schmitt, C., Marie-Cardine, A., and Bensussan, A. (2017). Therapeutic Antibodies to KIR3DL2 and Other Target Antigens on Cutaneous T-Cell Lymphomas. Front. Immunol. *8*.

Schmitz, F., Kooy-Winkelaar, Y., Wiekmeijer, A.-S., Brugman, M.H., Mearin, M.L., Mulder, C., Chuva de Sousa Lopes, S., Mummery, C.L., Staal, F.J., van Bergen, J., et al. (2016). The composition and differentiation potential of the duodenal intraepithelial innate lymphocyte compartment is altered in coeliac disease. Gut *65*, 1269–1278.

Schulthess, J., Meresse, B., Ramiro-Puig, E., Montcuquet, N., Darche, S., Bègue, B., Ruemmele, F., Combadière, C., Di Santo, J.P., Buzoni-Gatel, D., et al. (2012). Interleukin-15-Dependent NKp46+ Innate Lymphoid Cells Control Intestinal Inflammation by Recruiting Inflammatory Monocytes. Immunity *37*, 108–121.

Seyda, M., Elkhal, A., Quante, M., Falk, C.S., and Tullius, S.G. (2016). T cells going innate. Trends Immunol. *37*, 546–556.

Shimoyama, M. (1991). Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). Br. J. Haematol. *79*, 428–437.

Simoni, Y., and Newell, E.W. Dissecting human ILC heterogeneity: more than just three subsets. Immunology *153*, 297–303.

Simoni, Y., Fehlings, M., Kløverpris, H.N., McGovern, N., Koo, S.-L., Loh, C.Y., Lim, S., Kurioka, A., Fergusson, J.R., Tang, C.-L., et al. (2017). Human Innate Lymphoid Cell Subsets Possess Tissue-Type Based Heterogeneity in Phenotype and Frequency. Immunity *46*, 148–161.

Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (1997). p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. J. Exp. Med. *186*, 1129–1136.

Sivori, S., Falco, M., Carlomagno, S., Romeo, E., Soldani, C., Bensussan, A., Viola, A., Moretta, L., and Moretta, A. (2010). A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2. Blood *116*, 1637–1647.

Song, C., Lee, J.S., Gilfillan, S., Robinette, M.L., Newberry, R.D., Stappenbeck, T.S., Mack, M., Cella, M., and Colonna, M. (2015). Unique and redundant functions of NKp46+ ILC3s in models of intestinal inflammation. J. Exp. Med. *212*, 1869–1882.

Song, S., Miranda, C.J., Braun, L., Meyer, K., Frakes, A.E., Ferraiuolo, L., Likhite, S., Bevan, A.K., Foust, K.D., McConnell, M.J., et al. (2016). Major histocompatibility complex class I molecules protect motor neurons from astrocyte-induced toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. Nat. Med. *advance online publication*.

Speiser, D.E., Valmori, D., Rimoldi, D., Pittet, M.J., Liénard, D., Cerundolo, V., MacDonald, H.R., Cerottini, J.C., and Romero, P. (1999). 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. *29*, 1990–1999.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Santo, J.P.D., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. Nat. Rev. Immunol. *13*, 145–149.

Steinberg, M., Adjali, O., Swainson, L., Merida, P., Di Bartolo, V., Pelletier, L., Taylor, N., and Noraz, N. (2004). T-cell receptor-induced phosphorylation of the zeta chain is efficiently promoted by ZAP-70 but not Syk. Blood *104*, 760–767.

Stern-Ginossar, N., Gur, C., Biton, M., Horwitz, E., Elboim, M., Stanietsky, N., Mandelboim, M., and Mandelboim, O. (2008). Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. Nat. Immunol. *9*, 1065–1073.

Strid, J., Sobolev, O., Zafirova, B., Polic, B., and Hayday, A. (2011). The intraepithelial T cell response to NKG2D-ligands links lymphoid stress surveillance to atopy. Science *334*, 1293–1297.

Suehiro, Y., Hasegawa, A., Iino, T., Sasada, A., Watanabe, N., Matsuoka, M., Takamori, A., Tanosaki, R., Utsunomiya, A., Choi, I., et al. (2015). Clinical outcomes of a novel therapeutic vaccine with Tax peptide-pulsed dendritic cells for adult T cell leukaemia/lymphoma in a pilot study. Br. J. Haematol. *169*, 356–367.

Sun, S.-C., and Yamaoka, S. (2005). Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. Oncogene *24*, 5952–5964.

Sun, J., Lu, Z., Yang, D., and Chen, J. (2011). 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. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc *24*, 983–992.

Svrcek, M., Garderet, L., Sebbagh, V., Rosenzwajg, M., Parc, Y., Lagrange, M., Bennis, M., Lavergne-Slove, A., Fléjou, J.-F., and Fabiani, B. (2007). Small intestinal CD4+ T-cell lymphoma: a rare distinctive clinicopathological entity associated with prolonged survival. Virchows Arch. Int. J. Pathol. *451*, 1091–1093.

Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., et al. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood *127*, 2375–2390.

Tack, G.J., van Wanrooij, R.L.J., Langerak, A.W., Tjon, J.M.L., von Blomberg, B.M.E., Heideman, D.A.M., van Bergen, J., Koning, F., Bouma, G., Mulder, C.J.J., et al. (2012). Origin and immunophenotype of aberrant IEL in RCDII patients. Mol. Immunol. *50*, 262–270.

Takata, K., Noujima-Harada, M., Miyata-Takata, T., Ichimura, K., Sato, Y., Miyata, T., Naruse, K., Iwamoto, T., Tari, A., Masunari, T., et al. (2015). Clinicopathologic analysis of 6 lymphomatoid gastropathy cases: expanding the disease spectrum to CD4-CD8+ cases. Am. J. Surg. Pathol. *39*, 1259–1266.

Takeda, S., Maeda, M., Morikawa, S., Taniguchi, Y., Yasunaga, J.-I., Nosaka, K., Tanaka, Y., and Matsuoka, M. (2004). Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. Int. J. Cancer *109*, 559–567.

Takeuchi, K., Yokoyama, M., Ishizawa, S., Terui, Y., Nomura, K., Marutsuka, K., Nunomura, M., Fukushima, N., Yagyuu, T., Nakamine, H., et al. (2010). Lymphomatoid gastropathy: a distinct clinicopathologic entity of self-limited pseudomalignant NK-cell proliferation. Blood *116*, 5631–5637.

Tamiya, S., Matsuoka, M., Etoh, K., Watanabe, T., Kamihira, S., Yamaguchi, K., and Takatsuki, K. (1996). Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. Blood *88*, 3065–3073.

Tan, S.-Y., Chuang, S.-S., Tang, T., Tan, L., Ko, Y.-H., Chuah, K.-L., Ng, S.-B., Chng, W.-J., Gatter, K., Loong, F., et al. (2013). Type II EATL (epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma): a neoplasm of intra-epithelial T-cells with predominant CD8αα phenotype. Leukemia *27*, 1688–1696.

Taniguchi, Y., Nosaka, K., Yasunaga, J., Maeda, M., Mueller, N., Okayama, A., and Matsuoka, M. (2005). Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. Retrovirology *2*, 64.

Tarazona, R., DelaRosa, O., Alonso, C., Ostos, B., Espejo, J., Peña, J., and Solana, R. (2000). Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. Mech. Ageing Dev. *121*, 77–88.

Thonnart, N., Caudron, A., Legaz, I., Bagot, M., Bensussan, A., and Marie-Cardine, A. (2014). KIR3DL2 is a coinhibitory receptor on Sézary syndrome malignant T cells that promotes resistance to activation-induced cell death. Blood *124*, 3330–3332.

Tjon, J.M.L., Verbeek, W.H.M., Kooy-Winkelaar, Y.M.C., Nguyen, B.H., van der Slik, A.R., Thompson, A., Heemskerk, M.H.M., Schreurs, M.W.J., Dekking, L.H.A., Mulder, C.J., et al.

(2008). 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 *112*, 5103–5110.

Tochikura, T., Iwahashi, M., Matsumoto, T., Koyanagi, Y., Hinuma, Y., and Yamamoto, N. (1985). Effect of human serum anti-HTLV antibodies on viral antigen induction in vitro cultured peripheral lymphocytes from adult T-cell leukemia patients and healthy virus carriers. Int. J. Cancer *36*, 1–7.

Tomita, S., Kikuti, Y.Y., Carreras, J., Kojima, M., Ando, K., Takasaki, H., Sakai, R., Takata, K., Yoshino, T., Bea, S., et al. (2015). Genomic and immunohistochemical profiles of enteropathy-associated T-cell lymphoma in Japan. Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc *28*, 1286–1296.

Travert, M., Huang, Y., Leval, L. de, Martin-Garcia, N., Delfau-Larue, M.-H., Berger, F., Bosq, J., Brière, J., Soulier, J., MacIntyre, E., et al. (2012). Molecular features of hepatosplenic T-cell lymphoma unravels potential novel therapeutic targets. Blood *119*, 5795–5806.

Tse, E., Gill, H., Loong, F., Kim, S.J., Ng, S.-B., Tang, T., Ko, Y.-H., Chng, W.-J., Lim, S.-T., Kim, W.S., et al. (2012). Type II enteropathy-associated T-cell lymphoma: a multicenter analysis from the Asia Lymphoma Study Group. Am. J. Hematol. *87*, 663–668.

Tsukasaki, K., Tsushima, H., Yamamura, M., Hata, T., Murata, K., Maeda, T., Atogami, S., Sohda, H., Momita, S., Ideda, S., et al. (1997). Integration patterns of HTLV-I provirus in relation to the clinical course of ATL: frequent clonal change at crisis from indolent disease. Blood *89*, 948–956.

Tsukasaki, K., Hermine, O., Bazarbachi, A., Ratner, L., Ramos, J.C., Harrington, W., O'Mahony, D., Janik, J.E., Bittencourt, A.L., Taylor, G.P., et al. (2009). Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *27*, 453–459.

Uemura, Y., Isobe, Y., Uchida, A., Asano, J., Nishio, Y., Sakai, H., Hoshikawa, M., Takagi, M., Nakamura, N., and Miura, I. (2018). Expression of activating natural killer-cell receptors is a hallmark of the innate-like T-cell neoplasm in peripheral T-cell lymphomas. Cancer Sci. *109*, 1254–1262.

Ugolini, S., Arpin, C., Anfossi, N., Walzer, T., Cambiaggi, A., Förster, R., Lipp, M., Toes, R.E., Melief, C.J., Marvel, J., et al. (2001). Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory-phenotype CD8+ T cells. Nat. Immunol. *2*, 430–435.

Umadome, H., Uchiyama, T., Onishi, R., Hori, T., Uchino, H., and Nesumi, N. (1988). Leukemic cells from a chronic T-lymphocytic leukemia patient proliferated in response to both interleukin-2 and interleukin-4 without prior stimulation and produced interleukin-2 mRNA with stimulation. Blood *72*, 1177–1181.

Usui, T., Yanagihara, K., Tsukasaki, K., Murata, K., Hasegawa, H., Yamada, Y., and Kamihira, S. (2008). Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. Retrovirology *5*, 34.

Utsunomiya, A., Choi, I., Chihara, D., and Seto, M. (2015). Recent advances in the treatment of adult T-cell leukemia-lymphomas. Cancer Sci. *106*, 344–351.

Vély, F., Barlogis, V., Vallentin, B., Neven, B., Piperoglou, C., Ebbo, M., Perchet, T., Petit, M., Yessaad, N., Touzot, F., et al. (2016). Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. Nat. Immunol. *17*, 1291–1299.

Viant, C., Rankin, L.C., Girard-Madoux, M.J.H., Seillet, C., Shi, W., Smyth, M.J., Bartholin, L., Walzer, T., Huntington, N.D., Vivier, E., et al. (2016). Transforming growth factor–β and Notch ligands act as opposing environmental cues in regulating the plasticity of type 3 innate lymphoid cells. Sci Signal *9*, ra46–ra46.

Vivier, E., and Anfossi, N. (2004). Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. Nat. Rev. Immunol. *4*, 190–198.

Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Science *331*, 44–49.

Vonarbourg, C., Mortha, A., Bui, V.L., Hernandez, P.P., Kiss, E.A., Hoyler, T., Flach, M., Bengsch, B., Thimme, R., Hölscher, C., et al. (2010). Regulated expression of nuclear receptor RORγt confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing RORγt(+) innate lymphocytes. Immunity *33*, 736–751.

Walker, J.A., Barlow, J.L., and McKenzie, A.N.J. (2013). Innate lymphoid cells--how did we miss them? Nat. Rev. Immunol. *13*, 75–87.

Walzer, T., Bléry, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S.H., Jaeger, S., André, P., Gauthier, L., Daniel, L., et al. (2007a). Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 3384–3389.

Walzer, T., Jaeger, S., Chaix, J., and Vivier, E. (2007b). Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. Curr. Opin. Immunol. *19*, 365–372.

Watanabe, T. (2017). Adult T-cell leukemia: molecular basis for clonal expansion and transformation of HTLV-1–infected T cells. Blood *129*, 1071–1081.

Wencker, M., Turchinovich, G., Barros, R.D.M., Deban, L., Jandke, A., Cope, A., and Hayday, A.C. (2014). Innate-like T cells straddle innate and adaptive immunity by altering antigen-receptor responsiveness. Nat. Immunol. *15*, 80–87.

Yang, H., Antony, P.A., Wildhaber, B.E., and Teitelbaum, D.H. (2004). Intestinal intraepithelial lymphocyte gamma delta-T cell-derived keratinocyte growth factor modulates epithelial growth in the mouse. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *172*, 4151–4158.

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

Zhao, T., Satou, Y., Sugata, K., Miyazato, P., Green, P.L., Imamura, T., and Matsuoka, M. (2011). HTLV-1 bZIP factor enhances TGF-β signaling through p300 coactivator. Blood *118*, 1865–1876.

Titre : Rôle des récepteurs NK dans les lymphoproliférations T matures. Exemple des leucémies/lymphomes T de l'adulte associés à l'HTLV-1 et des lymphoproliférations T intestinales primitives.

Mots clés : récepteurs NK, leucémies/lymphomes T de l'adulte associés à l'HTLV-1, lymphoproliférations T intestinales primitives

Résumé : Les lymphomes T périphériques (PTCLs) sont des entités hétérogènes dont la classification a récemment été révisée. Plus de 25 entités de lymphomes T ou NK matures sont ainsi classées selon leur présentation clinico-biologique et leur origine cellulaire présumée, justifiant l'étude approfondie de leur phénotype. Des récepteurs NK (NKRs) ont été mis en évidence dans certains lymphomes cutanés. En outre, un lymphome intra-épithélial intestinal, appelé maladie coeliaque réfractaire de type II (MCRII), dérive d'un lymphocyte caractérisé par des marqueurs T et NK. Ces constatations nous ont amenés à évaluer l'expression de NKRs sur un panel représentatif de PTCLs, constitué en particulier de PTCLs primitifs intestinaux et de leucémies/lymphomes T de l'adulte associés à l'HTLV-1 (ATL).

Dans l'ATL, nous montrons que KIR3DL2 est exprimé par les cellules tumorales des formes aigües. Le virus HTLV-1 et la méthylation de son promoteur jouent un rôle dans l'expression de KIR3DL2. Enfin, un anticorps monoclonal dirigé contre KIR3DL2, IPH4102, est capable de tuer spécifiquement les cellules primaires d'ATL KIR3DL2 ex vivo par un mécanisme dépendant d'effecteurs NK autologues.

Dans les lymphoproliférations T intestinales primitives, nous montrons que NKp46 est un nouveau biomarqueur pour leur diagnostic et leur stratification thérapeutique. En effet, NKp46 est exprimé sur les cellules anormales de la MCRII, et sur les lymphomes T primitifs intestinaux agressifs, mais pas sur les indolents et les MC non compliquées. Enfin, les cellules primaires exprimant NKp46 sont sensibles ex vivo à la cytotoxicité induite par un anticorps monoclonal dirigé contre NKp46 et couplé à une toxine.

Ces résultats nous ont permis de discuter l'origine cellulaire de ces lymphomes et le rôle de ces NKRs dans la lymphomagénèse. Dans une optique translationnelle, l'expression des NKRs peut aider au diagnostic de ces entités parfois difficiles à individualiser, et enfin constituer une cible thérapeutique intéressante.

Title: Role of NK receptors in peripheral T-cell lymphoma. Example of HTLV-1 associated adult T leukemia/lymphoma and primary gastrointestinal T-cell lymphoproliferative diseases.

Keywords: NK receptors, HTLV-1 associated adult T leukemia/lymphoma, primary gastrointestinal T-cell lymphoproliferative diseases

Abstract: Peripheral T-cell lymphoma (PTCLs) are heterogeneous entities whose classification has recently been revised. More than 25 entities are thus classified according to their clinico-biological presentation and their presumed cellular origin, justifying the in-depth study of their phenotype. NK receptors (NKRs) have been demonstrated in some cutaneous lymphomas. In addition, a less known intestinal lymphoma, called type II refractory celiac disease (RCDII), arises from an intraepithelial lymphocyte characterized by T and NK markers. These findings led us to evaluate the expression of NKRs on a representative panel of PTCLs, focusing on primary gastrointestinal (GI) T-cell lymphoproliferative diseases (T-LPD) and HTLV-1 associated adult T leukemia/lymphoma (ATL).

In ATL, we show that KIR3DL2 expression is mainly associated with acute-type ATL. HTLV-1 has a preferential tropism for KIR3DL2+ lymphocytes and may play a role in KIR3DL2 expression induction, combined with the hypomethylation status of KIR3DL2 promoter. The benefit of targeting KIR3DL2 by IPH4102 should be further investigating in acute ATL patients.

In GI T-LPD, we show that NKp46 is a novel biomarker useful for diagnosis and therapeutic stratification, as NKp46 is a hallmark of RCDII tumor cells, shared by EATL. Strong preclinical rationale identifies anti-NKp46-PBD as a promising therapy for RCDII, EATL and MEITL.

These results allowed us to discuss the cellular origin of these lymphomas and the role of NKRs in lymphomagenesis. From a translational point of view, NKRs could represent useful biomarkers in these entities that are sometimes difficult to individualize, and finally constitute an interesting therapeutic target.