



**HAL**  
open science

# Analyse comparative de l'oncogenèse des proliférations digestives T de bas grade du chorion de l'homme et du chat

Valérie Freiche

► **To cite this version:**

Valérie Freiche. Analyse comparative de l'oncogenèse des proliférations digestives T de bas grade du chorion de l'homme et du chat. Cancer. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS571 . tel-03214563

**HAL Id: tel-03214563**

**<https://theses.hal.science/tel-03214563>**

Submitted on 2 May 2021

**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.

# Analyse comparative de l'oncogenèse des lymphoproliférations T digestives de bas grade du chorion de l'homme et du chat

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée  
à l'Institut Imagine (UMR 1163), Hôpital Necker, Paris.

École doctorale n°582

Cancérologie biologie - médecine - santé (CBMS)

Thèse présentée et soutenue à Maisons-Alfort, le 19 décembre 2019, par

**Valérie FREICHE**

Composition du Jury :

<b>M. Éric SOLARY</b> Professeur, Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy (INSERM U1170)	Président
<b>Mme Alexandra TRAVERSE-GLEHEN</b> Professeur, Université Claude Bernard, Centre Hospitalier Lyon-Sud (INSERM U1052)	Rapporteur
<b>M. Aurélien AMIOT</b> Professeur, Université Paris-Est, Hôpital Henri Mondor (Équipe EC2M3-EA7375)	Rapporteur
<b>Mme Georgia MALAMUT</b> Professeur, Université Paris-Descartes, Hôpital Cochin (INSERM UMR1163)	Examineur
<b>M. Olivier HERMINE</b> Professeur, Université Paris-Descartes, Hôpital Necker (INSERM UMR1163)	Directeur de thèse
<b>Mme Lucile COURONNE</b> MCU-PH, Université Paris-Descartes, Hôpital Necker (INSERM UMR1163)	Co-directrice de thèse
<b>Mme Julie BRUNEAU</b> MCU-PH, Université Paris-Descartes, Hôpital Necker, Paris (INSERM UMR1163)	Invitée



## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes remerciements à mes encadrants et aux membres du jury :

Pr Olivier HERMINE

Olivier, je reste convaincue que personne d'autre que toi n'aurait donné suite à ce projet lorsque je suis venue te rencontrer. Merci pour ton ouverture d'esprit exceptionnelle, ta gentillesse et ton accompagnement. Comme tous, je suis admirative à la fois de l'étendue de tes connaissances mais aussi de ton sens intuitif profond de la médecine. Ton génome contient un site polymorphique correspondant à un « indel véto », c'est incontestable ! Il s'était d'ailleurs exprimé avant que je me présente.

Dr Lucile COURONNÉ

Lucile, tu as été pour moi « l'encadrante » dont j'avais besoin : merci pour ta constance, ton implication, ton énergie et ton indéfectible bonne humeur. Je suis consciente de l'investissement à la fois professionnel et personnel que mon parcours t'a demandé. Je t'adresse mes pensées amicales.

Pr Éric SOLARY

Merci Éric, pour cet accompagnement bienveillant tout au cours de cette thèse tardive au sein de l'école Doctorale. Je souhaite sincèrement que ce travail soit la preuve qu'une collaboration avec la profession vétérinaire peut être à la fois positive et porteuse à l'avenir d'autres projets d'intérêt en oncologie comparée.

Au Pr Alexandra TRAVERSE-GLEHEN

Merci d'avoir accepté d'être rapporteur et du temps consacré à cette soutenance

Au Pr Aurélien AMIOT

Merci d'avoir accepté de relire ce travail et des commentaires détaillés, bénéfiques à son amélioration.



Pr Georgia MALAMUT

Georgia, merci pour les échanges que nous avons eus au cours de cette étude et pour ta présence lors d'Oncodays.

Je remercie chaleureusement tous les scientifiques qui se sont investis pour que ce travail aboutisse :

Dr Julie BRUNEAU

Julie : grâce à ton engagement personnel dans ce travail, notre approche des lymphoproliférations de bas grade a réellement été transformée. Merci pour toutes ces heures « in et outdoor » ! Merci aussi pour ton soutien constant, ta solidité, ta rigueur et ton amitié.

Dr Thierry MOLINA

Merci Thierry d'avoir cheminé avec nous « vers le chat » et de la gentillesse de ton accueil.

Dr Nadine CERF-BENSUSSAN

Nadine, j'ai été sensible à tes conseils avisés et à nos échanges sur ce sujet et d'autres encore en gastro-entérologie durant ma période de thèse.

Dr Elisabeth MACINTYRE

Merci Elisabeth pour nos réunions autour de la clonalité

Dr Harry SOKOL et Dr Aonghus LAVELLE, Marjolène STRAUBE

Harry et Aonghus merci de l'intérêt que vous avez porté à ce projet et de votre disponibilité pour évoquer les résultats. Merci Marjolène pour toute la partie technique. Nous avons encore bien des projets en commun à venir.

Dr Mathieu PAULIN

Mathieu, tu as fourni un immense travail et durant ces 4 années, cela a été un plaisir de travailler avec toi. Je te souhaite une très belle carrière d'interniste ! A très vite, de retour du Québec, pour ta médaille de Thèse d'exercice vétérinaire !

Pr Nathalie CORDONNIER

Tu as accepté d'adhérer à notre démarche et de t'investir, tant pour la thèse d'exercice de Mathieu que pour notre étude. Je t'en remercie chaleureusement.

Hélène HUET

Le CD20 te doit beaucoup ! merci pour tous ces échanges chaleureux

Pr Sophie Le PODER

Sophie, cela aura été un plaisir de travailler avec toi. Tu as toujours été là pour répondre à mes demandes, même imprévues ! Merci de ton accueil et de ta constante bienveillance.

Pr Marc ELOIT

Merci Marc, d'avoir accepté de prendre part à ce projet et de nous apporter ton expertise.

Pr Dominique PENNINCK et Dr Julien FAGES

Merci pour ce travail d'analyse d'imagerie outre-Atlantique et du temps que vous avez accordé à cette étude.

Pr Alexander GERMAN

Dear Alex, it has been a long way since our first common study. It will always be a great pleasure to collaborate with you. Thank you for your kind support.

### Mais aussi :

A tous mes collègues du Service de Médecine interne qui m'ont assurée de leur soutien et m'ont aidée au recrutement des cas.

Aux membres du Service de Chirurgie qui sont intervenus dans le cadre du prélèvement des biopsies

Aux membres du Service d'Imagerie et particulièrement le Dr Clément Bordenave

Avec le Dr Marie Muller, Médecin Oncologue, j'ai découvert un autre pan de la médecine. Ces quelques mois ont été très riches en échanges et je serai très heureuse et honorée que nos projets se concrétisent. Avec mon amitié.

### Remerciements personnels

A ma famille proche, privée de ces moments de partage si précieux depuis tant d'années, et qui, malgré ces innombrables jours volés, m'a soutenue sans faille pour que je mène mes projets à terme.

A mon père, « miss U So much » : et si l'oncologie actuelle était née 25 ans plus tôt ? .....

## TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION GÉNÉRALE : LYMPHOPROLIFÉRATIONS DIGESTIVES ET MODÈLES ANIMAUX SPONTANÉS .....	1
1.1	<b>Lymphoproliférations primitives T indolentes du tractus digestif .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Classification des lymphomes digestifs de l'homme .....	1
1.1.2	Aspects clinico-biologiques .....	5
1.1.3	Imagerie et endoscopie - bilan d'extension .....	5
1.1.4	Données histologiques, immunohistochimiques et de clonalité .....	8
1.1.5	Physiopathologie : données actuelles .....	12
1.1.6	Traitement médical des lymphoproliférations T digestives de l'homme .....	14
1.1.7	Pronostic .....	14
1.1.8	Diagnostic différentiel .....	14
1.1.9	Synthèse .....	17
1.2	<b>Lymphomes T intestinaux de bas grade dans l'espèce féline .....</b>	<b>18</b>
1.2.1	Classification des lymphomes digestifs chez le chat .....	18
1.2.2	Épidémiologie .....	20
1.2.3	Aspects cliniques et biologiques .....	20
1.2.4	Diagnostic et bilan d'extension .....	21
1.2.5	Données histologiques, immunohistochimiques et de clonalité .....	26
1.2.6	Physiopathologie : données actuelles .....	31
1.2.7	Diagnostic différentiel .....	35
1.2.8	Traitement .....	37
1.2.9	Pronostic .....	38
1.2.10	Un modèle de lymphome digestif T humain ? .....	39
1.2.11	Synthèse .....	40
1.3	<b>Intérêt des modèles animaux spontanés en médecine et en oncologie .....</b>	<b>41</b>
1.3.1	Modèle murin .....	41
1.3.2	Autres animaux de laboratoire .....	42
1.3.3	Modèles canin et félin .....	42
1.3.4	Synthèse .....	48
2	HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL .....	50
3	RESULTATS .....	51
3.1	<b>Article: Indolent T-cell Intestinal Lymphoproliferative Disorders: from domestic cat to human.. ..</b>	<b>51</b>
3.1.1	Constitution de la cohorte .....	51
3.1.2	Caractérisation clinique et paraclinique .....	52
3.1.3	Nouvelle caractérisation histologique .....	52
3.1.4	Caractéristiques immunohistochimiques et activation de la voie STAT5 .....	53
3.1.5	Données de clonalité .....	54
3.1.6	Un continuum histologique entre entéropathie inflammatoire et lymphome ? .....	54
3.1.7	Le LDBG : un modèle félin de GI-TLPD .....	55
3.2	<b>Analyse histologique, immunohistochimique et moléculaire comparative des LDBG et des ELP chez le chat .....</b>	<b>91</b>
3.2.1	Matériels et méthodes .....	91
3.2.2	Résultats .....	92
3.2.3	Synthèse .....	99

<b>3.3</b>	<b>Séquençage du microbiote chez le chat sain âgé, lors d'ELP ou de LDBG.....</b>	<b>100</b>
3.3.1	Matériels et méthodes.....	100
3.3.2	Résultats.....	101
<b>4</b>	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>105</b>
<b>4.1</b>	<b>Vers un nouveau modèle de lymphomagenèse ?.....</b>	<b>105</b>
4.1.1	Le LDBG : un modèle pertinent de GI-TLPD .....	105
4.1.2	Implication de la voie STAT5 dans les lymphoproliférations digestives.....	105
4.1.3	Modèle de lymphomagenèse.....	107
<b>4.2</b>	<b>Poursuite du travail .....</b>	<b>113</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>115</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>ANNEXE .....</b>	<b>133</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS CE MANUSCRIT

BCR : Breakpoint Cluster Region  
CD : Cluster de Différenciation  
CDR3 : Région Déterminant la Complémentarité 3 (Complementary Determining Region 3)  
DLBCL : Lymphome B diffus à grandes cellules  
EATL : Lymphome T Associé aux Entéropathies (Enteropathy-Associated T-cell Lymphoma)  
EBV : Virus d'Epstein-Barr (Epstein-Barr Virus)  
ENKTCL : ExtraNodal Natural Killer/T Cell Lymphoma  
FeLV : Virus Leucémogène Félin (Feline Leukemia Virus)  
FIV : Virus de l'Immunodéficience Féline (Feline Immunodeficiency Virus)  
FFPE : [Échantillon] Fixé au Formol et Inclus en Paraffine (Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded)  
GI-TLPD : Lymphoproliférations T gastro intestinales indolentes  
HES : Hématoxyline – Éosine – Safran  
HGAL : High Grade Alimentary Lymphoma, lymphome digestif de haut grade  
HHV-6 : Herpes Virus Humain de type 6 (Human Herpes Virus type 6)  
HIV : Virus de l'Immunodéficience Humaine (Human Immunodeficiency Virus)  
HTLV-1 : Virus T-Lymphotropique Humain de type 1 (Human T-lymphotropic Virus type 1)  
IBD : Inflammatory Bowel Disease  
IGH : Locus des gènes des chaînes lourdes des lymphocytes B (Immunoglobulin heavy locus)  
IHC : Immunohistochimie  
IPSID : Immunoproliférative Small Intestinal Disease  
ITK : Inhibiteur des Tyrosines Kinases  
LIE : Lymphocyte Intra-Épithélial  
LDBG : Lymphome Digestif de Bas Grade  
LDHG : Lymphome Digestif de Haut Grade  
LGAL : Low-grade Alimentary lymphoma  
LGIL : Low-grade Intestinal Lymphoma  
LGLG : Lymphome à Grands Lymphocytes Granuleux  
LNH : Lymphome non-hodgkinien  
MALT : Tissu Lymphoïde Associé aux muqueuses (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue)  
MEITL : Lymphome T Monomorphe Épithéliotropique (Monomorphic Epitheliotropic T-Cell Lymphoma)  
ELP : Entéropathie lymphoplasmocytaire  
MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin  
NGS : Next Generation Sequencing  
NK : Lymphocyte « Natural Killer »  
NL : Nœud Lymphatique  
PARR : PCR des Réarrangements des Récepteurs Antigéniques  
PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase (Polymerase Chain Reaction)  
RNA-seq : séquençage de l'ARN  
SNP : Single Nucleotid Polymorphism  
TCR : Récepteurs des Cellules T (T-Cell Receptor)  
UI : Unité Internationale  
WGS : Whole Genome Sequencing  
WHO : Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization)

## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux types histopathologiques de lymphomes digestifs (WHO, 2016). .....	1
Tableau 2 : Caractéristiques distinctives de l'EATL, du MEITL et des GI-TLPD indolentes .....	16
Tableau 3 : Synthèse des principales caractéristiques des GI-TLPD de l'homme .....	17
Tableau 4 : Classification des lymphomes digestifs félines selon les classifications REAL/WHO et National Cancer Institute Working Formulation (NCIWF) .....	19
Tableau 5 : Localisation préférentielle des différents sous-types de lymphomes .....	19
Tableau 6 : Localisation préférentielle du lymphome de bas grade félin.....	19
Tableau 7 : Comparaison étiologique, épidémiologique, et clinique entre les chats atteints de lymphome digestif de bas grade (LDBG) et d'ELP idiopathique (ELP). .....	36
Tableau 8 : Protocoles de chimiothérapie et leur efficacité jusqu'à rémission, associant le chlorambucil et la prednisolone pour le traitement du lymphome digestif de bas grade.....	37
Tableau 9 : Analyse comparative des LDBG félines et des GI-TLPD humaines .....	39
Tableau 10 : Synthèse des principales caractéristiques des LDBG .....	40
Tableau 11 : Synthèse de l'intérêt et des limites des différents modèles animaux en oncologie .....	49
Tableau 12 : Résultats de clonalité des chats atteints de LDBG. ....	54

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Aspects endoscopiques macroscopiques de GI-TLPD duodéal.....	7
Figure 2 : Aspect histologique d'un GI-TLPD duodéal.....	9
Figure 3 : Analyse immunohistochimique d'un GI-TLPD duodéal. ....	10
Figure 4 : Analyse de clonalité réalisée sur différents segments du tractus digestif et à différents temps chez un patient atteint de GI-TLPD. ....	11
Figure 5 : Place des lymphomes digestifs au sein des tumeurs lympho-hématopoïétiques...	18
Figure 6 : Aspect échographique normal et schématique de la paroi intestinale du chat.....	22
Figure 7 : Aspect échographique anormal de la musculature intestinale jéjunale d'un chat présentant un LDBG. ....	23
Figure 8 : Aspect macroscopique des anses jéjunales et des ganglions jéjunaux au cours de la laparotomie exploratrice.....	25
Figure 9 : Caractéristiques histologiques du lymphome digestif de bas grade félin et de l'entéropathie lymphoplasmocytaire.....	27
Figure 10 : Nids et plaques intraépithéliaux fortement en faveur d'un lymphome digestif de bas grade .....	28
Figure 11 : Analyse histologique et immunohistochimique d'un LDBG.....	29
Figure 12 : Différents types de profils obtenus par PARR chez le chat.....	30
Figure 13 : Survie globale de chats atteints de LDBG en rémission complète ou partielle. ....	38
Figure 14 : Infiltration lymphocytaire de l'épithélium chez les chats atteints de LDBG et d'ELP. ....	92
Figure 15 : Anomalies villositaires et cryptiques dans les groupes LDBG et d'ELP .....	93
Figure 16 : Caractérisation de l'infiltrat lymphocytaire dans la <i>lamina propria</i> chez les chats atteints de LDBG et d'ELP.....	94
Figure 17 : Infiltration lymphocytaire des couches profondes (sous-muqueuse, musculaire et séreuse) chez les chats atteints de LDBG et d'ELP.....	94
Figure 18 : Fibrose superficielle ou profonde chez les chats présentant un LDBG ou une ELP .....	95
Figure 19 : Gradient apico-basilaire observé avec un anticorps anti-CD3 chez deux chats atteints de LDBG.....	96
Figure 20 : Niveaux d'expression de l'épitope CD3 (A), CD20 (B) et Ki-67 (C) dans la <i>lamina propria</i> et l'épithélium chez les chats atteints de LDBG ou d'ELP. ....	97
Figure 21 : Expression de phosphoSTAT3 (A) et de phosphoSTAT5(B) au sein de la <i>lamina propria</i> des chats du groupe ELP et de ceux du groupe LDBG.....	98
Figure 22 : Analyse de la clonalité chez les chats atteints de LDBG ou d'ELP.....	99
Figure 23 : Abondance du microbiote selon le mode de vie (A) ou la présence de congénères (B) .....	101
Figure 24 : Alpha diversité discriminant les chats malades des chats sains .....	102
Figure 25 : Abondance différentielle : Différence minimale entre les chats du groupe LGAL ceux du groupe ELP. ....	103
Figure 26 : Illustration schématique des molécules pouvant cibler la voie JAK/STAT dans un contexte de lymphoprolifération T. ....	107
Figure 27 : Modèle proposé pour la lymphomagenèse du LDBG félin .....	112



# 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE : LYMPHOPROLIFÉRATIONS DIGESTIVES ET MODÈLES ANIMAUX SPONTANÉS

## 1.1 Lymphoproliférations primitives T indolentes du tractus digestif

### 1.1.1 Classification des lymphomes digestifs de l'homme

Les lymphomes gastro-intestinaux primitifs sont des pathologies rares qui représentent environ 1% de toutes les néoplasies gastro-intestinales et moins de 5% des lymphomes non hodgkiniens (LNH). Environ 20 à 25% des lymphomes extra-nodaux primitifs sont identifiés dans cette localisation selon la répartition suivante : 50 à 75% des cas intéressent l'estomac, 20-30% l'intestin grêle et 5-20% le colon<sup>1-4</sup>.

Les lymphomes gastro-intestinaux primitifs incluent différentes entités clinico-pathologiques qui diffèrent de par leur origine cellulaire, leur présentation clinique, leur évolution et leur prise en charge thérapeutique respectives. Les lymphomes B sont 6 fois plus fréquents que les lymphomes T et les sous-types agressifs prédominent. Les principaux types histologiques de lymphomes digestifs sont présentés dans le Tableau 1.

Phénotype	Lymphomes B	Lymphomes T
<b>Sous-types</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Lymphomes B extra-nodaux de la zone marginale du MALT</li><li>• Lymphome du manteau</li><li>• Lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL)</li><li>• Lymphome folliculaire</li><li>• Lymphome de Burkitt</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• EATL</li><li>• MEITL</li><li>• GI-TLPD indolentes</li><li>• ENKTCL</li></ul>

*Tableau 1* : Principaux types histopathologiques de lymphomes digestifs (WHO, 2016)<sup>5</sup>.  
D'après Matysiak-Budnik *et al*<sup>4</sup>.

EATL : Enteropathy-associated T-cell Lymphoma

MEITL : Monomorphic Epitheliotropic Intestinal T-cell Lymphoma

GI-TLPD : Gastro Intestinal T Lymphoproliferative Disorders

ENKTCL : ExtraNodal Natural Killer/T Cell Lymphoma

#### 1.1.1.1 *Lymphomes digestifs B*

Parmi les lymphomes B primitifs, les deux entités qui prédominent largement sont le lymphome B diffus à grandes cellules et le lymphome du MALT.

Le lymphome B diffus à grandes cellules B (DLBCL) est une tumeur lymphoïde intestinale agressive à fort index de prolifération. Le DLBCL représente la tumeur la plus fréquente avec plus d'un tiers des lymphomes du grêle et la moitié des lymphomes colorectaux.

Le lymphome extra ganglionnaire de la zone marginale du MALT est le plus souvent associé à la présence d'*Helicobacter pylori* dans sa localisation gastrique<sup>4,6</sup>. L'évolution de ce lymphome est indolente et la survie est prolongée après éradication des Hélicobactéries. Il atteint le plus souvent des adultes d'âge moyen. Cette entité représente cependant 5% des lymphomes du grêle et 25% des lymphomes colorectaux. L'aspect histopathologique est commun à toutes les localisations muqueuses : l'infiltrat néoplasique est composé de petites à moyennes cellules lymphoïdes, monocytoïdes ou centrocytiques-like qui se développe diffusément de la zone marginale des follicules lymphoïdes secondaires et colonise souvent les centres germinatifs. Une composante plasmocytaire peut être présente.

Les autres sous-types B moins fréquents et que nous ne détaillerons pas ici sont le lymphome folliculaire, le lymphome du manteau et le lymphome de Burkitt.

#### 1.1.1.2 *Lymphomes digestifs T/NK*

Concernant les lymphomes digestifs de phénotype T/NK, 4 sous-types histologiques dont 3 avec un phénotype T exclusif peuvent être observés. Nous ne développerons ici que les 3 entités suivantes : EATL, MEITL et GI-TLPD.

L'EATL pour Enteropathy-associated T-cell Lymphoma (anciennement dénommé EATL de type I) et le MEITL pour Monomorphic epitheliotropic T-cell Lymphoma (anciennement dénommé EATL de type II) représentent 5 à 8% des lymphomes T périphériques et 10 à 25% de tous les lymphomes primitifs intestinaux. Leur incidence rapportée est variable à l'échelle mondiale (9.1% des LNH en Europe versus 1.9% en Asie). Classiquement, les EATL et MEITL surviennent chez l'adulte âgé de plus de 50 ans, de sexe masculin (sex ratio H/F = 1.5/ 1) et ont pour localisations préférentielles l'intestin grêle, le jéjunum, l'iléon ou le duodénum. Des formes intestinales multifocales ont également été décrites.

Les manifestations cliniques associées sont des signes généraux tels que la fièvre, une anorexie et un amaigrissement et des signes digestifs alliant des troubles digestifs (diarrhées) et douleurs abdominales, voire des complications abdominales aiguës (occlusion/perforation intestinale, saignement digestif). Le pronostic de ces lymphomes reste sombre, avec des taux de survie globale de l'ordre de 20% à 5 ans, cela en raison d'une maladie souvent avancée lors du diagnostic et d'un état de dénutrition associé compliquant l'accès et la tolérance aux traitements de chimiothérapies<sup>7-9</sup>.

a) EATL

Il s'agit de la forme la plus fréquente. Elle représente 80 à 90% des lymphomes associés à une entéropathie<sup>9,11</sup>. L'EATL est classiquement associé à une maladie cœliaque (cliniquement présente chez environ 50% des patients, mais pouvant n'avoir pas été identifiée précédemment). Il est le plus souvent retrouvé dans les populations occidentales, notamment d'Europe du Nord, où cette entéropathie est commune. L'EATL peut être précédé d'une maladie cœliaque devenue réfractaire au régime sans gluten (« Refractory Celiac Disease » ou « Sprue Réfractaire », de type I avec lymphocytes intraépithéliaux polyclonaux ou de type II avec lymphocytes intraépithéliaux monoclonaux), ou d'une jéjunite ulcéreuse chronique (micronodules multiples ulcérés). Les lésions macroscopiques d'EATL incluent des masses intestinales, des nodules ulcérateurs, des sténoses qui peuvent être multifocales et associés à des lésions ulcérateuses d'apparence bénigne. Les ganglions de drainage des sites précédents peuvent être infiltrés, de même que des sites plus distants comme la rate, le foie ou encore la moelle osseuse, le parenchyme pulmonaire ou encore la peau<sup>10</sup>.

Les patients atteints de maladie cœliaque présentent un risque 6 fois supérieur de développer un EATL. On considère qu'environ 1% des malades souffrant de maladie cœliaque développeront un EATL.

Les lésions microscopiques sont caractérisées par des lymphocytes néoplasiques pléomorphes de moyenne à grande taille qui montrent des figures de mitose, au sein desquels d'autres cellules inflammatoires peuvent être identifiées (éosinophiles, histiocytes). L'infiltration est transmurale. Les lésions de la paroi intestinale incluent des zones de nécrose, une atrophie villositaire, une hyperplasie des cryptes, et une

lymphocytose intra épithéliale. L'immunophénotype des cellules néoplasiques est la suivante : CD3+, CD5-, CD4-, CD8+/-, CD56- et CD103+<sup>8</sup>.

b) MEITL

Aussi nommé « Lymphome digestif T monomorphe CD56+ », il représente moins de 20% des EATL et est rare dans les populations occidentales. On le retrouve préférentiellement dans les populations asiatiques<sup>8,12-14</sup>. La majeure partie des études s'accorde sur l'absence de maladie cœliaque concomitante et confirme l'absence d'antécédents digestifs chez ces patients.

Il est défini par une prolifération monomorphe de lymphocytes de taille moyenne, sans nécrose ni inflammation concomitante. Les lymphocytes tumoraux présentent un noyau rond à discrètement irrégulier. Ils diffusent dans la muqueuse adjacente et présentent un épithéliotropisme majeur. L'infiltration est souvent transmurale. Les lésions inflammatoires concomitantes ne sont pas identifiées. En revanche, des figures de mitoses et de nécrose sont visibles. L'épithéliotropisme est marqué mais l'atrophie villositaire et l'hyperplasie des cryptes sont absentes. Les lymphocytes néoplasiques de MEITL présentent un profil immunohistochimique cytotoxique : CD3+, CD5-, CD7+, CD4-, CD8+, CD30- et CD56+<sup>13</sup>.

c) Les lymphoproliférations T indolentes du tractus gastro-intestinal (GI-TLPD)

Elles sont décrites comme des proliférations clonales monomorphes de lymphocytes T associées à une évolution clinique indolente Cette maladie, décrite pour la première fois par Carbonnel *et al.* en 1994<sup>25</sup>, est une entité rare (57 cas décrits en 25 ans), seulement évoquée dans la littérature sous forme de case-reports ou de petites séries de cas. Elle n'a été que très récemment ajoutée à la dernière classification révisée de la WHO et reste encore mal caractérisée<sup>7,15-27</sup>.

**Ce travail de thèse ayant principalement porté sur cette entité, la suite de cette introduction sera consacrée aux les GI-TLPD.**

## 1.1.2 Aspects clinico-biologiques

### 1.1.2.1 Données épidémiologiques et cliniques

Les patients atteints de GI-LTPD sont plutôt des hommes (64%)<sup>20</sup> avec un âge médian au diagnostic de 51 ans (15-77ans)<sup>7,15,16,17,18,19,20,21, 22,23,25-30</sup>. La maladie se manifeste par une altération de l'état général et une diarrhée chronique de l'intestin grêle dans plus de 90% des cas, un amaigrissement dans plus de 80% des cas, une dysorexie et, dans certains cas, des douleurs abdominales, un syndrome dyspeptique ou des saignements rectaux peuvent être rapportés<sup>7,21,27,28</sup>. Des présentations cliniques plus atypiques ont été décrites : Egawa *et al.* ont cité le cas d'un patient présentant des saignements occultes avec des ulcères buccaux et colo rectaux récidivants<sup>25</sup>. Quelques patients ont aussi consulté pour des sueurs nocturnes sans fièvre<sup>7,23,26</sup>. Enfin exceptionnellement, un syndrome sub-occlusif a été rapporté.

Le diagnostic est le plus souvent fait avec retard avec une durée médiane d'évolution des signes cliniques au moment du diagnostic de plus de 7 ans (122-6122 jours)<sup>7,22,23,25-27,29,30</sup>.

### 1.1.2.2 Données biologiques

Les anomalies biologiques sont non spécifiques. Certains patients présentent une anémie microcytaire secondaire à des saignements digestifs<sup>7</sup>. Un bilan sérologique viral est souvent réalisé. Dans l'étude de Malamut *et al.*<sup>27</sup> les résultats des sérologies virales antérieures étaient aussi répertoriés : tous les patients étaient HIV négatifs et deux d'entre eux étaient HTLV-1 positifs sans que le virus ne soit retrouvé par PCR au sein de leurs biopsies<sup>27</sup>. En raison d'un syndrome de malnutrition et/ou du retard du diagnostic, une hypoalbuminémie est susceptible d'être identifiée<sup>15,27</sup>.

## 1.1.3 Imagerie et endoscopie - bilan d'extension

### 1.1.3.1 Imagerie

Les examens de tomodensitométrie (CT Scan et PET Scan) ou de scintigraphie sont proposés à la fois dans le cadre du bilan d'extension et pour le suivi des patients pris en

charge<sup>7,19,21,27,28,31</sup>. Chez certains patients, des clichés radiographiques ont montré la présence d'anses dilatées ou une suspicion d'épaississement digestif pariétal<sup>15</sup>. Une échographie a révélé la présence de pseudo-polypes sous-muqueux de localisations gastrique et duodénale proximale dans le « case report » décrit en 1996 par Hirakawa<sup>30</sup>. Des lésions hypoéchogènes sous-muqueuses diffuses dont la taille pouvait atteindre 2 cm de diamètre ont été visualisées malgré un aspect muqueux sub-normal, se traduisant par un relief muqueux « bosselé »<sup>30</sup>.

### 1.1.3.2 Aspects endoscopiques

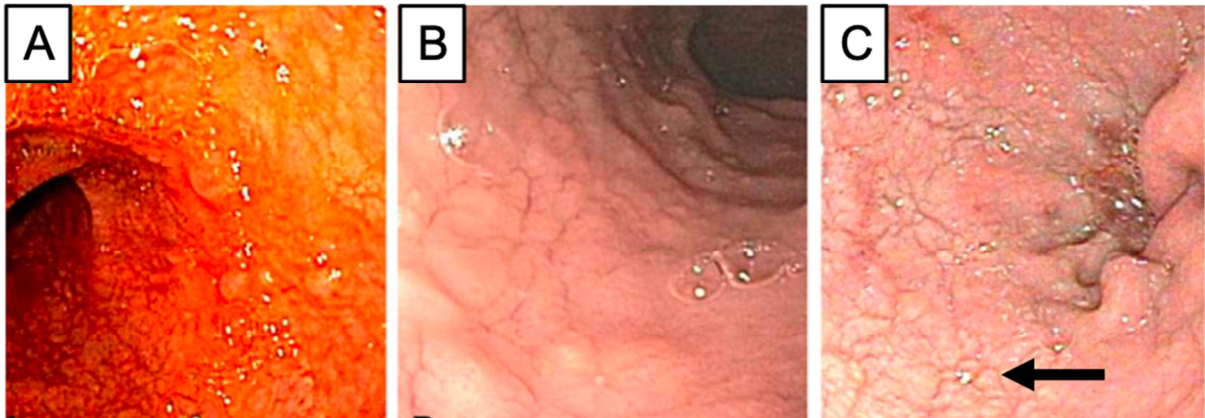
Les lésions histologiques sont multiples et disséminées le long du tractus gastro-intestinal et peuvent être réparties sur plusieurs segments digestifs sur un même patient. Les différentes localisations sont rapportées avec les fréquences suivantes<sup>7,18,21-23,25,27,28,30,31</sup>

:

- Cavité buccale : 12.8%
- Œsophage : 4.3%
- Estomac : 42.6%
- Duodénum : 63.9%
- Jéjunum : 46.8%
- Iléon : 42.6%
- Colon : 42.6%

L'analyse macroscopique per-endoscopique révèle un érythème de la muqueuse parfois associé à des érosions ou à de petites ulcérations, et occasionnellement la présence de polypes<sup>7</sup>. La muqueuse peut présenter un aspect subnormal, des plis épaissis, une friabilité anormale ou des zones congestives<sup>21</sup>. Ces observations endoscopiques manquent de spécificité. La présence d'une masse n'est pas en faveur d'une GI-TLPD. Dans de plus rares cas, comme évoqué plus haut, un aspect pseudo-polypoïde sous-muqueux plus prononcé a été décrit au niveau gastrique, duodéal proximal, iléal terminal mais pas en regard du jéjunum. Chez certains patients, des signes de colite ulcéraire superficielle minimale ont aussi été visualisés après coloration-spray de la muqueuse à l'indigo carmin à 0.2%<sup>30</sup>.

La figure 1 illustre les aspects endoscopiques d'un GI-TLPD duodéal.



*Figure 1* : Aspects endoscopiques macroscopiques de GI-TLPD duodéal.  
D'après Matnani *et al*<sup>21</sup>.

A : Muqueuse de granularité augmentée, micro nodulaire

B : Relief muqueux effacé, aspect pseudo nodulaire, « fissuré »

C : Muqueuse duodéal érosive, « pavimenteuse » (flèche), d'aspect très dysplasique.

#### 1.1.3.3 Bilan d'extension

Le bilan d'extension inclut un CT Scan, un PET Scan, une analyse en cytométrie en flux, un myélogramme et une biopsie de moelle osseuse<sup>27</sup>. Plusieurs patients inclus dans l'étude de Malamut *et al*<sup>27</sup>.ont présenté des ganglions mésentériques hypertrophiés. Dans certains cas, une hépatomégalie est identifiée.

Le PET scan peut révéler chez certains patients un hyper métabolisme au niveau intestinal et lymphatique. Lors du bilan d'extension, la maladie peut être identifiée sur des sites extra-digestifs : foie, amygdales, ou encore moelle osseuse. Des clones circulants ont été identifiés dans un certain nombre de cas<sup>27</sup>.

La cytométrie en flux réalisée sur des isolats de lymphocytes de l'épithélium intestinal est particulièrement informative puisqu'elle montre de faibles taux de

lymphocytes CD103+, contrairement à ce qui est rapporté lors de sprue réfractaire de type II<sup>27</sup>.

#### 1.1.4 Données histologiques, immunohistochimiques et de clonalité

##### 1.1.4.1 Analyse histologique

L'analyse histologique des biopsies per-endoscopiques révèle une *lamina propria* richement infiltrée par une population monomorphe de lymphocytes de petite taille qui présentent un noyau rond ou ovoïde, une chromatine fine et un cytoplasme assez clair. L'infiltration peut s'étendre à la sous-muqueuse et à la musculaire muqueuse<sup>21</sup>. L'architecture globale de la paroi digestive est toutefois préservée. Une infiltration des glandes est possible à différents degrés. L'hyperplasie des cryptes est inconstante et de degré variable<sup>7,21,29</sup>. Au niveau de l'intestin grêle, une atrophie villositaire variable est notée, associée à l'infiltration lymphocytaire<sup>29</sup>. Cependant, aucun signe de destruction de l'épithélium villositaire n'est observé<sup>1</sup>. Des éosinophiles peuvent être parfois associés à l'infiltrat lymphoïde. L'épithéliotropisme est de degré variable. Il peut s'exprimer sous forme de plages de type « patchy ». Quelques plaques de lymphocytes ont été décrites (lésions lympho-épithéliales) à la base des villosités ou au sein des cryptes<sup>17,21</sup>. Macroscopiquement, la nécrose est absente, de même que l'invasion lympho-vasculaire. La densité lymphocytaire de la *lamina propria* située à distance du site infiltré (estomac ou colon) peut être tenue et nécessiter des techniques complémentaires pour être confirmée. L'activité mitotique est faible dans tous les cas décrits. Malamut *et al.* et Perry *et al.* ont rapporté des cas où une maladie cœliaque et une maladie chronique inflammatoire de l'intestin étaient identifiées de manière concomitante<sup>23,27</sup>. Les aspects histologiques d'un GI-TLPD sont présentés dans la figure 2.



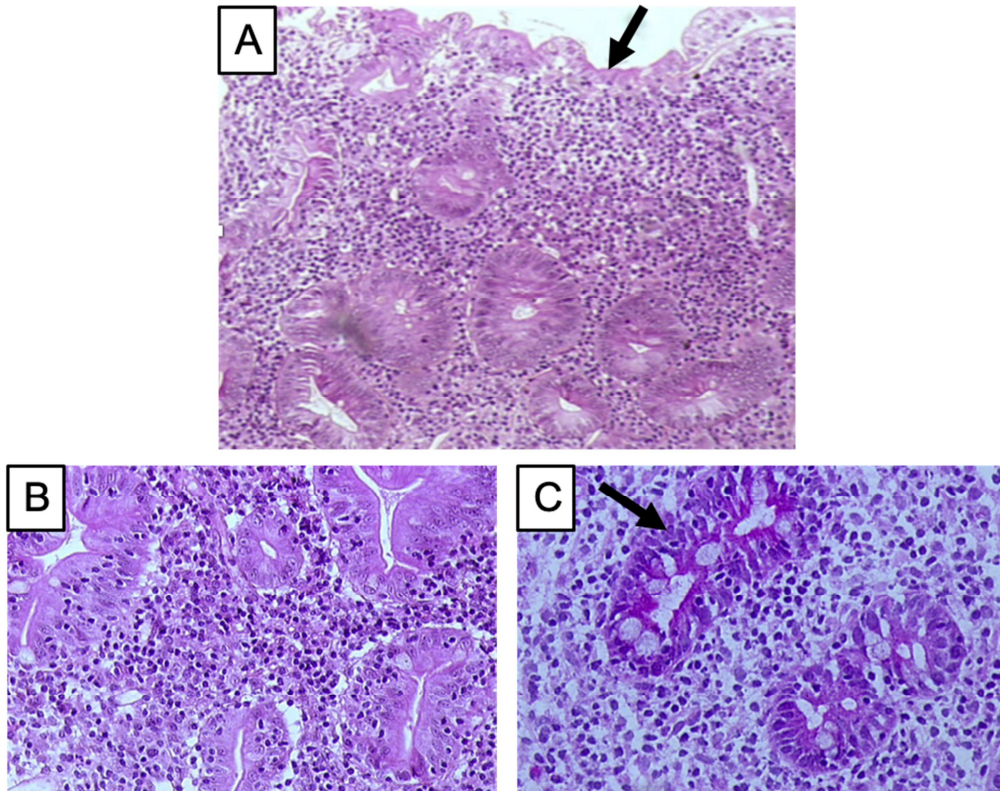


Figure 2 : Aspect histologique d'un GI-TLPD duodéal.

D'après Malamut *et al.*<sup>27</sup>

A : HE x100 : l'atrophie villositaire est subtotale (flèche) et l'infiltration de la *lamina propria* et des glandes par des petits lymphocytes monomorphes est diffuse et massive. Toutefois, l'architecture globale de la muqueuse duodénale reste préservée malgré l'infiltrat.

B : HE x200 : infiltration très dense et diffuse de la *lamina propria* par de petits lymphocytes monomorphes.

C : HE x200 : l'infiltrat est aussi glandulaire (flèche).

#### 1.1.4.2 Analyse immunohistochimique

L'analyse immunohistochimique révèle des lymphocytes tumoraux CD3+, qui sont CD4+, CD8+ ou plus rarement CD4-/CD8-. Les profils CD4/ CD8 retrouvés se répartissent comme suit<sup>7,17,18,21-23,25,27,28,30,31</sup>.

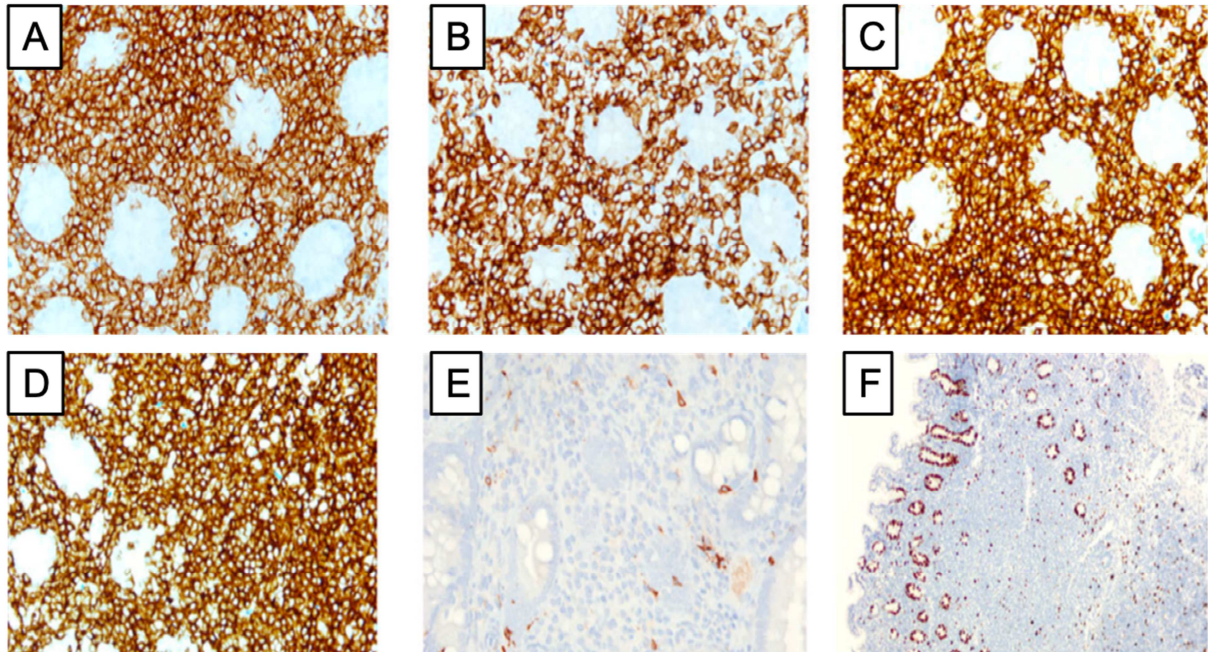
- CD4+/CD8+ : 4%
- CD4+/CD8- : 56%
- CD4-/CD8+ : 33%
- CD4-/CD8- : 7%

Les lymphocytes tumoraux exprimant CD8 ont le plus souvent un profil cytotoxique (TIA1+, granzyme B+/-). Les antigènes CD56, CD30 et CD103 ne sont habituellement pas exprimés par les lymphocytes tumoraux. Certaines publications font cependant état d'une positivité du CD103, confirmant le caractère hétérogène de la maladie.<sup>21</sup> Une diminution ou

une perte d'expression de CD5 et CD7 ont été décrites respectivement dans 33% et 50% des cas<sup>7,23,26,29</sup>.

L'expression du Ki-67 est faible, entre 5 à 10 %<sup>7,18,21,23,28</sup>. Les cellules néoplasiques expriment des récepteurs TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$ . Les récepteurs TCR $\alpha\beta$  sont les plus fréquemment exprimés, notamment lors de GI-TLPD CD4+<sup>7,21-23</sup>.

La figure 3 présente la caractérisation immunohistochimique d'un GI-TLPD duodénal.



*Figure 3* : Analyse immunohistochimique d'un GI-TLPD duodénal.  
D'après Matnani *et al*<sup>21</sup>.

A : Forte expression de CD4

B : Marquage CD3 caractérisant la lymphoprolifération T

C : Marquage CD5 très diffusément positif dans ce cas

D : Forte expression de CD7.

E : Marquage CD103 négatif

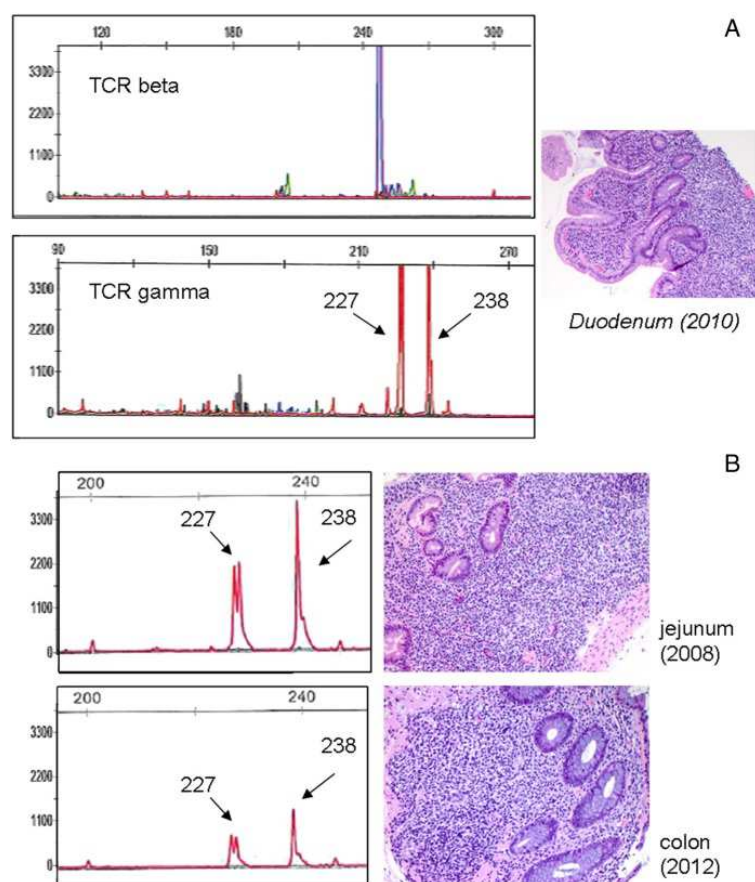
F : Marquage MIB1-Ki67 révélant un index de prolifération bas

L'activation de la voie STAT a également été analysée en immunohistochimie dans cette pathologie. Il apparaît que les cellules tumorales n'expriment pas phosphoSTAT3<sup>20,23</sup> mais expriment phosphoSTAT5 dans 55 % (5/9) des cas de GI-TLPD<sup>20</sup>.

### 1.1.4.3 Clonalité

La clonalité est principalement évaluée par la recherche d'un réarrangement clonal du TCR $\gamma$  grâce à une PCR multiplex<sup>32</sup> réalisée sur de l'ADN extrait des biopsies digestives. Plus rarement, un réarrangement TCR $\alpha\beta$  peut également être recherché<sup>33</sup>. Une monoclonalité est confirmée dans 94% des cas rapportés par la littérature<sup>7,15-17,19,21-23,25-28</sup>.

La figure 4 illustre la monoclonalité retrouvée au sein de différents tissus chez un homme de 42 ans suivi pour un GI-TLPD sur une période de dix ans.



**Figure 4 :** Analyse de clonalité réalisée sur différents segments du tractus digestif et à différents temps chez un patient atteint de GI-TLPD.

D'après Leventaki et al<sup>22</sup>.

A : Identification de pics mono-clonaux sur les TCR $\beta$  et  $\gamma$  au niveau de biopsies duodénales. La densité de l'infiltrat est importante.

B : Identification des mêmes pics mono-clonaux 227 et 238 sur les TCR $\gamma$  au niveau de biopsies du jéjunum et du colon réalisées à 4 ans d'intervalle.

## 1.1.5 Physiopathologie : données actuelles

### 1.1.5.1 Cellule d'origine

La pathogénie des GI-TLPDs est indéterminée et peu documentée dans la littérature<sup>17,22</sup>. L'origine anatomique des lymphocytes néoplasiques de GI-TLPD reste inconnue. Bien que les lésions soient le plus souvent négatives pour le CD103<sup>17</sup> il a été rapporté chez certains patients une expression positive du CD103, suggérant que les lymphocytes néoplasiques pourraient provenir de lymphocytes T précurseurs de la muqueuse digestive<sup>17,21,30</sup>.

Une étude récente<sup>17</sup> a analysé le niveau d'expression de T-bet et GATA3 des GI-TLPD afin de déterminer si les cellules tumorales T avaient plus un profil de lymphocyte T Helper (Th) de type 1 ou 2. Les sous-types CD4+ et CD4+/CD8+ présentent un profil hétérogène soit de type Th1 (T-bet+) ou Th2 (GATA3+) ou hybride Th1/Th2 (T-bet+/GATA3+) alors que la majorité des sous-types CD8+ ont un phénotype Th2 (GATA3+).

### 1.1.5.2 Facteurs étiologiques

Dans certains cas, des entéropathies auto-immunes avaient déjà été diagnostiquées chez des patients atteints de GI-TLPD, suggérant qu'une dérégulation immunitaire jouerait un rôle dans la pathogénie de la GI-TLPD<sup>7,27</sup>. Des facteurs environnementaux comme l'alimentation et des agents infectieux (virus, bactéries) pourraient également être impliqués dans le développement de la maladie<sup>7,23,26-28</sup>. L'Herpès virus humain type 6 (HHV-6) a été détecté dans des biopsies issues de l'intestin grêle d'un patient par analyse PCR et une sérologie positive au virus T-Lymphotropique humain (HTLV-1) a été observée chez deux patients au moment du diagnostic. Cependant, aucune intégration virale ni altération génétique n'a été observée au sein des biopsies intestinales<sup>27</sup>. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) n'est généralement pas retrouvé dans les biopsies intestinales chez les patients atteints de GI-TLPD.

### 1.1.5.3 Anomalies moléculaires

Le faible nombre de cas sur les 25 dernières années a limité la mise en œuvre prospective de caractérisation génétique extensive.



Dans l'étude de Malamut *et al*, une hybridation génomique comparative a été réalisée et a révélé une importante hétérogénéité dans les anomalies chromosomiques identifiées<sup>27</sup>. Dans l'étude de Margolske *et al*, une analyse en SNP Array a pu être réalisée sur des biopsies digestives de 3 patients ainsi que sur les cellules mononucléées périphériques de l'un d'entre eux<sup>7</sup>. L'analyse a été restreinte aux « Copy Number Changes » (CNCs) de plus de 200kb. Aucune CNC identifiée comme pathogène n'a été retrouvée sur ce patient hormis une monosomie X, seulement identifiée sur la biopsie tumorale.

Une seule étude<sup>23</sup> a recherché la présence de mutations de *STAT3* dans les GI-TLPD. Aucun des 10 patients testés ne présentait de mutation activatrice de *STAT3*.

Des fusions *JAK2-STAT3* ont été observées chez 80% (4/5) des patients avec GI-TLPD CD4+. Cette anomalie n'était ni détectée dans les autres sous-types de GI-TLPD (CD8+ ou CD4+/CD8+) ni dans les lymphomes T digestifs plus agressifs (EATL ou MEITL). Ces fusions sont associées à une activation de la voie *STAT5* en immunohistochimie mais pas à celle de *STAT3*, probablement en raison de la perte de la région activatrice de *STAT3*<sup>20</sup>.

Enfin très récemment, une analyse par reséquençage ciblé d'un panel de 465 gènes associés au cancer a été réalisée chez 10 patients avec GI-TLPD. Des anomalies aboutissant à l'activation de la voie *JAK/STAT* (mutations de *STAT3*, délétion de *SOCS1* ou réarrangement *JAK2-STAT3*) ont été observées dans 75% (3/4) des patients avec GI-TLPD CD4+. Par ailleurs, des mutations intéressant les régulateurs épigénétiques *TET2*, *DNMT3A* et *KMT2D* ont été détectées chez 4/10 patients (2 CD4+, 1 CD4+/CD8+ et 1 CD4-/CD8-). Aucune mutation affectant la voie *JAK/STAT* ou des gènes de l'épigénétique n'a été retrouvée chez les patients de sous-type CD8+ (n=4). Néanmoins, deux de ces patients présentaient un réarrangement impliquant le gène *IL2* et entraînant une délétion de sa région régulatrice 3'UTR<sup>17</sup>. Une translocation t(4;16)(q26;p13) impliquant la même région du gène *IL2* avait déjà été décrite précédemment par Carbonnel *et al* en 1994 et 1999<sup>15,34</sup>. Ce type d'anomalie pourrait aboutir à une demi-vie plus longue de l'ARN messager de l'*IL2*. L'*IL2* étant une cytokine-clé dans la signalisation de la voie *JAK/STAT*, ces réarrangements pourraient être également à l'origine d'une activation de la voie *JAK/STAT*<sup>17</sup>.

### 1.1.6 Traitement médical des lymphoproliférations T digestives de l'homme

A l'heure actuelle, aucune recommandation thérapeutique n'a été validée pour la prise en charge des GI-TLPD<sup>4</sup>. De plus les données bibliographiques sont très hétérogènes.

L'administration d'un régime sans gluten ne permet pas d'obtenir de modifications histologiques<sup>7,27,28</sup>. L'antibiothérapie à long terme permet des rémissions cliniques inconstantes sans amélioration histologique<sup>23,27</sup>. Les immunomodulateurs analogues des purines (azathioprine, cladribine) et les chimiothérapies conventionnelles (cyclophosphamide, doxorubicine, prednisone voire gemcitabine) ont été testés et ne sont pas validés en raison d'un manque d'efficacité et d'une toxicité importante<sup>15,21,28,31</sup>.

L'administration d'anticorps monoclonaux anti-CD52 (Alemtuzumab) a permis l'obtention d'une réponse clinique avec régression complète des lésions chez 3 patients suggérant une possible efficacité de ce type d'immunothérapie dans certains cas<sup>27,29</sup>.

Néanmoins, chez plusieurs patients traités, bien que les lésions histologiques aient majoritairement régressé, les lymphocytes tumoraux était toujours identifiables par clonalité<sup>15,17,26,29</sup>.

En raison du mode évolutif de cette lymphoprolifération, la stratégie « Watch and Wait » est une option parfois envisagée car les effets secondaires des protocoles thérapeutiques peuvent être plus délétères que les manifestations cliniques de la maladie elle-même<sup>23</sup>.

### 1.1.7 Pronostic

Cette affection étant d'évolution indolente dans la plupart des cas, les patients atteints sont bien souvent encore en vie après plusieurs années de suivi<sup>7,21,26-28</sup>. Néanmoins, trois patients rapportés dans la littérature, ont développé une forme agressive de lymphome T à grandes cellules plusieurs années après le diagnostic (à respectivement 3, 11 et 27 ans après le diagnostic de GI-TLPD).

### 1.1.8 Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel des GI-TLPD est complexe et souvent tardif comme l'atteste la durée d'évolution des signes cliniques des patients chez lesquels le diagnostic est finalement établi.

#### *1.1.8.1 Pathologies bénignes*

En raison de l'atrophie villositaire et de l'épithéliotropisme, l'un des diagnostics différentiels des GI-TLPD peut être la maladie cœliaque<sup>36</sup> ou la sprue rétractaire<sup>17,28</sup>. Il est donc important de s'aider du dosage des anticorps anti-gliadine et des anticorps anti-transglutaminase ainsi que de la recherche de l'haplotype HLA DQ2/DQ8. Une entéropathie auto-immune peut également être avancée et la négativité des anticorps anti-AIE 75 kDa et anti-entérocytes permet d'orienter le diagnostic<sup>27</sup>. Plus rarement, un diagnostic erroné de maladie inflammatoire chronique ou de colopathie peut être établi.

#### *1.1.8.2 Pathologies malignes*

Comme décrit plus haut, face à un lymphome T primitivement digestif, deux autres entités peuvent être évoquées : l'EATL et le MEITL. Le tableau 2 résume les principales caractéristiques cliniques, histologiques et moléculaires des 3 principaux types de lymphome T digestif.

Type de lymphome Caractéristiques	EATL	MEITL	GI-TLPD
Fréquence	80-90% des EATL	10-20% des EATL	Très rare : 57 cas décrits sur les 25 dernières années
Morphologie	Cellules de taille moyenne à grandes, pléomorphisme Infiltrat inflammatoire concomitant fréquent Nécrose fréquente Lymphocytose intraépithéliale ++ Hyperplasie des cryptes Atrophie villositaire	Monomorphisme, cellules de taille moyenne, épithéliotropisme Rare infiltrat inflammatoire concomitant Rare nécrose Atrophie villositaire inconstante Absence d'hyperplasie des cryptes Infiltration transmurale possible	Monomorphisme à petites cellules, épithéliotropisme Atrophie villositaire variable
Immunophénotype	CD3 <sup>+</sup> , CD5 <sup>-</sup> , CD8 <sup>-</sup> (majoritaire) CD56 <sup>-</sup> , CD30 <sup>+</sup> fréquent Marqueurs d'activation cytotoxique : TIA1 <sup>+/-</sup> , granzyme B <sup>+</sup> , perforine <sup>+/-</sup> , MATK <sup>+</sup> <40% des cellules tumorales	CD3 <sup>+</sup> , CD5 <sup>-</sup> , CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> , CD56 <sup>+</sup> , CD30 <sup>-</sup> Marqueurs d'activation cytotoxique : TIA1 <sup>+/-</sup> granzyme B <sup>+</sup> , perforine <sup>+/-</sup> , MATK <sup>+</sup> >80% des cellules tumorales Co expression du CD20 dans environ 20% des cas	CD3 <sup>+</sup> (100 %) CD4 <sup>+</sup> (56%), CD8 <sup>+</sup> (33%), CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>-</sup> (7%) CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> (4%), CD56 <sup>-</sup> Ki67 <i>lamina propria</i> < 10%
TCR	TCR αβ le plus souvent	TCRγδ > TCRαβ	TCRαβ le plus souvent
Voie JAK/STAT	Mutation <i>JAK1</i> (20-50%) Mutation <i>JAK3</i> (10%) Mutation <i>STAT3</i> (10%) Mutation <i>STAT5B</i> rare	Mutation <i>JAK1</i> (10-20%) Mutation <i>JAK3</i> (35-50%) Mutation <i>STAT3</i> (10%) Mutation <i>STAT5B</i> (50-65%)	Mutations <i>STAT3</i> (25%) Fusions <i>JAK2-STAT3</i> (25%)
Évolution	Agressive	Agressive	Indolente chronique, rechutes fréquentes

Tableau 2 : Caractéristiques distinctives de l'EATL, du MEITL et des GI-TLPD indolentes<sup>17,20,23</sup>,



### 1.1.9 Synthèse

Le tableau 3 résume les points-clés caractérisant les lymphomes indolents T du chorion de l'homme (GI-TLPD).

Synthèse : Lymphome T indolent chez l'homme (GI-TLPD)
Les lymphomes gastro intestinaux primitifs sont rares chez l'homme. Les phénotypes B prédominent. Les phénotypes T évoluent sur un mode agressif à l'exception d'une très rare lymphoprolifération du chorion, caractérisée par un infiltrat monomorphe de petits lymphocytes T (GI-TLPD). Cette entité a été intégrée à la dernière classification WHO en 2016.
Le GI-TLPD a été décrit pour la première fois par Carbonnel en 1994. 57 cas ont été décrits dans la littérature au cours des 25 dernières années.
Les signes cliniques évoluent sur de très longues périodes. Ils incluent une altération de l'état général, un amaigrissement, une diarrhée chronique, des saignements digestifs et des douleurs abdominales.
Les caractéristiques histologiques principales sont les suivantes : infiltration de la <i>lamina propria</i> par une population monomorphe de petits lymphocytes à cytoplasme clair. L'infiltration peut concerner la sous-muqueuse et la musculature. L'épithéliotropisme et l'atrophie villositaire sont de degré variable.
Le profil immuno histochimique de la maladie inclut : CD3 <sup>+</sup> CD4/CD8 variable selon les cas décrits, CD56 <sup>-</sup> , un index de prolifération faible (de l'ordre de 10%). Une monoclonalité du TCRγ est quasi constante.
La caractérisation génétique est actuellement insuffisante en raison du faible nombre de cas.
Les clones néoplasiques persistent, même lors de rémissions cliniques.
Le traitement n'est pas standardisé. Les immunomodulateurs ou les chimiothérapies conventionnelles générant des effets secondaires délétères, une stratégie « Watch & Wait » est parfois proposée.
Le pronostic à moyen/long terme est favorable mais plusieurs des cas décrits ont évolué vers des lymphomes digestifs plus agressifs d'évolution fatale.

Tableau 3 : Synthèse des principales caractéristiques des GI-TLPD de l'homme

## 1.2 Lymphomes T intestinaux de bas grade dans l'espèce féline

### 1.2.1 Classification des lymphomes digestifs chez le chat

Les tumeurs hémato-lymphopoiétiques représentent un tiers des tumeurs malignes chez le chat. Parmi ces tumeurs, 50 à 90 % sont des lymphomes. Les lymphomes digestifs représentent la première forme de néoplasie gastro-intestinale chez le chat, devant les adénocarcinomes, les mastocytomes et les léiomyosarcomes digestifs<sup>37-43</sup>. Le lymphome digestif du chat est défini selon trois grades histologiques : bas grade, grade intermédiaire, et haut grade. Le lymphome digestif de bas grade (LDBG) est le sous-type le plus fréquemment rencontré, comme illustré dans la figure 5. <sup>37,38-40</sup>.

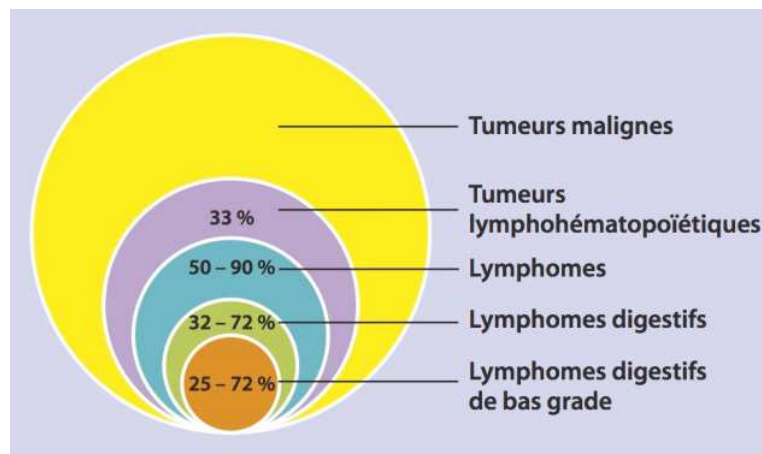


Figure 5 : Place des lymphomes digestifs au sein des tumeurs lypho-hématopoiétiques

La classification des lymphomes digestifs peut être définie par deux modèles : la classification REAL/WHO qui se fonde sur les critères morphologiques (petites ou grandes cellules) et immunophénotypiques des lymphocytes tumoraux (T ou B) et la classification du National Cancer Institute Working Formulation (NCIWF) décrivant la fréquence des mitoses pour trois grades histologiques (bas grade, grade intermédiaire et haut grade)<sup>40,43,44,46,47</sup>.

Le tableau 4 présente la classification des différents lymphomes digestifs dans l'espèce féline<sup>46,48</sup>.

NCIWF	REAL/WHO
<b>LGAL</b> (« <i>Low-Grade Alimentary Lymphoma</i> »), lymphome digestif de bas grade (LDBG)	Lymphome à petites cellules / lymphocytaire/ bien différencié / épithéliotrope à petites cellules T <u>PHENOTYPE T</u>
<b>GAL</b> ( <i>intermediate-grade alimentary lymphoma</i> ), lymphome digestif de grade intermédiaire (LDIG)	Lymphome mixte <u>PHENOTYPE NON ETUDIE</u>
<b>HGAL</b> ( <i>high-grade alimentary lymphoma</i> ), lymphome digestif de haut grade (LDHG)	Lymphome à grandes cellules / lymphoblastique / mal différencié <u>PHENOTYPE B MAJORITAIRE</u>
	Lymphome à grands lymphocytes granuleux (LGLG) <u>PHENOTYPE T &gt;90%</u>

**Tableau 4 :** Classification des lymphomes digestifs félines selon les classifications REAL/WHO et National Cancer Institute Working Formulation (NCIWF)

La localisation préférentielle des différents sous-types de lymphomes est indiquée dans le tableau 5<sup>37,40,44,46,49,50</sup>.

TYPE		LDBG			LDIG			LDHG			LGL		
Proportion du type/LD <sup>(1)</sup>		25 à 72 %			NR			15 à 54 %			6 à 7 %		
Phénotype		T	B	NK	T	B	NK	T	B	NK	T	B	NK
		> 90 %	< 10 %	≈ 0 %	NR	NR	≈ 0 %	< 50 %	> 50 %	≈ 0 %	> 90 %	= 0 %	< 10 %
Localisations préférentielles	Estomac	+/-			+			+++			+++		
	Intestin grêle	+++			+			+++			+++		
	Gros intestin	+/-			+			+++			+++		
	NL méésentériques	+++			+			+++			+++		
	Extra-intestinales (NL, foie, rate, moelle osseuse)	-			+			+			+++		

**Tableau 5 :** Localisation préférentielle des différents sous-types de lymphomes

LD : lymphome digestif ; LDBG : LD de bas grade ; LDIG : LD de grade intermédiaire ; LDHG : LD de haut grade ; LGL : lymphome à grands lymphocytes granuleux ; NL : nœud lymphatique ; NK : Natural killer ; NR : non renseigné. +/- localisation variable ; + localisation fréquente ; +++ localisation principale.

Les localisations les plus fréquemment atteintes lors de LDBG chez le chat sont résumées dans le tableau 6. L'atteinte gastrique est rarissime.

Régions de l'intestin grêle	Prévalence
Duodénum	83 % (10/12)
Jéjunum	100 % (15/15)
Iléon et jonction iléo-colique	93 % (13/14)

**Tableau 6 :** Localisation préférentielle du lymphome de bas grade félin. D'après Lingard et al<sup>38</sup>.

A l'instar de ce qui a été précisé plus haut à propos des lymphoproliférations indolentes T chez l'homme, la suite de ce manuscrit, pour la partie féline, ne sera dédiée qu'aux LDBG. **Les données exposées ci-après ont fait l'objet d'une revue publiée dans BMC Vet Research**<sup>51</sup> (cf annexe).

### 1.2.2 Épidémiologie

Les LDBG concernent essentiellement les chats d'âge avancé (médiane d'âge de 13 ans)<sup>45</sup>. Quelques études évoquent une possible prédisposition des mâles pour le LDBG<sup>46,52</sup>. Les races Européenne, Siamoise et Orientale semblent être plus sujettes au lymphome digestifs mais, à ce jour, aucune association n'a été évoquée concernant le LDGB. De manière claire, il a été rapporté que la prévalence du LDBG augmente depuis ces dix dernières années<sup>37,41,47,49</sup>.

### 1.2.3 Aspects cliniques et biologiques

#### 1.2.3.1 Aspects cliniques

Les signes cliniques du lymphome digestif de bas grade félin sont aspécifiques. Le tableau est dominé par une perte de poids (80 à 90 % des cas), une anorexie (60 à 70 % des cas) et des troubles digestifs (vomissements dans 70 à 80 % des cas et diarrhées dans 50 à 65 % des cas). D'autres signes beaucoup plus rares sont rapportés : ictère, splénomégalie, polyuro-polydipsie et léthargie<sup>41,42,47,52,53</sup>. Les manifestations cliniques peuvent évoluer pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois. La palpation abdominale est une étape essentielle de l'examen clinique chez un chat : étant donné le format de l'animal, elle est souvent très informative. Bien que la palpation abdominale puisse être normale lors de LDBG, un épaississement des anses intestinales est souvent rapporté. Si la présence de masses palpables n'est pas classique lors de LDBG, elle est en revanche évocatrice de lymphome digestif plus agressif. L'examen clinique ne permet pas de différencier un LDBG d'une entéropathie lymphoplasmocytaire (ELP). Établir un diagnostic de certitude est complexe dans cette espèce car l'intégralité du tableau clinique est identique pour ces deux maladies<sup>41,42,47,52,53</sup>.

### 1.2.3.2 Données biologiques

Un bilan à la fois hématologique, biochimique, hormonal et enzymatique est préconisé afin d'exclure, en particulier, une insuffisance rénale chronique (créatinine, urée), une hyperthyroïdie (thyroxine [T4] totale), une atteinte hépatique (alanine aminotransférase [ALAT], aspartate aminotransférase [ASAT],  $\gamma$ -glutamyltransférase [ $\gamma$ GT], phosphatase alcaline [PAL]), une pancréatite (lipase pancréatique féline [fPLI]), une maladie infectieuse y compris parasitaire (Numération et Formule Sanguines [NFS]). À titre pronostique, un test de dépistage pour les virus FIV et FeLV peut être effectué<sup>42</sup>. Le tractus gastro-intestinal étant la localisation première des LDBG, la quantification des biomarqueurs de l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la paroi digestive est nécessaire. Étant donné le caractère très différencié de la maladie et l'absence de lésions ulcératives dans ce contexte, l'identification d'une anémie est très rare lors de lymphoprolifération de bas grade féline.

Une hypoalbuminémie a été antérieurement rapportée chez 70 % des chats atteints de lymphomes digestifs, 49 % des chats atteints de LDBG et 77 % des chats atteints d'ELP (référence : 3.2–4,7 g/dL)<sup>54</sup>. Une hypothèse serait que les lymphocytes tumoraux produisent en excès la cytokine IL6 dont la fonction est de réduire la synthèse de l'albumine. Ceci dit, les données de la littérature ne sont pas homogènes sur ce point.

L'hypocobalaminémie (hypovitaminose B12) est décrite dans 50 à 80 % des LDBG (valeur de référence : >290 ng/L). La cobalamine est absorbée dans l'iléon distal, localisation fréquente du LDBG. L'hypocobalaminémie peut également aggraver la diarrhée, les vomissements, la dysorexie, l'amaigrissement et, dans les cas sévères, peut entraîner une léthargie, une hyposthénie et majorer une anémie<sup>41,42,45,49,53,57</sup>.

## 1.2.4 Diagnostic et bilan d'extension

### 1.2.4.1 Imagerie : échographie abdominale

Compte tenu de son manque de sensibilité, la radiographie conventionnelle ou avec produit de contraste n'a pas d'intérêt dans le diagnostic des lymphoproliférations de bas grade félines.

Étant donné le petit format des animaux atteints, et contrairement à ce qui est rapporté chez l'homme, l'échographie abdominale, réalisée à l'aide d'une sonde de haute fréquence, permet de visualiser l'épaississement focal ou diffus, les modifications de la stratification de la paroi digestive, le péristaltisme et le contenu endoluminal. Lors de cet examen, la paroi gastro-intestinale normale apparaît en quatre couches avec une alternance de strates hyper- et hypo-échogènes correspondant à la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et à la séreuse<sup>42,56-58</sup>.

La figure 6 illustre l'aspect échographique normal de la paroi intestinale du chat.

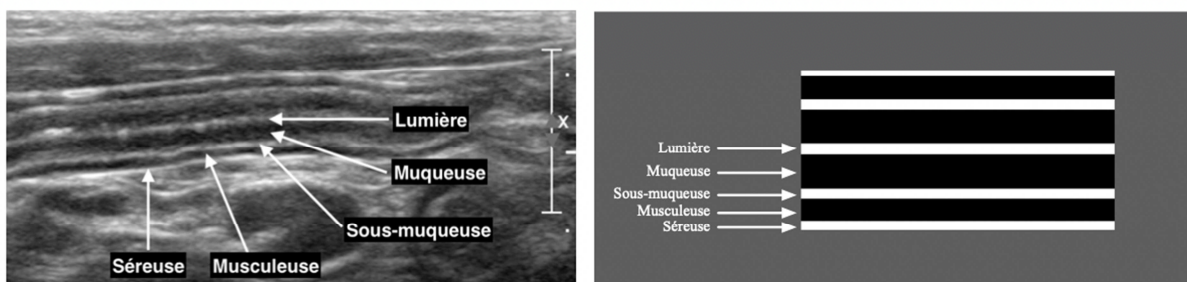


Figure 6 : Aspect échographique normal et schématique de la paroi intestinale du chat. Coupe longitudinale. Crédit photo : Service d'imagerie de l'ENVA, Dr Pascaline Pey.

Lors de LDBG, les modifications échographiques peuvent être très minimes, voire absentes. Un examen échographique normal ne permet en aucun cas d'écarter avec certitude la présence d'un LDBG dans l'espèce féline<sup>49</sup>. Les altérations échographiques du tractus digestif les plus rapportées lors de tumeurs gastro-intestinales sont les suivantes : épaississement ou modifications de la structure en couches, hypertrophie des nœuds lymphatiques de drainage, lymphadénomégalie et/ou splénomégalie, hépatomégalie et/ou épanchement péritonéal. Un épaississement de la musculuse segmentaire ou généralisé est fréquemment associé au lymphome digestif, notamment lors de LDBG, bien qu'il soit aussi compatible avec une cause inflammatoire (ELP)<sup>42,56-58</sup>.

D'après les données actuelles, les paramètres échographiques ne permettent pas de différencier avec certitude un LDBG d'une ELP comme le montre l'étude de Gianella *et al.* dans laquelle aucune différence significative n'a été observée entre ces deux entités<sup>59</sup>.

L'épaississement de la paroi intestinale est la lésion la plus fréquemment décrite (50 à 80 % des cas de LDBG)<sup>38,53,56,57,60,61</sup>. Il n'existe à ce jour aucune valeur seuil discriminante entre une paroi normale et une paroi lymphomateuse ou inflammatoire. Cependant,

l'épaississement de la musculature est souvent rapporté dans la littérature chez les chats atteints de LDBG ou d'ELP<sup>60</sup> et plus sévèrement dans les cas d'entérite éosinophilique<sup>62</sup>. Dans l'étude de Daniaux *et al.*, l'épaisseur moyenne de la musculature chez les chats atteints de LDBG ou d'ELP est doublée. Un épaississement de la musculature est défini pour un ratio épaisseur de la musculature sur épaisseur de la sous-muqueuse supérieur ou égal à 0,5<sup>57</sup>.

La figure 7 illustre l'épaississement de la musculature compatible avec un LDBG ou une ELP chez le chat.



Figure 7 : Aspect échographique anormal de la musculature intestinale jéjunale d'un chat présentant un LDBG.

Cet aspect échographique est aussi compatible avec un diagnostic d'ELP. Crédit photo ENVA©

La lymphadénomégalie (adénopathie) mésentérique est le plus souvent modérée<sup>57,60</sup>. En 2006, dans l'étude rétrospective d'Evans *et al.* portant sur 12 chats atteints d'ELP et 10 chats atteints de lymphomes digestifs tous types confondus, 2 des 12 ELP et 6 des 10 lymphomes digestifs étaient associés à une lymphadénomégalie<sup>63</sup>. La première étude s'intéressant exclusivement à la lymphadénomégalie mésentérique chez des chats atteints de LDBG a été publiée en 2009<sup>38</sup>. Sur 17 chats atteints de LDBG, 12 présentaient une lymphadénomégalie mésentérique dont le diamètre moyen du nœud lymphatique était de 15,9 mm (intervalle de 6,5 à 30 mm). Dans une étude plus récente<sup>57</sup>, les ganglions coliques de chats atteints de LDBG ont été rapportés comme étant 1,58 fois plus gros que la normale alors que l'hypertrophie des ganglions jéjunaux n'était pas systématiquement observée. Une hypertrophie modérée des ganglions mésentériques est probablement associée à la fois aux LDBG et aux ELP<sup>57</sup>. Aucune étude publiée ne discrimine un LDBG d'une ELP d'après la lymphadénomégalie mésentérique/jéjunale.

Enfin, l'échographie est utile aux cytoponctions des ganglions jéjunaux mais dans un contexte de lymphoprolifération de bas grade, elles ne sont pas informatives. Un examen

histologique est toujours nécessaire. En effet, la population de lymphocytes tumoraux est essentiellement constituée de petits lymphocytes et n'est souvent pas considérée comme anormale dans un ganglion. Elle peut donc être décrite comme des lésions d'hyperplasie lymphoïde bénigne ou d'infiltration inflammatoire lymphocytaire.

#### 1.2.4.2 Endoscopie digestive

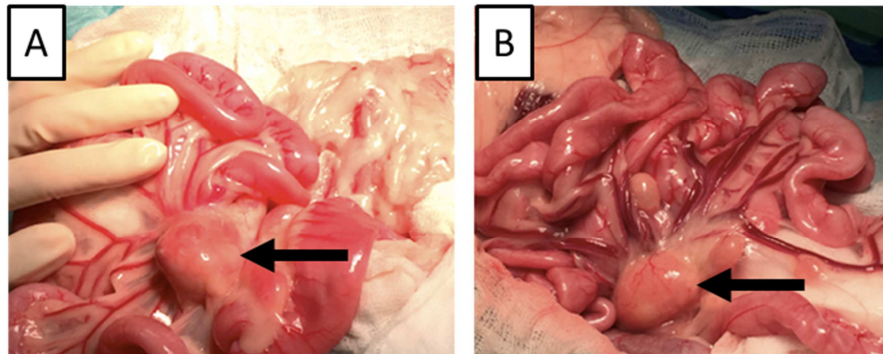
L'endoscopie est un examen complémentaire fréquemment utilisé chez le chat pour le diagnostic des lymphomes digestifs, mais uniquement lorsque les lésions suspectées siègent sur des segments accessibles, ce qui constitue une limite majeure dans le diagnostic différentiel déjà complexe entre un LDBG et une entéropathie lymphoplasmocytaire. Si l'examen est peu invasif, rapide (moins de 30 min), il permet de multiplier les prélèvements, mais de la muqueuse exclusivement. Dans certains cas, des lésions muqueuses non identifiables à l'échographie sont observables<sup>54,63</sup>. Les segments digestifs explorables par voie haute sont exclusivement l'œsophage, l'estomac, le duodénum proximal et par voie basse l'iléon distal qui fait l'objet de biopsies par cathétérisme, le colon et le rectum<sup>42</sup>. Le jéjunum n'est pas accessible par endoscopie. De plus, la jonction iléo-colique peut être très difficile à franchir en raison à la fois de son orientation endo-luminale et du petit format de l'animal. Si les propriétaires déclinent la réalisation de biopsies pleine épaisseur, un bilan endoscopique par voie haute et basse doit être systématiquement être entrepris. Six biopsies doivent *a minima* être prélevées par segment digestif<sup>45</sup>. Elles doivent faire l'objet d'une analyse histologique et immunohistochimique. Les limites de cet examen sont d'abord topographiques, notamment lors de LDBG dont la localisation préférentielle la plus souvent décrite est le jéjuno-iléon<sup>47,63</sup>. De plus, les prélèvements ne concernent que la muqueuse, masquant les potentielles lésions infiltratives de la musculature ou les infiltrations pan-pariétales.

#### 1.2.4.3 Laparotomie exploratrice

La chirurgie est la procédure recommandée dans un contexte de diagnostic différentiel ELP versus LDBG. Lorsque les lésions suspectées ne sont pas accessibles par endoscopie, ce qui reste le cas le plus fréquent lors de lymphome de bas grade chez le chat, la laparotomie permet la réalisation de biopsies « pleine épaisseur » du tractus digestif, des



nœuds lymphatiques, et de tous les organes abdominaux présentant des anomalies. Dans le contexte spécifique du diagnostic différentiel entre un LDBG et une ELP, aucun argument macroscopique ne permet de les discriminer au cours de l'intervention chirurgicale (Figure 8) Cependant, cette procédure plus invasive expose l'animal a des complications post-opératoires qui restent très rares mais qui sont préalablement exposées au propriétaire<sup>38,42,49,64</sup>.



*Figure 8* : Aspect macroscopique des anses jéjunales et des ganglions jéjunaux au cours de la laparotomie exploratrice

**A : ELP** : Aspect macroscopique du tractus digestif chez une chatte stérilisée de 12 ans présentée pour dysorexie et vomissements chroniques. L'hypertrophie des ganglions jéjunaux est très importante (flèche) et aurait pu évoquer une lésion tumorale.

**B : LDBG** : Aspect macroscopique du tractus digestif chez un chat mâle stérilisé de 13 ans présenté en consultation pour vomissements non alimentaires chroniques. La paroi digestive semble peu modifiée et l'adénomégalie n'est pas plus marquée que celle de la photo A (flèche). Pourtant, l'analyse immunohistochimique a mis en évidence une lymphoprolifération intestinale T de bas grade avec atteinte du ganglion jéjunal. Crédit photo Valérie Freiche. ENVA©

#### 1.2.4.4 Bilan d'extension

Le bilan d'extension est dicté par le type de lymphome digestif identifié. Dans un contexte de LDBG, les lésions lymphomateuses sont très majoritairement cantonnées au tractus digestif et aux ganglions de drainage, bien qu'une infiltration occasionnelle du parenchyme hépatique, du pancréas et de la rate soit possible. Chez un animal de petite taille comme le chat, le scanner n'est pas intégré au bilan d'extension et sa pertinence n'a fait l'objet d'aucune étude scientifique. Par ailleurs, pour des raisons de coût, un myélogramme n'est pas systématiquement réalisé lorsqu'une lymphoprolifération de bas-grade est suspecté, en raison de la faible probabilité d'infiltration médullaire<sup>65</sup>.

## 1.2.5 Données histologiques, immunohistochimiques et de clonalité

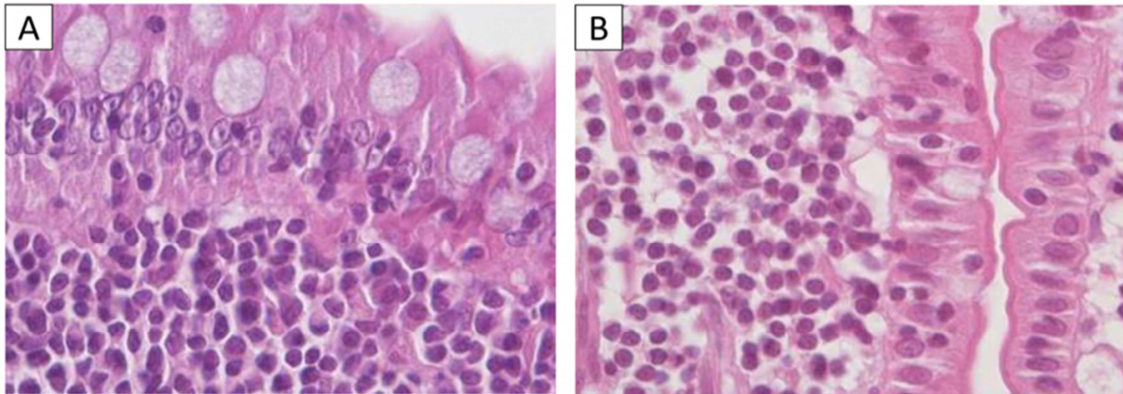
### 1.2.5.1 Données histologiques

La structure histologique topographique normale de l'intestin grêle dans l'espèce féline est identique à celle de l'homme.

Lors de LDBG, l'analyse histologique constitue une étape clé pour le diagnostic car comme évoqué, l'analyse cytologique présente d'importantes limites dans le diagnostic. Pour exemple, le pourcentage de prélèvements faux-négatifs issus des nœuds lymphatiques mésentériques avoisine les 50 %<sup>38</sup>. En effet, la population de lymphocytes tumoraux est essentiellement constituée de petits lymphocytes présentant le même aspect cytologique qu'une population lymphocytaire normale d'un ganglion sain<sup>43,47,66</sup>.

Le LDBG est caractérisé par un infiltrat monomorphe de lymphocytes néoplasiques, de taille petite à intermédiaire et infiltrant essentiellement l'épithélium et la *lamina propria* des villosités intestinales. Une infiltration de la sous-muqueuse et de la musculature est également souvent rapportée<sup>39,67,68</sup>. Contrairement à ce qui est rapporté chez l'homme, la répartition des lymphocytes néoplasiques chez le chat peut être très inconstante au sein à la fois du tractus digestif mais aussi d'une même biopsie, ce qui rend le diagnostic beaucoup plus complexe.

La différenciation entre un infiltrat néoplasique et inflammatoire est difficile puisque les caractéristiques histologiques du LDBG et d'ELP peuvent être similaires, particulièrement en cas d'ELP<sup>59,67</sup> (Figure 9).



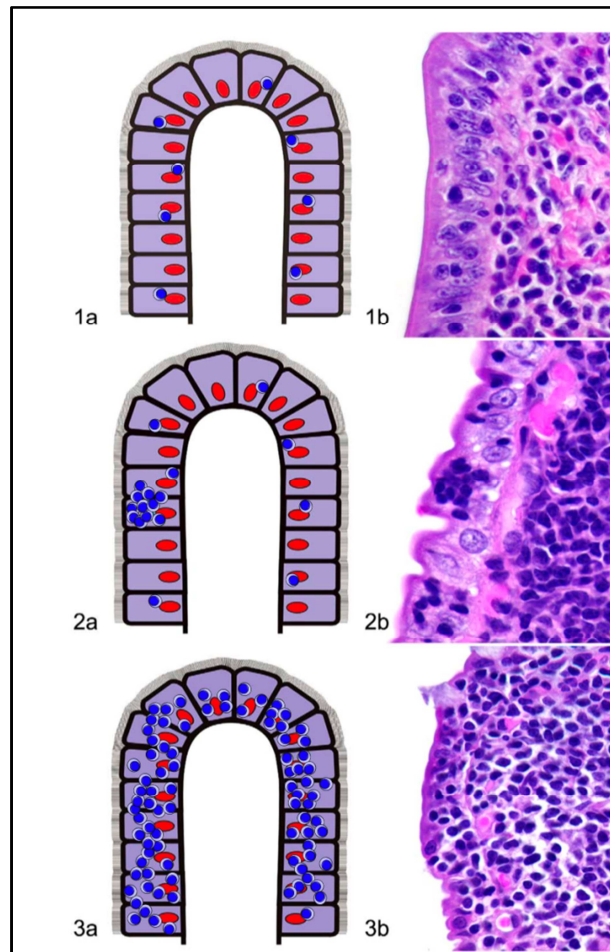
**Figure 9** : Caractéristiques histologiques du lymphome digestif de bas grade félin et de l'entéropathie lymphoplasmocytaire

Coloration Hématoxyline Éosine Safran (HES), grossissement x400.

A : LDBG : infiltrat dense et monomorphe de petits lymphocytes avec des atypies nucléaires discrètes ; quelques plasmocytes sont présents.

B : ELP : infiltrat moins dense de petits lymphocytes avec un noyau dense. (Crédits photos : service d'anatomopathologie de l'ENVT, Dr Maxence Delverdier©.)

L'épithéliotropisme est décrit comme étant plus important lors de LDBG que dans d'autres formes de lymphomes digestifs, d'ELP ou chez les chats sains<sup>43,47,69</sup>. L'épithéliotropisme se définit comme la présence de lymphocytes intra-épithéliaux T dans l'épithélium villositaire, en accord avec leur caractéristique de « Gut-homing »<sup>70</sup>. En particulier, l'épithéliotropisme rencontré lors de LDBG atteste de la présence de « nids » et de « plaques » de lymphocytes T (Figure 10). Un « nid épithélial » est défini par la présence d'au moins 5 petits lymphocytes accolés dans l'épithélium villositaire. Une « plaque épithéliale » se définit comme la présence d'au moins 5 cellules épithéliales adjacentes obscurcies par un infiltrat de petits lymphocytes<sup>38,43,47,68,70,71</sup>. Bien que l'épithéliotropisme soit en faveur du LDBG plutôt que de l'ELP, son absence ne peut en revanche être utilisée pour exclure un LDBG, n'étant pas observé chez tous les LDBG<sup>70,72,73 74</sup>



**Figure 10** : Nids et plaques intraépithéliaux fortement en faveur d'un lymphome digestif de bas grade D'après Kiupel *et al.*<sup>72</sup>. A gauche : dessin schématique. A droite : coloration HES.

1 : Lymphocytes intraépithéliaux solitaires

2 : Nids intraépithéliaux ( $\geq 5$  lymphocytes accolés)

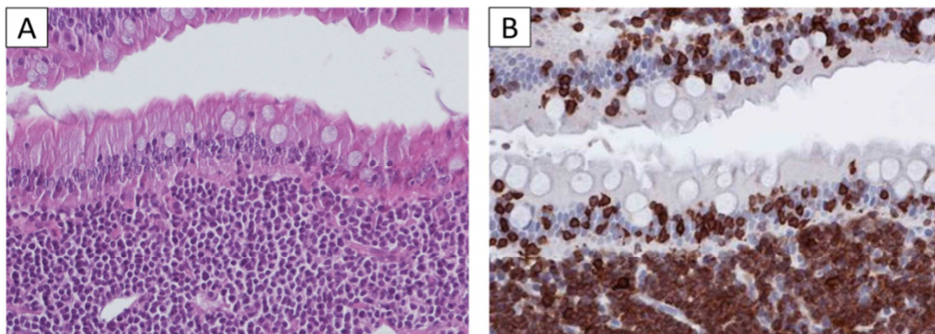
3 : Plaques intraépithéliales ( $\geq 5$  cellules épithéliales adjacentes obscurcies par un infiltrat de petits lymphocytes T)

Outre l'infiltration lymphocytaire et ses motifs, les autres lésions histologiques concomitantes dans les régions néoplasiques comprennent les micro-abcès lymphoïdes dans l'épithélium, une atrophie voire une fusion des villosités et/ou une infiltration plasmocytaire et éosinophilique de la *lamina propria*<sup>70</sup>.

### 1.2.5.2 Données immunohistochimiques

L'immunophénotypage à finalité diagnostique est bien moins répandu et extensif en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine, essentiellement pour des raisons financières. Cependant son utilisation est essentielle dans certains cas, comme pour le diagnostic de lymphome digestif versus ELP. Les limites de l'IHC sont principalement liées à la disponibilité des réactifs (issus de laboratoires de médecine humaine).

Les anticorps les plus utilisés dans le diagnostic du lymphome digestif et de l'ELP sont dirigés contre les épitopes CD3 $\epsilon$  pour détecter les lymphocytes T, couplés à des anticorps anti-CD79a et anti-CD20 pour détecter les lymphocytes B. Les autres anticorps couramment utilisés sont dirigés contre la protéine S100A9 des neutrophiles et macrophages (anticorps MAC387), contre le CD57 des lymphocytes Natural Killer et la protéine granzyme B des lymphocytes T cytotoxiques et Natural Killer. Les anticorps anti-CD4, anti-CD8 $\alpha$ , anti-CD8 $\beta$  sont pratiqués sur des coupes de tissu congelé et non des coupes incluses en paraffine. Enfin, le niveau de prolifération cellulaire peut être évalué par IHC en détectant l'expression de l'épitope Ki67<sup>69,70,72,73,75,76</sup>. Le LDBG est de phénotype T CD3 positif dans plus de 90 % des cas (Figure 11). Un phénotype B peut être observé dans environ 10 % des cas restants<sup>67,75,77</sup>.



**Figure 11** : Analyse histologique et immunohistochimique d'un LDBG.

A : Coloration hématoxyline-éosine-safran, x200.

B : Marquage anti-CD3, immunoperoxydase, x200.

Les deux images montrent une infiltration dense du chorion muqueux, composée de petits lymphocytes T CD3+ et de quelques plasmocytes. Un épithéliotropisme marqué est observé.

Crédit photographique : laboratoire d'anatomopathologie de l'ENVA©.

Ceci dit, certaines études ont montré que certains lymphomes T humains, canins et félins coexpriment des protéines de surfaces de lymphocytes B<sup>47,78-80</sup>. Des études complémentaires sont nécessaires afin de clarifier le phénotype du LDBG bien que le facteur limitant soit le nombre d'anticorps disponibles pour l'espèce féline.

### 1.2.5.3 Clonalité

La clonalité lymphoïde est de plus en plus utilisée en médecine vétérinaire en association avec les autres techniques de diagnostic (histologie, immunohistochimie) afin de différencier les proliférations lymphoïdes néoplasiques des proliférations inflammatoires et notamment les LDBG des ELP<sup>68,72,81</sup>.

La technique la plus couramment utilisée est la PARR (Polymerase Chain Reaction [PCR] to Assess Antigen Receptor Gene Rearrangements). Celle-ci est encore peu développée en France. Elle consiste en l'amplification d'une région génomique spécifique des lymphocytes codant pour les récepteurs aux antigènes : CDR3 pour le récepteur TCR des lymphocytes T et IGH pour le récepteur BCR des lymphocytes B. La taille de cette région amplifiée est variable après réarrangement des loci et spécifique d'une lignée lymphocytaire. Autrement dit, chaque lymphocyte est caractérisé par une taille unique de la région CDR3 ou IGH<sup>43,67,74,82</sup>. Historiquement, l'examen de clonalité était réalisé sur des coupes de tissu congelé. La PARR est maintenant réalisée sur les prélèvements déparaffinés. Le test de clonalité ne renseigne pas sur l'immunophénotype de la population lymphoïde mais permet uniquement la mise en évidence d'une population clonale (profil tumoral) ou polyclonale (profil réactionnel)<sup>81</sup>. La figure 12 illustre les différents profils de PARR décrits dans la littérature<sup>43,81</sup>.

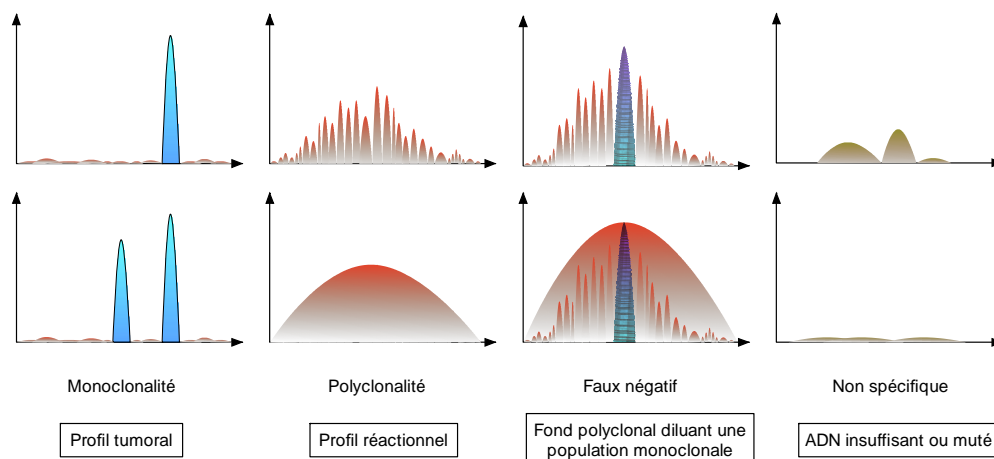


Figure 12 : Différents types de profils obtenus par PARR chez le chat



L'utilisation de la clonalité lymphoïde appliquée au LDBG félin est récente et a été rapportée pour la première fois par Moore *et al.* en 2005<sup>74</sup>. Dans la littérature, plus de 90 % des LDBG présentent un réarrangement clonal ou oligoclonal du gène TCR alors que les ELP présentent un réarrangement polyclonal<sup>68,74</sup>. De plus, la sensibilité et la spécificité de la PARR pour la détection du réarrangement du gène TCR félin est proche de 90 %<sup>43,68,74,83</sup>. Par conséquent, Sabbatini *et al.* recommandent dans leur étude la réalisation de la PARR sur les biopsies digestives afin d'augmenter la sensibilité au diagnostic de LDBG versus ELP<sup>39</sup>.

Les résultats de clonalité doivent être interprétés au regard des données cliniques, paracliniques, histologiques et immunophénotypiques afin de réduire les risques d'erreur de diagnostic. En effet, le résultat d'un test de clonalité ne permet en aucun cas de reclasser un chat d'une entité à l'autre.

#### 1.2.6 Physiopathologie : données actuelles

L'étiologie du LDBG est peu comprise. Plusieurs facteurs ont été décrits comme prédisposants aux lymphomes digestifs mais leur rôle reste discutable en ce qui concerne les LDBG<sup>46</sup>.

##### 1.2.6.1 Virus

Le rôle de certains virus, notamment des rétrovirus leucémogènes (virus de la leucose féline [FeLV] et virus de l'immunodéficience féline [FIV]) dans l'oncogenèse des lymphomes a été évoqué principalement pour les lymphomes T médiastinaux<sup>53,54,84</sup>.

##### a) Le virus leucémogène félin (FeLV)

Le FeLV infecte les tissus lymphoïdes, l'intestin et la moelle osseuse<sup>85</sup>. L'infection par le FeLV est suspectée être un facteur de risque majeur de développement des leucémies et lymphomes chez le chat, en particulier de lymphomes médiastinaux à lymphocytes T<sup>47</sup>. En effet, le FeLV est détecté par immunohistochimie (IHC) dans 50 à 70 % de l'ensemble des lymphomes félins. L'infection par le FeLV est, de plus, associée à un pronostic sombre pour tous les types de lymphomes<sup>42,43</sup>. Le mécanisme exact par lequel le FeLV favorise la transformation néoplasique n'est pas connu<sup>84</sup>. L'hypothèse actuelle est liée aux modalités de l'insertion virale qui modulerait l'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs.

Le rôle du FeLV dans l'oncogenèse des lymphomes digestifs reste flou et son identification au sein des lymphomes digestifs est variable. Les lymphomes, incluant le lymphome digestif, peuvent effectivement se développer sans exposition préalable au FeLV chez des chats de laboratoire dépourvus de pathogènes (pathogen-free cats)<sup>47,86</sup>. Au cours des 30 dernières années, une antigénémie FeLV positive a été observée dans 2,5 à 30 % des chats atteints de lymphomes digestifs alors que la plupart des lymphomes digestifs sont maintenant associés à une antigénémie FeLV négative<sup>43,87</sup>. Ce constat pourrait être en partie expliqué par la mise en place mondiale de vaccins et de tests FeLV qui ont permis de diminuer considérablement la prévalence du FeLV chez les chats<sup>54</sup>. Seulement 3 % des chats atteints de LD ont une immunohistochimie positive à un antigène du FeLV<sup>71</sup> alors que, selon une étude, des séquences pro-virales sont détectées sur des biopsies de tumeur fixées au formol et incluses en paraffine, dans plus de 33 % des lymphomes digestifs félines de type B et dans plus de 62,5 % des lymphomes digestifs félines de type T<sup>43,47</sup>. Ce résultat conforte l'hypothèse que le FeLV peut, dans certains cas, résider sous forme latente. A l'opposé, l'étude de Stützer *et al.* portant sur 32 lymphomes digestifs félines rapporte qu'aucune forme provirale du FeLV n'a été détectée chez les 30 chats ayant une antigénémie FeLV négative<sup>88</sup>. Les divergences entre les deux études pourraient être expliquées par la sensibilité différente des tests utilisés. Weiss *et al.* ont en effet utilisé un test PCR très sensible, ce qui pourrait expliquer la prévalence élevée de la détection provirale<sup>89</sup>. L'antigénémie FeLV positive est généralement observée en cas de lymphome digestif de haut grade mais il serait nécessaire de réévaluer sa prévalence lors de LDBG. Si le provirus se révélait être en cause, il est actuellement peu probable de le dépister à l'aide d'un test sérologique disponible pour les praticiens.

#### b) Le virus de l'immunodéficience féline (FIV)

Tout comme les virus de l'immunodéficience humaine (HIV) et simienne (SIV), le FIV pourrait jouer un rôle indirect dans l'oncogenèse par perte partielle de la capacité d'immunosuppression tumorale de l'organisme<sup>42,85</sup>. L'infection par le FIV est en particulier suspectée être un facteur de risque au développement de lymphomes et en particulier des lymphomes digestifs. Cependant, les données de la littérature à propos du FIV sont moins



nombreuses que pour le FeLV et seulement une faible proportion de chats atteints de lymphomes digestifs présente une sérologie positive pour le FIV<sup>90,91</sup>.

### c) L'Herpès virus félin

Un dernier virus évoqué dans les facteurs étiologiques est le Gammaherpèsvirus félin de type 1 (FcaGHV1 pour *Felis catus* gammaherpèsvirus 1). Ce virus est connu pour infecter au moins un quart des chats. Un rôle étiologique a été suggéré au regard de la détection de deux gammaherpèsvirus dans certains cas de cancers humains (lymphome de Burkitt associé à l'EBV et sarcome de Kaposi lié à HHV8). Cependant, dans l'étude de McLuckie *et al.*, la prévalence de l'infection à FcaGHV1, (évaluée soit par la détection d'ADN FcaGHV1, soit par la charge virale dans le sang) n'était pas significativement pas différente entre le groupe des chats avec lymphomes et le groupe des chats sains<sup>92</sup>. Cela dit, la présence d'ADN FcaGHV1 circulant était associée à une survie significativement plus courte<sup>92</sup>. Les critères de sélection de cette étude excluaient le LDBG : d'autres études sont nécessaires afin de caractériser l'association entre l'Herpès virus félin et le LDBG.

#### 1.2.6.2 Bactéries

Depuis deux décennies, la colonisation bactérienne de la muqueuse, et en particulier par *Helicobacter* spp, est suspectée être un facteur oncogénique dans les cancers gastriques félines par stimulation antigénique chronique. Dans l'étude de Bridgeford *et al.* incluant 47 lymphomes gastriques félines, la présence de souches gastriques d'*Helicobacter heilmannii* (Hhe) était significativement associée aux lymphomes lymphoblastiques gastriques en particulier pour les souches Hhe2 et Hhe4 (2/16 lymphomes à petits lymphocytes et 14/16 lymphomes à grands lymphocytes)<sup>93</sup>.

Hoehne *et al.* ont étudié l'association entre la présence d'un lymphome digestif félin et la présence d'une colonisation bactérienne de la muqueuse intestinale, sur des biopsies obtenues par endoscopie ou laparotomie exploratrice. Lors d'infiltration de l'intestin grêle, les auteurs ont identifié une colonisation bactérienne (souches non identifiées) de la muqueuse et de la séreuse plus importante pour les 17 lymphomes digestifs de haut grade (LDHG) (respectivement 82 % et 57 %) que pour les 33 lymphomes digestifs de bas grade (LDBG) (respectivement 18 % et 11 %). De plus, aucune bactérie n'a été observée dans la

lumière des vaisseaux sanguins de la muqueuse intestinale prélevée chez les chats atteints de LDBG alors que des bactéries intravasculaires ont été observées dans 29 % des LDHG. Pour certains auteurs, la colonisation bactérienne est donc un facteur de risque de lymphomes digestifs mais d'autres évoquent plutôt une colonisation bactérienne opportuniste secondaire à une altération de l'immunité muqueuse du tractus digestif<sup>94</sup>. Des études prospectives sont nécessaires afin d'identifier la permissivité de la muqueuse intestinale lymphomateuse aux colonisations bactériennes.

#### 1.2.6.3 *Dysbiose et lymphome digestif*

Le microbiote exerce plusieurs fonctions biologiques essentielles incluant la maturation du système immunitaire ainsi que la protection contre les pathogènes et joue également un rôle dans la digestion des aliments végétaux et dans de nombreux processus métaboliques<sup>97-99</sup>. Les connaissances sur l'homéostasie entre l'hôte et son microbiote résident font actuellement l'objet de très nombreuses recherches. Compte tenu des nombreuses publications faisant état d'un lien possible entre altérations du microbiote (dysbiose) et cancers chez l'homme mais aussi chez le chat<sup>172</sup>, quelques équipes se sont intéressées à ces aspects chez les chats atteints de lymphomes digestifs.

Une étude rétrospective récente<sup>104</sup> a inclus 14 chats avec ELP a et 14 chats présentant un LDBG. *Fusobacterium spp* et *Bacteroides spp* ont été identifiées par FISH en plus grand nombre dans le groupe LDBG que dans le groupe ELP. Cette étude présente néanmoins un certain nombre de limites. La méthode de prélèvement n'était en effet pas précisée et lors de doute sur le plan histologique et/ou immunohistochimique, les chats étaient reclassés d'une catégorie à l'autre uniquement sur la base du résultat du test de clonalité.

#### 1.2.6.4 *Inflammation chronique : un continuum ?*

Les entéropathies chroniques pourraient également être un facteur de risque de LDBG, en raison du fait qu'une entéropathie intestinale chronique concomitante a été décrite dans plusieurs de lymphomes digestifs. Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle les entéropathies chroniques peuvent précéder ou favoriser une néoplasie

digestive<sup>54,73,95</sup>. Cependant, à notre connaissance, aucune donnée concernant spécifiquement le LDBG n'a encore été publiée et aucun article ne démontre le développement d'un lymphome digestif consécutif à une inflammation chronique de l'intestin.

#### 1.2.6.5 Autres facteurs de risque

D'autres facteurs de risques ont été suggérés : des facteurs géographiques et environnementaux, des prédispositions génétiques, le tabagisme passif et le régime alimentaire<sup>38,43,47</sup>. Concernant le tabagisme passif, Bertone *et al.* ont observé que la durée d'exposition au tabagisme passif est corrélée linéairement au développement d'un lymphome digestif chez le chat (2,4 à 3,2 fois plus de risque)<sup>96</sup>. Le rôle du régime alimentaire dans l'oncogenèse des lymphomes digestifs félines reste très controversé tout comme chez l'homme. À ce jour, aucun résultat discriminant n'a été publié dans la littérature.

#### 1.2.7 Diagnostic différentiel

L'expression clinique des lymphomes digestifs est similaire à celle de nombreuses affections gastro-intestinales primaires ou secondaires (maladies endocriniennes dont l'hyperthyroïdie, insuffisance rénale). À l'échographie, les lymphadénomégalias mésentériques peuvent être observées dans la péritonite infectieuse féline, la yersiniose, la fibroplasie sclérosante éosinophilique féline. Les épaissements de la paroi digestive peuvent également être identifiés lors d'ELP ou lors d'entéropathie infectieuse.

Les entéropathies chroniques intestinales à composante mixte, lymphoplasmocytaire (ELP), ou éosinophilique représentent l'entité la plus complexe dans le diagnostic différentiel des LD, et notamment du LGBDG. L'ELP peut coexister avec les lymphomes digestifs et même pourrait, comme évoqué précédemment, initier le phénomène néoplasique<sup>38,43,47</sup>.

Le tableau 7 décrit les caractéristiques différentielles connues entre entéropathies chroniques intestinales et LDBG dans l'espèce féline.

		LDBG	Entéropathies chroniques intestinales
<b>Étiologie</b>		Inconnue à ce jour	Inconnue à ce jour
<b>Age</b>		Chats > 7-8 ans	Tout âge
<b>Race</b>		Aucune prédisposition raciale prouvée	Siamois et Persans supposés prédisposés
<b>Localisations digestives</b>		Toutes mais le jéjunum et l'iléon sont les locations les plus communes (90 %)	Toutes mais le duodénum et l'iléon sont les plus communes (70-90 %)
<b>Signes cliniques</b>		Amaigrissement, vomissements, anorexie, diarrhée, léthargie	Amaigrissement, vomissements, anorexie, diarrhée, léthargie
<b>Examen physique</b>		Normal +/- anses intestinales épaissies	Normal +/- anses intestinales épaissies, douleur abdominale crâniale (cholangite, pancréatite)
<b>Biomarqueurs</b>	<i>Albumine</i>	Diminuée (49 %)	Diminuée (77 %)
	<i>Cobalamine</i>	Diminuée (50-80 %)	Diminuée (18-47 %)
<b>Échographie</b>		Musculeuse souvent épaissie, mais possiblement normale Lymphadénomégalie mésentérique fréquente, masses intramurales exclues, stratification, architecture et motilité normales à diminuées	Musculeuse souvent épaissie surtout lors d'entérite éosinophilique et occasionnellement lors d'entérite lymphoplasmocytaire, Lymphadénomégalie mésentérique fréquente, masses intramurales très rares, stratification, architecture et motilité normales à diminuées
<b>Histologie et immunohistochimie</b>		Infiltration monomorphe diffuse par des petits lymphocytes T néoplasiques	Infiltration inflammatoire polymorphe par des lymphocytes, plasmocytes, neutrophiles, éosinophiles, macrophages.
<b>Test de clonalité</b>		Population théoriquement clonale de lymphocytes	Population théoriquement polyclonale de lymphocytes

**Tableau 7** : Comparaison étiologique, épidémiologique, et clinique entre les chats atteints de lymphome digestif de bas grade (LDBG) et d'entéropathies chroniques intestinales<sup>37-63</sup>.

### 1.2.8 Traitement

Le traitement actuellement préconisé est une chimiothérapie per os à jours alternés associant le chlorambucil et la prednisolone mais il n'existe actuellement pas de consensus et différents schémas thérapeutiques peuvent être proposés<sup>38,45,105</sup> (Tableau 8).

Etude (cas de LDBG)		Stein <i>et al</i> (28 chats)	Lingard <i>et al</i> (17 chats)	Kiselow <i>et al</i> (41 chats)
DIAGNOSTIC DU LDBG		HISTOLOGIE	HISTOLOGIE ET IMMUNOHISTOCHEMIE	HISTOLOGIE
Protocole	Prednisolone	1 à 2 mg/kg PO toutes les 24 h	3 mg/kg/j PO	5 mg/chat PO toutes les 12 à 24 h
	Chlorambucil	20 mg/m <sup>2</sup> PO toutes les 2 semaines	15 mg/m <sup>2</sup> PO toutes les 24 h, 4 jours consécutifs, toutes les 3 semaines	2 mg/chat PO toutes les 48 h
Taux de réponse globale		96 % (27/28)	76 % (13/17)	95 % (37/39)
Taux de rémission complète		NC	76 % (13/17)	56 % (22/39)
Temps médian de rémission pour les chats obtenant une réponse complète		786 jours	567 jours	897 jours

**Tableau 8** : Protocoles de chimiothérapie et leur efficacité jusqu'à rémission, associant le chlorambucil et la prednisolone pour le traitement du lymphome digestif de bas grade.  
PO : per os ; NC : non connu.

Aucune étude comparant les différents protocoles n'a été publiée. De même, aucune donnée n'est disponible sur la durée du traitement. Néanmoins, la chimiothérapie est rarement discontinuée. Dans une étude portant sur 56 cas de lymphomes à petites cellules (dont 37 lymphomes digestifs), les chats étaient traités avec des glucocorticoïdes et du chlorambucil et le traitement était arrêté après un an si une rémission clinique complète était observée<sup>173</sup>. La réintroduction du traitement comme chimiothérapie de sauvetage a montré des bénéfices similaires à l'absence d'arrêt du traitement et la médiane de survie des chats atteints de lymphomes digestifs était de 1148 jours<sup>65</sup>. Le choix du protocole résulte de l'expérience du clinicien et de la capacité des propriétaires à administrer le traitement à leur domicile : ainsi, pour un chat peu coopératif, une chimiothérapie pulsée sur 3 jours est préférable.

En cas d'absence de réponse à la première ligne de chimiothérapie, d'absence de rémission ou de progression, d'autres protocoles sont proposés : Cyclophosphamide et Prednisolone ; Cyclophosphamide, Vincristine et Prednisolone (protocole COP) +/- L-asparaginase et doxorubicine (protocole VELCAP-C) ; ou Lomustine par voie orale avec ou sans Prednisolone<sup>37,44</sup>. Enfin, des thérapies ciblées sont en cours d'évaluation, notamment

des inhibiteurs de tyrosine kinase (Masinitib, utilisation hors autorisation de mise sur le marché).

### 1.2.9 Pronostic

Les LDBG sont associés à un pronostic favorable (temps de survie médian de 19 à 29 mois)<sup>38,45,105</sup>. Néanmoins, la réponse initiale à la chimiothérapie conditionne le pronostic (Figure 13).

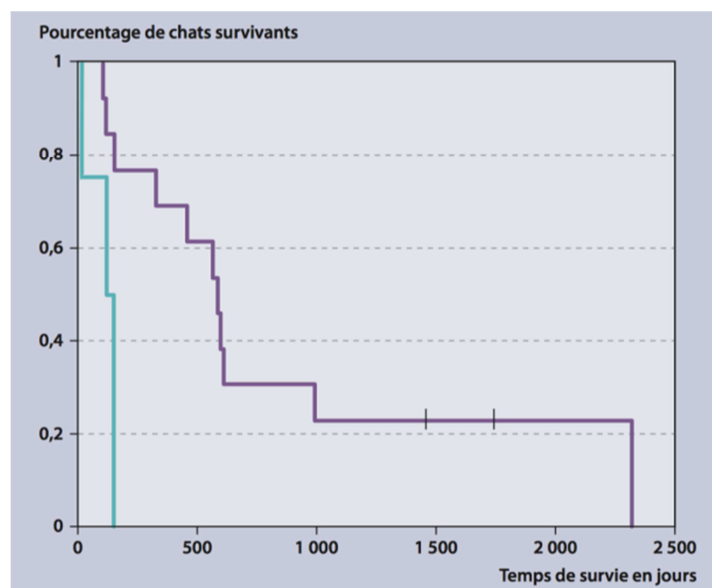


Figure 13 : Survie globale de chats atteints de LDBG en rémission complète ou partielle. Rémission complète : courbe violette (n=13). Rémission partielle : courbe verte (n=4). D'après Lingard et al.<sup>38</sup>

Aucune association n'a été observée entre la réponse au traitement et les facteurs suivants : âge, poids, sexe, durée des signes cliniques, présences de lésions extra-intestinales, hypoprotéinémie, hypocobalaminémie et hypofolatémie<sup>38,45,65,76,95</sup>.

De même, aucune description antérieure ne permet de savoir si un LDBG peut évoluer au long terme vers une forme plus agressive. En effet, les principales causes de décès rapportées dans les LDBG incluent les rechutes, les comorbidités, les difficultés d'observance et l'euthanasie demandée par le propriétaire.

### 1.2.10 Un modèle de lymphome digestif T humain ?

En raison de l'infiltration tumorale par une population monomorphe de petites cellules T et de l'épithéliotropisme, les LDBG ont tout d'abord été rapprochés de l'EATL de type II / MEITL.<sup>68</sup>

Néanmoins, en reprenant les données de la littérature, il nous est apparu que les LDBG présentaient plus de similitudes sur les plans phénotypique et clinique, avec les GI-TLPD qu'avec les MEITL<sup>48,51</sup> (Tableau 9 et revue en annexe). Ceci a également été rapporté par Wolfesberger *et al*<sup>48</sup>.

	LDBG félin	GI-TLPD humaine
<b>Épidémiologie</b>	Fréquent, prévalence en augmentation	Rare
<b>Histologie et immunophénotypage</b>	Infiltration de la <i>lamina propria</i> par une population monomorphe de lymphocytes T de petite taille	
	Fort épithéliotropisme	Degré variable d'épithéliotropisme
	Atrophie villositaire, hyperplasie des cryptes	Atrophie villositaire modérée, hyperplasie des cryptes, érythème de la muqueuse, ulcères
	CD3+	CD3+ CD4+ (fréquent) ou CD8+ ou CD4-/CD8- (rare) ou CD4+CD8+ (rare)
<b>Profil de clonalité</b>	Réarrangement clonal ou oligoclonal du TCRγ	
<b>Diagnostics différentiels principaux</b>	ELP	Maladie coeliaque réfractaire Entéropathie auto-immune
<b>Evolution</b>	Indolente	
	Survie médiane de 2 ans	Survie prolongée mais maladie persistante dans un délai médian de 5 ans après le diagnostic
<b>Traitement</b>	Pas de consensus	
	Chlorambucil / Corticoïdes	Stratégie "Watch and Wait" Agents immunosuppresseurs, anticorps monoclonaux anti CD52, chimiothérapie

Tableau 9 : Analyse comparative des LDBG félines et des GI-TLPD humaines

### 1.2.11 Synthèse

Le tableau 10 résume les points-clés caractérisant les lymphomes indolents de bas grade T félines.

Synthèse : Lymphome T de bas grade indolent de l'espèce féline
Le lymphome digestif félin est défini selon quatre entités d'agressivité croissante : les lymphomes digestifs de bas grade (LDBG : phénotype T, évolution indolente), de grade intermédiaire et de haut grade et le lymphome digestif à grands lymphocytes granuleux.
Le LDBG est une forme émergente et très fréquemment rencontrée. L'un des enjeux diagnostiques est de le différencier des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin du chat qui sont majoritairement des entéropathies à composante lymphoplasmocytaire (ELP) car leurs traitements et leurs pronostics sont très différents.
Un examen échographique normal ne permet en aucun cas d'écarter avec certitude la présence d'un LDBG dans l'espèce féline ni de différencier un LDBG d'une ELP.
Les cytoponctions échoguidées orientent le diagnostic lors de lymphome digestif intermédiaire, de haut grade ou à grands lymphocytes granuleux. En revanche, leur sensibilité est très faible lors de LDBG.
La localisation préférentielle des clones néoplasiques étant le jéjunum, les biopsies pleine épaisseur par laparotomie exploratrice sont privilégiées à l'endoscopie digestive.
<b>Par définition, le diagnostic d'un LDBG repose strictement sur la confrontation des données histologiques et immunohistochimiques.</b> Les caractérisations histologique et immunohistochimique sont actuellement très partielles et doivent faire l'objet d'une réévaluation exhaustive.
Le traitement actuellement recommandé du LDBG est une chimiothérapie administrée par voie orale, à jours alternés, associant le chlorambucil et la prednisolone. Le pronostic est favorable : temps de survie médian de 19 à 29 mois.
Les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, paracliniques, histologiques et immunohistochimiques du LDBG félin semble sont très proches de celles des lymphoproliférations indolentes du tractus gastro-intestinal de l'homme.

Tableau 10 : Synthèse des principales caractéristiques des LDBG



## 1.3 Intérêt des modèles animaux spontanés en médecine et en oncologie

### 1.3.1 Modèle murin

La variété et la complexité des cancers, ainsi que leur incidence élevée, rendent l'utilisation de modèles animaux incontournables : les objectifs généraux concernent aussi bien les interactions entre les gènes et les facteurs environnementaux, les mécanismes de croissance et de dissémination, le développement de stratégies préventives, diagnostiques et thérapeutiques (amélioration des moyens de détection, développement de nouveaux traitements, adaptation du traitement au phénotype précis des tumeurs)<sup>106,107</sup>.

L'espèce animale la plus couramment utilisée comme modèle en oncologie est la souris grise commune *Mus musculus*. Sa petite taille, sa grande fécondité et son coût de production et d'entretien relativement peu élevé en font un animal de choix pour les laboratoires. De plus, les études comparatives ont été valorisées par le développement de nombreuses souches consanguines permettant l'étude de lots d'animaux génétiquement très similaires. Enfin, le génome de la souris a été séquencé et de nombreux outils permettent de le manipuler, notamment par transgénèse ou mutagenèse ciblée. De nombreuses souches de souris sont utilisées en oncologie {souris immunocompétentes, immunodéprimées (Nude, SCID, NOD-SCID, NOG etc...)}

De premières limites au modèle murin sont que la souris ne présente pas un comportement normal en cage ou en laboratoire. De plus, elle a rarement la même sensibilité que l'homme aux médicaments ou aux rayonnements. Une autre limite est sa courte durée de vie qui fait qu'on ne peut tester sur elle les effets délétères de certaines molécules ou facteurs agissant sur le long ou très long terme. Les extrapolations de la souris à des organismes à durée de vie plus longue sont potentiellement sources de biais<sup>108,109</sup>. Les tumeurs se développent spontanément chez l'homme alors qu'elles doivent être induites chez la souris. Par ailleurs, les manipulations génétiques sur les modèles murins impliquent souvent un ou plusieurs gènes dans des conditions environnementales différentes qui, comme évoqué plus haut, vont affecter l'expression de gènes spécifiques chez des lignées de souris dont la pertinence n'est pas avérée chez l'homme. Aussi, l'instabilité génomique et l'hétérogénéité affectant à la fois les cellules néoplasiques et le microenvironnement tumoral ne sont pas reproductibles chez la souris.

### 1.3.2 Autres animaux de laboratoire

D'autres espèces sont utilisées de façon plus marginale en oncologie. Le rat est l'espèce la plus répandue après la souris, mais présente un certain nombre d'inconvénients par rapport à cette dernière (coût plus élevé, poids impliquant d'utiliser des doses de produits plus importantes, croissance tumorale moins rapide dans cette espèce). En revanche, il bénéficie d'une meilleure longévité ; son format optimise les prélèvements chirurgicaux et il présente une meilleure résistance aux traitements anticancéreux. D'autres espèces d'intérêt sont le hamster doré, le lapin et le poisson zèbre, le porc ou encore les primates<sup>110</sup>.

### 1.3.3 Modèles canin et félin

La recherche de modèles plus proches de la physiologie humaine et plus éthiques vis-à-vis de l'animal conduisent à étudier des tumeurs spontanées survenant chez l'animal de compagnie<sup>126</sup>. Si le chien a été mieux étudié, le chat, dont le génome a été annoté plus récemment<sup>129</sup>, a déjà fait l'objet de plusieurs publications confirmant la légitimité de ce modèle pour l'étude de maladies chroniques ou de néoplasies, comme cela sera développé plus loin<sup>111-113</sup>. En fonction de leur race et de leur format, les chiens et les chats connaissent un processus de vieillissement cinq à huit fois plus rapide que celui de l'homme. Par conséquent, l'échantillonnage et le suivi des maladies sont optimisés pour ces espèces, d'autant plus que les animaux de compagnie font l'objet d'une médicalisation de qualité et qui a été croissante au cours des 30 dernières années. Un grand nombre de cancers humains existent aussi chez les carnivores domestiques, du moins sous une forme assez proche. Les carnivores domestiques sont immunocompétents et font preuve d'une diversité génétique bien supérieure à celle des autres modèles animaux. A ce titre, leur étude en tant que modèles d'oncogénèse retranscrit plus précisément que pour bien d'autres modèles animaux le rôle du système immunitaire et celui du microenvironnement tumoral dans le processus du développement des tumeurs ainsi que de leurs métastases<sup>114,115</sup>.

### 1.3.3.1 Tumeurs spontanées chez le chat et le chien similaires aux cancers humains

#### a) Exemples de tumeurs chez le chien

Les similitudes biologiques entre les tumeurs humaines et canines sont souvent marquées. A titre d'exemple, l'ostéosarcome est plus représenté chez les mâles de grande taille, avec une localisation métaphysaire, un haut grade histologique de malignité dans plus de 90% des cas, et l'apparition de métastases dans plus de 80% des cas post-amputation avec une orientation pulmonaire préférentielle<sup>131-133</sup>. Le chien est aussi la seule autre espèce chez qui on observe des carcinomes prostatiques spontanés<sup>117</sup>. Le lymphome diffus à grandes cellules B est une lymphoprolifération qui prévaut chez les deux espèces. Il répond aux mêmes molécules thérapeutiques, soit le cyclophosphamide, la doxorubicine, la vincristine et la prednisone<sup>118-120,125</sup>. Le chien constitue aussi un modèle spontané d'intérêt en neuro-oncologie pour les tumeurs cérébrales (gliomes)<sup>120</sup>.

Les essais thérapeutiques montrent en outre que la réponse de la tumeur canine à une thérapie reflète fréquemment celle de la tumeur humaine correspondante. De plus, la réglementation de certains essais cliniques dans l'espèce canine est moins restrictive que chez l'homme<sup>120</sup>.

Si les similitudes entre cancers humains et cancers canins sont fréquentes, la physiologie des deux espèces n'est pas similaire et cela limite l'évaluation de certains traitements. Certains agents présentent une toxicité chez le chien qui est très supérieure à celle observée chez l'homme<sup>112</sup>. Enfin, les cancers les plus fréquents chez l'homme (sein, poumon, gastro-intestinaux ou prostate) sont moins fréquents chez le chien, suggérant que des études multicentriques et que des collaborations sur d'autres sujets en oncologie comparée seraient sans doute bénéfiques aux deux espèces<sup>117,118,121</sup>.

#### b) Le chat : un modèle animal d'intérêt

En tant qu'animal de compagnie, le chat a aussi été un modèle d'étude encore méconnu pour de nombreuses maladies non néoplasiques : le diabète de type 2<sup>123</sup>, la polykystose rénale à transmission autosomique dominante<sup>124</sup>, la rétinite pigmentaire<sup>127</sup>. Les chats sont aussi sensibles à un certain nombre de virus dont l'étude est bénéfique à l'homme. Ainsi, l'un des rétrovirus félines, le virus du FIV (Feline Immunodeficiency Virus) a servi de modèle au virus de l'immunodépression acquise de l'homme (AIDS)<sup>129,130</sup>. L'un des

coronavirus félins FeCoV est un modèle d'étude du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) et de la grippe aviaire<sup>131,132</sup>.

Ceci étant dit, le modèle félin peut être encore plus pertinent que le modèle canin pour certains cancers en raison de leur incidence : un exemple concerne le carcinome épidermoïde de la cavité buccale du chat. Cette tumeur comporte les mêmes caractéristiques que le cancer ORL « HHNC » (Human Head and Neck Cancer) de l'homme<sup>134</sup>. En outre, des mécanismes moléculaires communs ont pu être identifiés au sein des deux espèces : surexpression fréquente de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), altération de l'expression de p53, dysrégulation de l'expression de la protéine CK2, des marqueurs de l'angiogenèse, surexpression de la cyclooxygénase et de la lipoxycgénase. Enfin, deux autres modèles déjà validés sont les sarcomes post inflammatoire se développant sur les sites d'injection et les tumeurs mammaires<sup>135,136</sup>.

#### *1.3.3.2 Un environnement partagé avec l'homme*

La mise en évidence de facteurs de cancérogénèse environnementaux est optimisée par le fait que les animaux de compagnie partagent un environnement commun avec leurs propriétaires au quotidien, et ce, pendant plus de quatorze ans en moyenne. Le délai entre l'exposition à une substance cancérigène et le développement de tumeurs est également plus court chez le chien que chez l'humain, ce qui valide son intérêt en tant qu'animal sentinelle<sup>137,138</sup>. Ce rôle-clé des animaux de compagnie pour l'épidémiosurveillance chez l'homme a été souligné dans différentes études au cours des vingt dernières années. Ainsi, un diagnostic de mésothéliome chez un chien doit dicter une recherche environnementale d'amiante<sup>128</sup>. Un autre exemple documenté est celui de l'exposition aux herbicides et l'apparition de lymphomes<sup>139,140</sup>.

Les études épidémiologiques menées dans une population étendue d'animaux de compagnie et notamment chez le chien peuvent révéler un risque potentiel pour la santé publique. Cet enjeu majeur était déjà souligné par Kelsey *et al.* en 1998<sup>141</sup>.

### 1.3.3.3 Homologie génomique

Un défi pour les scientifiques est d'appréhender les bases génétiques des maladies complexes de l'homme<sup>142</sup>. L'historique du séquençage partiel ou total de l'ADN réalisé sur l'homme, les bactéries, le rat, la souris ou même les plantes a démontré que la majeure partie des fonctions biologiques étaient génétiquement conservées à la fois au sein des espèces et entre elles. Il est donc légitime de considérer que le séquençage du génome de mammifères proches de l'homme est susceptible d'optimiser la compréhension de la physiopathogénie des bases génétiques de certaines maladies chez l'homme. Le séquençage de nouvelle génération (NGS : Next Generation Sequencing) est une révolution biotechnologique de ces dernières années, en permettant de séquencer rapidement de grandes quantités d'ADN. Le séquençage du génome entier (WGS) peut aussi, en étant plus accessible financièrement, être appliqué aux carnivores domestiques. Deux publications parues dans la revue Nature en 2015 ont souligné l'intérêt du NGS chez les animaux de compagnie pour l'identification à la fois de nouvelles mutations mais aussi de voies thérapeutiques<sup>115,142</sup>. Les études génétiques menées jusqu'alors chez le chien et le chat ont concerné les maladies génétiques constitutionnelles. Le Golden Retriever a par exemple servi de modèle pour la myopathie de Duchêne<sup>143,144</sup>. Le projet « 99 Lives Cat Genome Sequencing Initiative » ([felinegenetics.missouri.edu/ninety-nine-lives](http://felinegenetics.missouri.edu/ninety-nine-lives)) a été initié par le Dr Leslie Lyons afin de standardiser la prise en charge médicale des chats domestiques aussi rigoureusement que celle qui est appliquée à l'homme. Son groupe de recherche a réalisé un séquençage whole génome (WGS) sur 3 chats présentant une amaurose congénitale de Leber's (LCA) et a permis d'identifier des variants causaux respectivement sur le gène *AIPL1*<sup>145</sup>. Les deux exemples précédents illustrent le fait que les analyses pangénomiques et/ou transcriptomiques sur des maladies spontanées présentées par les animaux de compagnie sont pertinentes, à la fois pour optimiser la compréhension de certaines maladies de l'homme, mais aussi pour identifier à terme de potentielles cibles thérapeutiques.

En oncologie, l'homologie génomique pour les oncogènes-clés est sans aucun doute bien supérieure pour le chien et le chat vis à vis de l'homme que le modèle murin. La plupart des gènes promoteurs de tumeurs préalablement identifiés chez l'homme ont été validés dans l'espèce canine pour de nombreux types de cancers<sup>122</sup> : lymphome<sup>146</sup>, carcinome

vésical<sup>147</sup>, leucémies aigue et chronique<sup>148</sup>, ostéosarcome<sup>121</sup> ou encore mélanome<sup>149</sup>. Ces données soulignent l'importance du séquençage génomique chez le chat et chez le chien a pour identifier de nouvelles mutations et donc de potentielle cibles thérapeutiques<sup>122</sup>.

Comme évoqué, le chat a fait l'objet d'un moins grand nombre d'études que le chien en raison de l'annotation plus tardive de son génôme<sup>170,171</sup>. Néanmoins, une forte homologie entre le chat et l'homme a déjà été démontrée pour certains gènes spécifiques<sup>116,126,135</sup>. Par conséquent, l'identification d'altérations génomiques chez les animaux de compagnie peut être mise en œuvre afin de cerner les mutations se produisant chez l'homme et de cibler des gènes « drivers » en cause dans l'oncogenèse<sup>150,151</sup>. En effet, l'identification de « drivers mutations » très probablement conservées entre les espèces (et directement en cause dans le processus d'oncogenèse en favorisant la croissance des cellules néoplasiques et en ayant été sélectionnées au cours de l'évolution de la maladie) sera possible. Ces dernières seront distinguées des « passager mutations » (sans effet sur le développement d'un clone) qui ont pour caractéristique de ne pas être conservées<sup>152</sup>.

#### *1.3.3.4 Développement de thérapies ciblées*

Comme cela a été évoqué plus haut, l'exploitation des maladies spontanées chez le chien et le chat en médecine comparée est susceptible de promouvoir l'émergence de nouveaux médicaments chez l'homme<sup>122</sup>. Les modèles animaux spontanés présentent un intérêt validé : en raison de la longévité des carnivores domestiques, la durée des essais cliniques est raccourcie, quasiment selon un rapport de 1 sur 7. Comme évoqué antérieurement, l'environnement commun de l'homme et de ses animaux de compagnie ainsi que la médicalisation croissante de ces derniers sont des facteurs qui promeuvent l'oncologie comparée<sup>150</sup>. Les modalités réglementaires qui régissent les essais cliniques et thérapeutiques chez l'homme sont très strictes et sont dictées par la FDA (Food & Drug Administration). En revanche, les contraintes sont moindres pour les essais cliniques en Phase I/II ou III chez le chien et le chat<sup>153</sup>. Le consentement éclairé peut être laissé à l'appréciation du propriétaire après validation de la saisine par le comité d'éthique de l'institution vétérinaire en charge du projet. De plus, plusieurs types de cancers en oncologie digestive n'ont pas l'objet d'aucun « Gold-standard » dans leur prise en charge. Par

conséquent, en cas d'insuccès des traitements habituellement instaurés pour un type de cancer, un essai thérapeutique novateur peut être proposé au propriétaire<sup>116,153</sup>.

Dans ce contexte, la stratégie de mise en œuvre de nouvelles thérapies est potentiellement appliquée sur des animaux dans une phase de la maladie moins tardive, par rapport à ce qui est proposé chez l'homme lors d'essai clinique. Hormis leur apport thérapeutique, les essais cliniques menés dans l'espèce canine ou dans l'espèce féline sont aussi une source d'information sur la cinétique de biomarqueurs d'intérêt et sur la tolérance à de nouveaux médicaments. Dans ce contexte, la nécessité d'un certain nombre d'études « preuve de concept » pourrait être moindre chez l'homme, représentant des économies en termes de temps et de coûts<sup>123,150</sup>.

Le Masinitib est probablement l'une des illustrations de thérapies ciblées des dernières années les plus convaincantes, issue d'une collaboration entre la médecine vétérinaire et la médecine humaine<sup>154</sup>. L'équipe du Professeur Olivier Hermine a été la première à prouver l'efficacité de ce pan-inhibiteur des tyrosines kinases (ITK) (Kit, PDGFR- $\alpha$ , ICK, Lyn, FGFR3) pour le traitement du mastocytome canin et de la dermatite atopique<sup>155,156</sup>. Ces données préliminaires et très prometteuses obtenues chez le chien ont permis la mise en œuvre d'essais cliniques chez l'homme dans plusieurs autres indications cancéreuses : leucémie myéloïde aigue, tumeurs stromales, cancer du pancréas, mastocytose systémique, cancer pulmonaire à petites cellules, mélanome, cancer de l'ovaire, myélome multiple, cancer de la prostate<sup>157,158,160</sup>. Cette molécule a également montré son efficacité dans des maladies non cancéreuses telles que la SLA<sup>159</sup>. A ce jour, le Masinitib est le seul médicament bénéficiant d'une AMM chez l'homme ayant d'abord été développé chez l'animal de compagnie.

#### 1.3.4 Synthèse

Le tableau 11 résume les points-clés caractérisant les modèles animaux, et particulièrement l'intérêt des animaux de compagnie en tant que modèles spontanés en oncologie.

##### Synthèse : Modèles animaux en oncologie

Le modèle murin est considéré comme le modèle de référence en recherche pour ses nombreux avantages : petite taille, grande fécondité et coût de production et d'entretien relativement peu élevés. De nombreuses souches de souris génétiquement modifiées sont disponibles en oncologie.

Les principales limites du modèle murin sont : la durée de vie de la souris, son environnement et sa sensibilité à de nombreux traitements qui sont très différents de ceux de l'homme. Les tumeurs doivent être induites chez la souris. L'instabilité génomique et l'hétérogénéité affectant à la fois les cellules néoplasiques et le microenvironnement tumoral ne sont pas reproductibles sur ce modèle.

La recherche de modèles plus proches de la physiologie humaine et plus éthiques vis-à-vis de l'animal conduisent à étudier des tumeurs spontanées survenant chez l'animal de compagnie. Beaucoup de cancers humains existent aussi chez les carnivores domestiques qui sont à la fois immunocompétents et font preuve d'une diversité génétique supérieure à celles des autres modèles animaux. Leur étude en tant que modèles d'oncogénèse retranscrit plus précisément le rôle du système immunitaire et celui du microenvironnement tumoral dans le processus du développement des tumeurs ainsi que de leurs métastases.

Le chien, dont le génome a été annoté antérieurement à celui du chat, a fait l'objet de plus d'études que ce dernier. De nombreux cancers sont communs au chien et à l'homme, même si leur incidence diffère.

Le chat est un modèle animal spontané dont l'intérêt en oncologie comparée est encore assez méconnu. Son apport a été néanmoins majeur pour l'étude des carcinomes épidermoïdes, du cancer HHNC de l'homme, de certains sarcomes et cancers du sein.

Il est légitime de considérer que le séquençage du génome de mammifères proches de l'homme comme le chat est susceptible d'optimiser la compréhension de la



physiopathogénie des bases génétiques de certaines maladies chez l'homme et de conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'intérêt majeur de la génomique comparative est l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques qui soient à long terme bénéfiques aux deux espèces. L'environnement commun de l'homme et de ses animaux de compagnie ainsi que la médicalisation croissante de ces derniers sont des facteurs qui promeuvent l'oncologie comparée. Enfin, la réglementation des études cliniques s'appliquant aux carnivores domestiques est moins stricte, permettant des essais dans des conditions médicales plus favorables que chez l'homme.

*Tableau 11* : Synthèse de l'intérêt et des limites des différents modèles animaux en oncologie

## 2 HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les GI-TLPD humaines sont des pathologies rares dont le diagnostic anatomopathologique n'est pas aisé et requiert une expertise histologique. Les mécanismes impliqués dans leur pathogenèse sont très mal connus. La plupart ces cas étant rétrospectifs, le matériel disponible est en effet le plus souvent fixé en formol et inclus en paraffine ce qui limite les explorations moléculaires approfondies. Sur le plan clinique, bien que ces maladies soient décrites comme indolentes dans la plupart des cas, quelques patients sont décédés d'une transformation en lymphome T agressif plusieurs années après le diagnostic. Enfin, les chimiothérapies conventionnelles ne sont pas associées à des réponses cliniques et histologiques durables tout en étant pourvoyeuses de toxicité. Au total, l'identification de marqueurs diagnostiques, pronostiques et théranostiques ainsi que la recherche de cibles thérapeutiques semblent cruciales pour pouvoir améliorer la prise en charge de ces patients. Or comme décrit précédemment, il existe une entité dans l'espèce féline, le LDBG, qui présente de nombreuses similitudes cliniques et phénotypiques avec les GI-TLPD et qui présente l'avantage d'être bien plus fréquente que sa contrepartie humaine.

Nous avons donc émis l'hypothèse que le LDBG représente un modèle animal spontané pertinent des GI-TLPD et qu'une caractérisation extensive des LDBG du chat serait bénéfique aux deux espèces. Notre projet est donc un travail de recherche en oncologie comparée qui s'inscrit au sein du concept « One-Health ».

L'objectif principal de cette thèse a été de caractériser extensivement les LDBG sur les plan clinique, histologique et moléculaire afin de valider le modèle félin spontané.

Une autre partie du travail, centrée uniquement sur l'espèce féline, a eu pour but d'identifier des marqueurs anatomopathologiques ainsi que des profils de microbiote intestinal discriminants pour le diagnostic différentiel LDBG / ELP chez le chat.

### 3 RESULTATS

#### 3.1 Article: Indolent T-cell Intestinal Lymphoproliferative Disorders: from domestic cat to human

Comme évoqué, les GI-TLPDs sont des entités très rares chez l'homme et restent encore mal caractérisées. Parallèlement, la lymphoprolifération émergente décrite chez le chat dans la partie précédente a fait preuve d'une constante augmentation au cours des 20 dernières années mais les données de la littérature spécifiques à cette entité sont manquantes ou incomplètes, en particulier sur le plan anatomopathologique et de clonalité. Dans ce travail, nous avons donc analysé de manière prospective les données cliniques, paracliniques, histologiques, immunohistochimiques et de clonalité d'une cohorte de 22 chats avec un LDBG.

A noter que l'acronyme anglo-saxon -non spécifique- utilisé jusqu'alors pour définir le LDBG était LGAL (Low-grade Alimentary Lymphoma). Dans cette publication, nous avons utilisé l'acronyme suivant : T-LGIL (T-Low-grade Intestinal Lymphoma).

##### 3.1.1 Constitution de la cohorte

L'étude prospective, validée par le comité d'éthique de l'Ecole nationale Vétérinaire d'Alfort (Comerc n°2017-05-09), s'est déroulée entre le 1<sup>er</sup> juillet 2016 et le 1<sup>er</sup> juillet 2018. L'ensemble des cas sont issus des consultations de médecine générale et de médecine interne réalisées au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Alfort (CHUVA). En premier lieu, les chats inclus dans l'étude présentaient des caractéristiques épidémiologiques, cliniques, de laboratoire et échographiques, compatibles avec un LDBG. Ces animaux ont fait l'objet d'une démarche diagnostique prospective répondant aux bonnes pratiques médicales afin d'établir un diagnostic. Des biopsies de pleine épaisseur ont été réalisées par laparotomie exploratrice (tractus digestif +/- foie, +/- pancréas et NL mésentériques) ou par endoscopie digestive dans les rares cas où les propriétaires ont refusé la laparotomie. Un consentement éclairé autorisant ces investigations a été remis par les propriétaires. Un suivi clinique et thérapeutique a été instauré, avec réalisation de bilans sanguins et de contrôles échographiques, répétés pour l'ensemble de la cohorte.

Au total, 22 cas présentant un LDBG ont pu être inclus en deux ans. Ceci dit, le nombre de cas identifié a été supérieur. En effet, pour des motifs de contraintes financières et éthiques, certains propriétaires ont décliné les investigations.

### 3.1.2 Caractérisation clinique et paraclinique

Dans notre étude, nous avons retrouvé les principales caractéristiques cliniques et paracliniques décrites dans le LDBG. En effet, il s'agissait de chats âgés présentant des signes digestifs aspécifiques avec une durée médiane d'évolution supérieure à un an. Le signe biologique le plus fréquemment observé était une hypcobalaminémie. L'échographie montrait un épaissement de la musculature digestive chez tous les chats et 75% d'entre eux avaient également un ganglion jéjunal augmenté de volume.

La survie globale médiane des chats avec LDBG était de 324 jours, confirmant le caractère indolent de cette pathologie.

### 3.1.3 Nouvelle caractérisation histologique

La caractérisation histologique et immunohistochimique des lésions a été effectuée selon les critères respectifs des classifications WHO des tumeurs lymphoïdes de l'homme et du chat. Les échantillons tumoraux de LGAL-T ont été revus à la fois par une anatomopathologiste experte des lymphoproliférations digestives humaines (Dr Julie Bruneau, hôpital Necker) et par une anatomopathologiste vétérinaire experte des pathologies digestives félines (Dr Nathalie Cordonnier, CHUVA) afin de comparer les deux pathologies et de confirmer leurs potentielles similitudes. La communauté de classification histologique des lymphomes digestifs de l'homme et de l'espèce féline nous a permis d'élaborer une grille de lecture histologique enrichie, comportant de nouveaux critères. La lecture a été réalisée à l'aveugle : l'anatomopathologiste de l'hôpital Necker ne connaissait ni l'histoire de l'animal ni les précédents diagnostics établis par son confrère vétérinaire au moment de la lecture initiale réalisée à l'ENVA.

La synthèse de ces résultats définit les caractéristiques histologiques du LDBG félin :

- Tapis cellulaire -souvent dense- de petits lymphocytes monomorphes infiltrant à la fois l'épithélium et la *lamina propria*
- Épithéliotropisme marqué mais variable
- Motifs épithéliaux spécifiques : présence de « nids » et de « plaques » de lymphocytes comme cela a été rapporté par Kiupel *et al*<sup>72</sup>.
- Atrophie villositaire d'intensité variable
- Lésions de cryptite lymphocytaire
- Gradient apico-basilaire dans 41% des cas
- Infiltration de la paroi digestive de profondeur variable pouvant être trans-pariétale

#### 3.1.4 Caractéristiques immunohistochimiques et activation de la voie STAT5

Pour cette analyse, une approche novatrice, plus précise car semi quantitative, a été proposée en différenciant l'infiltrat de l'épithélium de celui de la *lamina propria*.

Conformément à ce qui était attendu, l'expression massive de CD3 a été observée tant au niveau épithélial qu'au sein de la *lamina propria*. La médiane d'expression de l'épitope Ki-67, marqueur de prolifération, était de 30% dans la *lamina propria* (30%) et de 20% dans l'épithélium, des valeurs compatibles avec une prolifération cellulaire d'évolution indolente.

Outre ces anticorps qui sont déjà réalisés en pratique courante chez le chat, nous avons complété l'analyse par la réalisation d'un panel plus large comportant en particulier un anti-CD56, un anti-phospho STAT3 et un anti-phospho STAT5. Ce type d'étude n'avait jusqu'alors jamais été réalisée chez les chats atteints de LDBG.

L'expression du CD56 a été évaluée grâce à un anticorps humain qui croisait avec l'espèce féline. Nous avons souhaité analyser le CD56 car le LDBG félin avait été considéré, dans plusieurs publications antérieures, comme un modèle pertinent pour le MEITL, dont les cellules tumorales expriment majoritairement le CD56. Il s'avère que le CD56 est négatif chez la majorité des chats (19/20) atteints de LDBG.

Par ailleurs, une étude récente avait montré que 80% des cas de GI-TLPD CD4+ présentaient une fusion *STAT3-JAK2* et que celle-ci était associée à une phosphorylation de STAT5 dans 75% des cas<sup>20</sup>. Dans notre série, les cellules tumorales de LDBG sont positives

pour phospho STAT5 et négatives pour phosphoSTAT3 dans 100% des cas. Ces données suggèrent que l'activation de la voie STAT5, plutôt que celle de STAT3, pourrait jouer un rôle clé dans la pathogenèse des lymphoproliférations T digestives indolentes.

### 3.1.5 Données de clonalité

Les résultats de clonalité sont présentés dans le tableau 12.

Profil de clonalité	LDBG
Monoclonaux	19/22 (86 %)
Monoclonaux sur fond polyclonal	0/22 (0 %)
Oligoclonaux	0/22 (0 %)
Polyclonaux avec clones mineurs	1/22 (5 %)
Polyclonaux	2/22 (9 %)

Tableau 12 : Résultats de clonalité des chats atteints de LDBG.

Dans cette étude, si 86% des lymphomes présentent un profil monoclonal, 14 % des LDBG affichent un réarrangement polyclonal du TCR. Cette observation pourrait s'expliquer soit par la présence d'un infiltrat inflammatoire venant masquer la population clonale de lymphocytes T néoplasiques, soit par une infiltration tumorale peu importante, en particulier dans le cadre de lésions à types de « nids » ou de « plaques ».

### 3.1.6 Un continuum histologique entre entéropathie inflammatoire et lymphome ?

Plusieurs arguments émergeant des premières données de cette étude suggèrent un continuum entre une entité de nature inflammatoire et l'émergence de clones lymphomateux au sein de l'épithélium :

- La durée d'évolution des signes cliniques des chats présentés en consultation est importante lors du diagnostic de lymphome de bas grade par rapport aux chats qui présentent une entéropathie inflammatoire.
- L'identification de lésions de cryptite neutrophilique dans 14% des cas de LDBG et la possibilité de co existence d'un infiltrat à composante mixte lors du diagnostic.

- La présence d'un gradient lymphocytaire apico-basilaire évocatrice d'une stimulation antigénique chronique
- La présence dans certains cas, de plaques lymphocytaires focales évocatrices de lymphomes émergents au sein d'une muqueuse encore globalement peu infiltrée
- L'absence de monoclonalité observée pour un certain nombre de lymphomes.

### 3.1.7 Le LDBG : un modèle félin de GI-TLPD

Cette étude a permis de mettre en évidence de nombreuses similitudes cliniques, histologiques et immunohistochimiques entre Tc-LGIL et GI-TLPD. Ainsi l'entité féline semble définir un modèle de lymphomagenèse pertinent pour caractériser, à terme, les lymphoproliférations-T indolentes du tractus digestif de l'homme (GI-TLPD).

## **Indolent T-cell intestinal lymphoproliferative disorders: from domestic cat to human patient**

Valérie Freiche<sup>1§</sup>, Nathalie Cordonnier<sup>2</sup>, Mathieu Victor Paulin<sup>3</sup>, Hélène Huet<sup>2</sup>,  
Maria Elena Turba<sup>4</sup>, Elizabeth Macintyre<sup>5</sup>, Georgia Malamut<sup>6</sup>, Nadine Cerf-Bensussan<sup>7</sup>, Thierry  
Jo Molina<sup>8</sup>, Olivier Hermine<sup>9</sup>, Julie Bruneau<sup>8\*</sup> and Lucile Couronné<sup>10\*</sup>

§corresponding author, \*equal contribution.



Title Page

Title: Indolent T-cell Intestinal Lymphoproliferative Disorders: From domestic cat to human patient

Short Title: Indolent Intestinal Lymphoma in Human and Cat

Authors:

<sup>1</sup>École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Internal Medicine Department, 7 Avenue du Général de Gaulle, Maisons Alfort F-94700, France

<sup>§</sup>Corresponding author: [valerie.freiche@vet-alfort.fr](mailto:valerie.freiche@vet-alfort.fr)

<sup>2</sup>Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Biopôle Alfort, secteur anatomie pathologique, Maisons-Alfort, F-94700, France

Email: [nathalie.cordonnier@vet-alfort.fr](mailto:nathalie.cordonnier@vet-alfort.fr)

Email: [helene.huet@vet-alfort.fr](mailto:helene.huet@vet-alfort.fr)

<sup>3</sup> École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 Avenue du Général de Gaulle, Maisons Alfort F-94700, France

Email: [mathieuvictor.paulin@gmail.com](mailto:mathieuvictor.paulin@gmail.com)

<sup>4</sup>Laboratorio Genefast, Forli. Italy

Email: [me.turba@genefast.com](mailto:me.turba@genefast.com)

<sup>5</sup>Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, Paris, France; Laboratory Hematology, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France; INSERM UMR1151 and Institut Necker-Enfants Malades, Paris, France; Centre national Expert des Lymphomes Associés à la maladie Cœliaque, , Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France

Email: elizabeth.macintyre@aphp.fr.

<sup>6</sup>Gastroenterology Department, Hôpital Cochin Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (APHP), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France ; INSERM UMR 1163 Institut Imagine, Paris, France

Email: georgia.malamut@aphp.fr

<sup>7</sup>UMR 1163, Laboratory of Intestinal Immunity, INSERM, Paris, France, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité and Institut Imagine, Paris, France

Email: nadine.cerf-bensussan@inserm.fr

<sup>8</sup>Pathology Department, Hôpital Universitaire Necker - Enfants Malades, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (APHP), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France ; INSERM U1163, Institut Imagine, Paris, France

Email: thierry.molina@aphp.fr

Email: julie.bruneau@aphp.fr

<sup>9</sup>Hematology Department, Hôpital Universitaire Necker - Enfants Malades, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (APHP) ; Université de Paris, Paris France ; INSERM U1163, Institut Imagine, Paris, France

Email: ohermine@gmail.com

<sup>10</sup>Cytogenetics Department, Hôpital Universitaire Necker - Enfants Malades, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (APHP), Université de Paris, Paris France ; INSERM U1163, Institut Imagine, Paris, France

Email: lucile.couronne@aphp.fr

Grant support: NA.

***Abbreviations used in this paper:***

CBC: complete blood count

CR: Complete response

EATL: enteropathy-associated T-cell lymphoma

ENVA: École Nationale Vétérinaire d'Alfort

f-PL: Feline specific pancreatic lipase

GI-TLPD: Gastrointestinal T-cell lymphoproliferative disorders

IgA: immunoglobulin A

IHC: Immunohistochemistry

LP: *Lamina propria*

MEITL: Monomorphic epitheliotropic T-cell lymphoma

NHL: non-Hodgkin lymphoma

NR: No response

OS: Overall Survival Time

PCR: Polymerase Chain Reaction

SID: once a day

T4T: total serum thyroxinemia

TCR: T-cell Receptor

T-LGIL: T-cell low-grade intestinal lymphoma.

WHO: World Health Organization

Correspondence: Valérie Freiche. Ecole Nationale vétérinaire d'Alfort, Internal Medicine  
Department, 7 avenue du Général de Gaulle, Maisons Alfort F-94700, France

Email: valerie.freiche@vet-alfort.fr

Mobile phone: +33 6 60 24 0000

Disclosures: The authors have no conflict of interest to disclose.

Writing Assistance: N.A

Author contributions: VF, LC, JB and OH initiated, designed and supervised the study. VF included patients, collected clinical and paraclinical data and assisted surgeons for intestinal biopsies. JB, HH and NC conducted histopathological analyses. MET performed clonality analysis. JB, TM, MET, EM, HH and NC interpreted histology, immunohistochemistry and clonality data. VF, MP, HH, LC, JB and NC analyzed the data and drafted the manuscript. VF,

LC, HH, MP, GM, TM, NCB, MET, EM, NC, OH and JB reviewed the all manuscript. All the authors read and approved the final version.

Acknowledgments: The authors thank the Surgery Department of Alfort Veterinary School Hospital (Maisons-Alfort, France) for its contribution in surgery procedures, Dr Jeremy Beguin for his contribution in previous clinical data collection, Pr Maxence Delverdier and Dr Marie Odile Semin for the preliminary histopathological analysis.

## **ABSTRACT:**

**BACKGROUND & AIMS:** Indolent T-cell lymphoproliferative disorder (LPD) of the GI tract (GI-TLPD) is a rare and poorly described human primary gastrointestinal T cell lymphoma recently included in the 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. T-cell low-grade intestinal lymphoma (T-LGIL) is an emerging disease in the domestic cat, showing similar features with human GI-TLPD. This prospective study aims to extensively characterize the feline T-cell low-grade intestinal lymphoma to validate a suitable model for the human condition.

**METHODS:** We prospectively analysed clinical, paraclinical data and full thickness small intestinal biopsies from 22 domestic cats diagnosed with a T-LGIL. Extensive histopathological and molecular study with T-cell receptor  $\gamma$  clonality analysis was performed on all samples.

**RESULTS:** T-LGIL affects ageing cats presenting with non-specific digestive symptoms. Hypocobalaminemia was the most prominent biological sign. Median survival was 324 days, confirming the overall indolent outcome of the disease. T-LGIL was mainly located to jejunum (82%). Small intestinal *lamina propria* was diffusely infiltrated by CD3+ small T-cell lymphocytes with heterogeneous expression profile of CD4 and CD8 (CD4+ CD8- (36%), CD4- CD8+ (27%) and CD4- CD8- (36%)). Most of T-LGIL were CD56- and all were PhosphoStat3- and PhosphoStat5+. Intraepithelial lymphocytes (IEL) were increased in all cases. Ki67 was expressed in lamina propria lymphocytes and IEL at a low level (30% and 20% respectively). T-cell monoclonality was found in 86% of cases.

CONCLUSION: Feline T-LGIL shares clinical and histopathological features with the human GI-TLPD. Due to its emerging character, exploring feline T-LGIL may constitute a suitable and relevant approach to explore and understand the human disease.

**Keywords:** low-grade alimentary lymphoma, human gastrointestinal lymphoproliferative disorder, feline, histology, immunohistochemistry, clonality.

## INTRODUCTION

Primary lymphoma of the gastrointestinal tract represents the largest group among all primary extranodal non-Hodgkin lymphomas (NHL) with more than 85% of cases of B cell origin. T cell primary gastrointestinal lymphoma is a rare entity, accounting for less than 5% of NHL.<sup>1</sup> Among primary intestinal T and NK cell lymphomas, the 2016 revised World Health Organization (WHO) classification of lymphoma has described three distinct entities.<sup>2</sup> The first two, enteropathy-associated T-cell lymphoma (EATL) mainly associated with coeliac disease and monomorphic epitheliotropic T-cell lymphoma (MEITL) mostly diagnosed in Asia, have a dismal prognosis<sup>3</sup>. In contrast, the third subset, indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract (GI-TLPD), first described by Carbonnel *et al.* in 1994<sup>4</sup>, is characterized by a quite indolent clinical course. Over the 20 last years, limited series and case reports have enabled a better characterization of the disease in terms of clinical presentation, histopathology, immunohistochemistry and clonality features<sup>1,5-7</sup>. However, due to its rarity, this disease is often misdiagnosed. In addition, there is currently no consensus regarding therapeutic management in terms of efficacy and toxicity. Consequently, the majority of GI-TLPD patients still show persistent clinical signs and poor quality of life<sup>6,7</sup>. Meanwhile, an emerging GI lymphoma subtype affecting the ageing domestic cat, named feline T-cell low grade intestinal lymphoma (T-LGIL), has been reported by the veterinary community over the past two decades, becoming the first digestive neoplasia in this species<sup>8</sup>. T-LGIL was first compared to MEITL due to its diffuse infiltration of the *lamina propria* and epithelium by monomorphic medium size neoplastic T cells.<sup>9</sup> However, clinical, paraclinical, histologic and immunohistochemistry features show strong similarities rather with GI-TLPD. As a result, T-LGIL was cited as a relevant model for human GI-TLPD in two recent publications<sup>8,10</sup>. Little is known concerning the mechanisms underlying the pathogenesis of indolent T-LPD in both



species. The aim of this prospective study was to extensively define the feline T-LGIL entity at the clinical, paraclinical, histological and molecular levels in order to validate a suitable model and hence, to better understand the human disease.

## **MATERIALS & METHODS**

### ***Cats recruitment***

This prospective study was validated by Alfort Vet School Ethical Committee (COMERC n°2017-05-09). Between July 2016 and July 2018, 22 cats referred to the gastroenterology consultation of the Small Animal Hospital of Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA-Maisons-Alfort, France) and diagnosed with a T-LGIL were prospectively included. Diagnosis of T-LGIL was established according to the 2016 WHO revised classification of lymphoma and after extensive immunohistopathological characterization.

### ***Collection of clinical and paraclinical data***

Standardized clinical data including age, sex, weight, duration and nature of clinical signs, abdominal palpation, environmental factors and diet history, were collected by the same senior clinician. Blood tests included complete blood count (CBC), broad biochemistry panel, total thyroxinemia (T4T), specific feline pancreatic lipase (f-PL) and cobalamin (vitamin B12) dosages. Major parameters reference values are detailed in Supplemental Table 1. Abdominal ultrasound was performed prior to surgical full-thickness intestinal biopsies for each individual in order to measure digestive segments and lymph nodes and to rule out any other comorbidities and/or digestive neoplasia. As feline T-LGIL affects more frequently the jejunum and/or the ileum, laparotomy procedure was preferred in most cats (21/22) to endoscopy to obtain full-thickness samples of the digestive tract and regional lymph nodes. In one case,

biopsies were performed by endoscopy because surgery procedure was declined by the owners.

### ***Histopathology***

Tissue sections stained with Hematoxylin & Eosin (HE) and Masson's trichrome were blindly reviewed by board-certified veterinary and human pathologists. As human and veterinarian classification systems are mainly overlapping, samples were classified according to criteria established from human revised 2016 WHO classification of lymphoma<sup>2</sup>, WHO classification of canine lymphoma<sup>11</sup> and from the "Pathology of Domestic Animals" textbook, without knowledge of the clinical history. More specifically, the following criteria were assessed: topography of the cellular infiltrate (epithelium, lamina propria, submucosa, muscularis propria or serosa), cytological features, cellularity gradient, villous atrophy, crypt hyperplasia, epithelial apoptosis in the crypt, lymphocytic cryptitis, crypt abscesses and lamina propria fibrosis. Heterogeneous repartition of lymphocytes was defined by the presence of "patchy lesions" within the *lamina propria*.

### ***Immunohistochemistry (IHC)***

IHC analysis was blindly reviewed by veterinary and human pathologists. Expression of each cluster of differentiation was independently eyeballing assessed by both pathologists on formalin- fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections. Sections from each sample were labelled with a panel of antibodies targeting CD3 (1:20 dilution, F7.2.38, DakoCytomation) for identification of T-cell lineage, CD20 (1:400 dilution, RB-9013-P1c , Lab Vision Corporation) for identification of B-cell lineage, myeloid/histiocyte antigen (1:200 dilution, MAC387, DakoCytomation) for macrophages, CD56 (ready-to-use, CD56 Novocastra), pSTAT3<sup>Y705</sup> (1:100

dilution, D3A7, Cell Signaling) and pSTAT5<sup>Y694/699</sup> (1:100 dilution, polyclonal antibody, Biorbyt) to evaluate STAT3/STAT5 pathway activation and ultimately Ki67 (1:75 dilution, MIB-1, DakoCytomation) to assess proliferative index activity. Expression of CD4 and CD8 was evaluated on frozen biopsies in 11 cats using an anti-CD4 (1:200 dilution, 3-4F4, Southern Biotech) and anti-CD8 (1:200 dilution, fCD8 (FT2), Southern Biotech) antibodies. In case of heterogeneous repartition of the neoplastic population, quantification was performed in the most infiltrated areas. Immunohistochemistry approach consisted in a separate semi quantitative assessment of epithelial and *lamina propria* compartments (Supplemental Figure 1). Discordant cases were resolved by a consensus review at a multiheaded microscope.

### ***Clonality analysis***

Molecular detection of clonal T-cell receptor (TCR $\gamma$ ) chain gene rearrangement was performed on DNA extracted from intestinal frozen biopsy samples or from FFPE tissue slides by multiplex polymerase chain reaction (PCR) as previously reported<sup>12</sup> in Genefast Laboratori (Forlì, Italy). Results were reviewed by both experts in human and veterinary clonality. Rearrangement was defined as monoclonal when only one peak was detected and polyclonal when no peaks or more than  $\geq 4$  peaks were detected. Moreover, TCR $\gamma$  clonality analysis was performed on extracted peripheral blood DNA in 14/22 cases.

### ***Treatment***

As previously published<sup>13</sup> and considering the treatment compliance in cats, the following chemotherapeutic protocol combining two drugs was conducted: high-dose pulse chlorambucil administration (15mg/m<sup>2</sup> given orally SID, every 3 weeks for 4 consecutive days) and prednisolone (3 mg/kg given orally SID, tapering dose to 1 mg/kg orally once CR was

achieved). This therapeutic scheme was supposed to be continued if no adverse effect was recorded.

### ***Response criteria***

Therapy response assessment consisted in complete response, stable disease or progressive disease during follow-up. According to the “2016 AAHA Oncology Guidelines for dogs and cats’ criteria”<sup>14</sup>, complete response was characterized by a complete regression of all evidence of disease, including normal-size abdominal lymph nodes. Stable T-LGIL was defined as a change of lesion size ranging from an increase of <20% to a decrease of <30%. Despite no guidelines were already established concerning digestive lymphomas, particularly indolent diffuse intestinal diseases, progressive T-LGIL disease was defined as increasing cancer in extent or severity, i.e. clinical signs persistence or > 20% increase in jejunal lymph node thickness or intestinal thickening measurement.

### ***Statistical Analysis***

The progression free survival (PFS) was calculated from the first day of diagnosis until disease progression, death or final follow-up. Overall survival (OS) was calculated from the first day of treatment until death from any cause or final follow-up. Non-relapse mortality (NRM) was defined as death from any cause without disease relapse. Survival curves were computed by the Kaplan-Meier method. Statistical analysis and graphs were produced using GraphPad PRISM 8<sup>®</sup> software version 8.1.1 (San Diego, CA).

## RESULTS

### *Epidemiology*

Eighteen out of the 22 cats were Domestic Shorthair (82%). Sixteen were male (73%) and 6 were female (27%). All were spayed or castrated. Ten of the 22 cats (45%) were indoor animals. Median age and weight at presentation were respectively 13 years [range: 8-16] and 4.0 kg [range: 2.2 – 7.4]. All were fed with commercial diet. Detailed results of epidemiological data are presented in Supplemental Table 2.

### *Clinical features*

Median duration of clinical signs at presentation was 365 days [range: 62-1460]. Main clinical signs included weight loss (77%), vomiting (68%) and small intestinal diarrhea (64%). Modified abdominal palpation was noted for 73% of the cases by the clinician mostly characterized by a thickening of the intestinal loops without any mass identification. Detailed results of clinical data are presented in Supplemental Table 3.

### *Biological features*

Elevated feline specific pancreatic lipase (f-PL) ( $> 5,3 \mu\text{g/L}$ ) suggesting a concomitant pancreatitis was observed in 6/19 cases (32%). One cat displayed hyperthyroidism. Modified hepatic enzymes profile was rare (14%). Mild hypoalbuminemia was recorded in 3 cases (14%), while elevated creatinine level ( $\geq 18\text{mg/L}$ ) was present in 4/22 cases (18%). Hypocobalaminemia ( $< 200 \text{pg/ml}$ ) was detected in 12/21 cats (57%). Anemia was observed in only 4/22 cats (18%). Six out of 22 cats (27%) had mild to moderate leukocytosis, mostly due to neutrophilia while 8/22 cats (36%) showed a moderate lymphopenia.

Detailed results of biological data are presented in Supplemental Tables 4 and 5.

### ***Ultrasonographic results***

Main ultrasonographic features included a thickened muscularis propria layer in all cases. Seventy-five percent of the cats showed a thickened jejunal lymph node (>5mm). Abdominal effusion was noted in 10 out of 22 (45%) of the cases.

### ***Outcome***

Median overall survival time (OS) and progression free survival (PFS) were 324 days (Supplemental Figure 2). Relapse rate was 38% in the population (5/13 cats). 3 cats develop high-grade B lymphoma with a median time of 131 days. Non-relapse mortality rate was 29% (4/14 cats) and associated causes of death were heart failure, pulmonary edema, hypovolemic shock and feline infectious peritonitis.

### ***Tumor location and extent of the disease***

Eighteen out of 22 cats (82%) were diagnosed with T-LGIL in the jejunum. Six out of 22 cats (27%) showed an infiltration of both jejunum and ileum. Two cats (9%) displayed only an ileum infiltration. No large intestine biopsy was performed as neither clinical signs nor ultrasonographic findings suggested a colonic infiltration. A duodenal indolent lymphomatous infiltration was identified on endoscopic biopsies in the case for which exploratory laparotomy was declined by the owner. All cats but 3 had jejunal and /or ileocolic lymph node biopsies. Lymph node histopathology showed follicular lymphoid hyperplasia with no obvious criteria of tumor infiltration.

### ***Histological findings***

The most common histopathologic feature was a massive infiltration of the *lamina propria* by small size monomorphic lymphoid cells, which was associated in most cases with a surface intraepithelial infiltration. “Patchy lesions” were observed in half of the cases. An apical-to-basal gradient was identified in 9/22 cases (41%) (Figure 1). Intestinal villous atrophy (Figure 1) and mild to severe lymphocytic cryptitis were frequent (19/22 (86%) and 20/22 (91%) respectively). In addition to *lamina propria*, depth of infiltration in the digestive wall was variable: sub-mucosal, muscularis and serosal (Figure 1) infiltration by the lymphocytic neoplastic population were indeed observed in 68%, 48% and 24% of the cases, respectively. Fibrosis located to deep *lamina propria* and sub mucosa layers was revealed by Masson’s trichrome staining in 43% of the T-LGIL cases. Detailed pathologic findings are presented in Table 1.

### ***Immunohistochemical results***

Small intestinal *lamina propria* was diffusely and massively infiltrated by small T CD3+ lymphocytes (Figure 1). CD4 and CD8 expression profiles of the tumor population were variable (CD4+ CD8- in 36% of the cases, CD4- CD8+ in 27% of the cases and CD4- CD8- in 36% of the cases) (Figure 2). No double positive phenotype was found but only 11 cases were analyzed. A significant increase of CD3+ T cells was also observed in the epithelium with a median count of 97 per 100 epithelial cells [range: 20-100].

As expected, proportion of CD20 positive B-cells in the epithelium and in *the lamina propria* was very low (5% [range: 1-5] and 20 % [range: 10-40] respectively). In case of apical-to-basal gradient of tumor cells, CD20 infiltrate was localized at the base of *lamina propria* (data not shown). Median value of Ki67 proliferation index was 20% [range: 5-45] in the epithelium and

30% [range: 7.5-65] in the *lamina propria* (Figure 1). CD56 was negative in 95% (19/20) of the cases. Only one case displayed positive CD56 staining in the *lamina propria* without concomitant epithelial staining (Figure 2). Phospho-STAT3 was negative in 100% of the cases, while Phospho-STAT5 was positive in 100% of the cases (Figure 3). The main immunophenotypic findings are listed in Table 2.

### ***Clonality results***

At the time of diagnosis, molecular detection T-cell receptor *gamma* (TCR $\gamma$ ) chain gene rearrangements revealed monoclonality in 19 out of 22 cases (86%), as 3 cases were polyclonal. Distinct clonality profiles are presented in Supplemental Figure 4. A circulating clone with same clonal rearrangement was noted in the only one case presenting with lymphocytosis at diagnosis.

### ***Discussion***

Researchers have long needed animals to better “dissect” human diseases. Mouse is the most frequently used model and has several advantages as short gestation time and low cost, but main limitation is that tumors have to be induced. Genomic instability and heterogeneity in tumor cells and microenvironment are indeed not reproduced in mice models.<sup>15</sup> In contrast, naturally occurring tumors in dogs are well-established models for several human cancers because canine cancers (sarcomas, osteosarcomas or lymphomas) share many characteristics with human malignancies including histological appearance, tumor genetics, biological behavior and response to conventional therapies<sup>16,17</sup>. To date, greater focus has been put on dogs, likely because canine genome has been released in 2005<sup>18</sup> whereas complete feline genome has only very recently become available<sup>19</sup>. However, comparative oncology based on



cat models is currently emerging as the cat may be a good model for some tumors (oral squamous carcinoma, feline mammary carcinoma), due to increased frequency in this species and better prediction response to treatment as compared to laboratory animals<sup>20</sup>.

In this view, the present prospective series aimed to better characterize feline T-LGIL, already pointed out by two recent reports as a potential model for human GI-TLPDs<sup>8,10</sup>. Clinical, paraclinical, histopathological and molecular findings from the present analysis have been compared to literature data available for main subtypes of human primary intestinal T-cell lymphoma, i.e. GI-TLPDs, EATL and MEITL. Although feline T-LGIL was first reported to be close to MEITL (previously designated Type II-EATL)<sup>9</sup>, hallmarks of MEITL, i.e. medium size of tumor cells, positivity of CD56 staining and constant epitheliotropism<sup>2</sup> are finally not observed in feline T-LGIL. Our results reveal that feline T-LGIL rather share a high number of common features with GI-TLPDs (Table 3).

Feline T-LGIL is expected to exhibit oligo or monoclonal TCR rearrangement. However, we detected three polyclonal cases. We carefully reviewed these 3 cases and it appears that tumor infiltration was low, which may explain that clones could have not potentially been detected. These findings have been previously mentioned in the veterinary literature.<sup>21</sup>

In half of the cases, we observed tumor infiltration with an apical-to-basal gradient. We also detected concomitant lymphoid and plasmacytic inflammatory infiltrate in some T-LGIL samples, with localization of CD20 infiltrate at the base of *lamina propria*. These findings suggest that chronic antigenic stimulation could promote a low-grade lymphoma emergence within the mucosal compartment. It could represent a new model of lymphomagenesis based on a continuum between inflammatory enteropathy and overt digestive lymphoma.

Interestingly, some human GI-TLPD cases reported in the literature had an history of Crohn's disease or auto-immune enteropathy.<sup>7,22</sup>

There are multiple lines of evidence that JAK/STAT signaling is constitutively active and plays a key role in the genesis of several malignant tumors. Deregulation of the JAK–STAT pathway, known to regulate lymphocyte development, differentiation and proliferation, has emerged over the past years as a major oncogenic mechanism in several T- and NK-leukemia and lymphoma subtypes.<sup>23</sup>

Regarding digestive lymphoma, *STAT5B* mutations were first reported by Küçük *et al* in 35% of MEITL cases of  $\gamma\delta$  T-cell origin.<sup>24</sup> More recently, recurrent *STAT5B* and *JAK3* mutations have been detected in 60 to 70% and 35 to 50% of MEITL cases respectively while none of these mutations have been observed in EATL.<sup>25,26</sup> Moreover, mutations are almost exclusively associated with neutral loss of heterozygosity preserving the mutated allele suggesting a key role of JAK3/STAT5 pathway in MEITL lymphomagenesis.<sup>25,26</sup> In the context of coeliac disease, interleukin (IL)-15 supports intraepithelial lymphocyte (IEL) survival and accumulation, via a cascade implicating the phosphorylation of JAK3 and STAT5.<sup>27</sup> Innate IELs of refractory coeliac patients may acquire gain-of-function mutations in *JAK1* or *STAT3* genes, enhancing their response to IL-15 and promoting malignant transformation into EATL.<sup>28</sup>

In human GI-TLPD, it has been recently reported that alterations of the JAK/STAT pathway genes including *STAT3* mutations, *SOCS1* deletion or *STAT3-JAK2* fusions are frequently observed (>80% of the cases).<sup>22,29</sup> Whereas these alterations are supposed to activate the JAK/STAT pathway, results from the published studies are somewhat discrepant. In contrast to Sharma *et al*,<sup>29</sup> none of the GI-TLPD reported by Soderquist *et al*,<sup>22</sup> including those with

JAK/STAT alterations showed high-level Phospho-STAT3 or Phospho-STAT5 expression. These findings need to be clarified in larger studies.

No assessment of Phospho-STAT3 and Phospho-STAT5 expression in feline T-LGIL has been previously performed. We observed a strong expression of Phospho-STAT5 in 100% of the cases, while Phospho-STAT3 expression was low or undetectable. These data may suggest that, STAT5 rather than STAT3 pathway plays a key role in feline indolent digestive T-cell lymphoproliferations.

Another essential goal of comparative genomics in cancer is to define new therapeutic targets that could be ultimately beneficial to both species. In this context, JAK/STAT pathway deregulation could represent a potential therapeutic target. Numerous strategies to inhibit JAK-STAT signaling are clinically available, such as ruxolitinib, or in preclinical development.<sup>23</sup> Pets trials are known to be shorter and less limiting than human studies. Hence, pet animals use for drug development has recently dramatically expanded. This purpose has already been illustrated by Masitinib, an oral pan-tyrosine kinases inhibitor, developed in collaboration between veterinary and human medicine which efficacy was first proven in canine mast cell tumors as well as canine atopic dermatitis.<sup>30</sup> In line with this, it would be valuable to conduct clinical studies to test JAK/STAT inhibitors in feline T-LGIL at first and then in human GI-TLPDs.

## **CONCLUSION**

Primary intestinal LPDs are known to be rare in human patients and are challenging to diagnose. The validation of a spontaneous suitable animal model appears essential in this context. Feline T-LGIL is the first digestive neoplasia in this species and shares clinical, histological, immunohistochemistry and clonality features with human GI-TLPDs. Innovative

histopathology and immunohistochemistry performed in this study provided a mutual confident agreement to pathologists to validate the feline model. Further studies are warranted to investigate molecular pathogenesis of T-LGIL, with the objective of providing new insights in human GI-TLPDs. To date, a “watch and wait strategy” or low dose chemotherapy with methotrexate in case of severe symptoms is recommended in human patients, as no appropriate therapeutic scheme has never been established by previous studies. Identifying new “driver” events in feline T-LGIL could be very helpful to develop targeted therapies and to improve quality of life of human cases. Finally, deciphering the genetic landscape of T-LGIL to get relevant data applicable in human GI-TLPDs would pave the way for a more widespread use of spontaneous pet models in oncology, according to the “One-Health Concept”.

## Figure legends

**Figure 1:** H&E staining, CD3 and Ki67 immunolabelling of 5 cats diagnosed with feline T-LGIL.

- H&E and CD3 stainings: C1, C2 and notably C3 show a variable apical-to-basal gradient while C4 and C5 are more diffusely infiltrated. Villous atrophy is variable: villi are shortened and enlarged in C1, C2 and C3 whereas no atrophy is observed in C4 and C5.
- Ki67 labelling is mild to moderate in T-LGIL cases (10 to 30% of labelled cells).

**Figure 2:** CD4/CD8 (A) and CD56 (B) immunolabelling of feline T-LGIL.

A: Different profiles may be observed. C4: CD4+; C6: CD4-/CD8-; C2: CD8+.

B: C7 is the only CD56 positive case of the series. C8 displays a negative staining with nerve fibers in the lamina propria serving as internal positive control.

**Figure 3:** PhosphoSTAT3/STA5 immunolabelling of two feline T-LGIL cases (C2 and C8). Tumour cells are PhosphoSTAT3 negative and PhosphoSTAT5 positive.

## Table legends

**Table 1:** Pathologic findings in 22 cats with T-LGIL. Depth of infiltration has been assessed in all the cats for which surgical biopsies have been performed (n=21)

**Table 2:** Immunophenotypic findings of 22 cats with T-LGIL. CD56 staining was performed on 20 cats.

**Table 3:** Comparative analysis of clinical and pathological characteristics of feline T-LGIL and human GI-TLPD.<sup>1,4-7,22,29,31-35</sup>

## References

1. Matnani R, Ganapathi KA, Lewis SK, et al. Indolent T- and NK-cell lymphoproliferative disorders of the gastrointestinal tract: a review and update. *Hematol. Oncol.* 2017;35(1):3–16.
2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127(20):2375–2390.
3. 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):377–384.
4. Carbonnel F, Lavergne A, Messing B, et al. Extensive small intestinal T-cell lymphoma of low-grade malignancy associated with a new chromosomal translocation. *Cancer.* 1994;73(4):1286–1291.
5. Leventaki V, Manning JT, Luthra R, et al. Indolent peripheral T-cell lymphoma involving the gastrointestinal tract. *Hum. Pathol.* 2014;45(2):421–426.
6. Perry AM, Warnke RA, Hu Q, et al. Indolent T-cell lymphoproliferative disease of the gastrointestinal tract. *Blood.* 2013;122(22):3599–3606.
7. 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.
8. Paulin MV, Couronné L, Beguin J, et al. Feline low-grade alimentary lymphoma: an emerging entity and a potential animal model for human disease. *BMC Vet. Res.* 2018;14(1):306.
9. Moore PF, Rodriguez-Bertos A, Kass PH. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality. *Vet. Pathol.* 2012;49(4):658–668.
10. Wolfesberger B, Fuchs-Baumgartinger A, Greß V, et al. World Health Organisation Classification of Lymphoid Tumours in Veterinary and Human Medicine: a Comparative Evaluation of Gastrointestinal Lymphomas in 61 Cats. *J. Comp. Pathol.* 2018;159:1–10.
11. Valli VE, San Myint M, Barthel A, et al. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet. Pathol.* 2011;48(1):198–211.
12. Hammer SE, Groiss S, Fuchs-Baumgartinger A, et al. Characterization of a PCR-based lymphocyte clonality assay as a complementary tool for the diagnosis of feline lymphoma. *Vet. Comp. Oncol.* 2016;
13. Lingard AE, Briscoe K, Beatty JA, et al. Low-grade alimentary lymphoma: clinicopathological findings and response to treatment in 17 cases. *J. Feline Med. Surg.* 2009;11(8):692–700.
14. Biller B, Berg J, Garrett L, et al. 2016 AAHA Oncology Guidelines for Dogs and Cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2016;52(4):181–204.
15. Vail DM, MacEwen EG. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest.* 2000;18(8):781–792.
16. Khanna C, Lindblad-Toh K, Vail D, et al. The dog as a cancer model. *Nat. Biotechnol.* 2006;24(9):1065–1066.
17. Rowell JL, McCarthy DO, Alvarez CE. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol. Med.* 2011;17(7):380–388.
18. Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature.* 2005;438(7069):803–819.

19. Montague MJ, Li G, Gandolfi B, et al. Comparative analysis of the domestic cat genome reveals genetic signatures underlying feline biology and domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111(48):17230–17235.
20. Cannon CM. Cats, Cancer and Comparative Oncology. *Vet. Sci.* 2015;2(3):111–126.
21. Keller SM, Vernau W, Moore PF. Clonality Testing in Veterinary Medicine: A Review With Diagnostic Guidelines. *Vet. Pathol.* 2016;53(4):711–725.
22. Soderquist CR, Patel N, Murty VV, et al. Genetic and phenotypic characterization of indolent T-cell lymphoproliferative disorders of the gastrointestinal tract. *Haematologica.* 2019;
23. Waldmann TA, Chen J. Disorders of the JAK/STAT Pathway in T Cell Lymphoma Pathogenesis: Implications for Immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 2017;35:533–550.
24. Küçük C, Jiang B, Hu X, et al. Activating mutations of STAT5B and STAT3 in lymphomas derived from  $\gamma\delta$ -T or NK cells. *Nat. Commun.* 2015;6:6025.
25. 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.
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):1311–1319.
27. Meresse B, Korneychuk N, Malamut G, Cerf-Bensussan N. Interleukin-15, a master piece in the immunological jigsaw of celiac disease. *Dig. Dis. Basel Switz.* 2015;33(2):122–130.
28. 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):610–625.
29. Sharma A, Oishi N, Boddicker RL, et al. Recurrent STAT3-JAK2 fusions in indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the gastrointestinal tract. *Blood.* 2018;131(20):2262–2266.
30. Marech I, Patruno R, Zizzo N, et al. Masitinib (AB1010), from canine tumor model to human clinical development: where we are? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2014;91(1):98–111.
31. Margolskee E, Jobanputra V, Lewis SK, et al. Indolent Small Intestinal CD4+ T-cell Lymphoma Is a Distinct Entity with Unique Biologic and Clinical Features. *PLOS ONE.* 2013;8(7):e68343.
32. Egawa N, Fukayama M, Kawaguchi K, et al. Relapsing oral and colonic ulcers with monoclonal T-cell infiltration. A low grade mucosal T-lymphoproliferative disease of the digestive tract. *Cancer.* 1995;75(7):1728–1733.
33. Hirakawa K, Fuchigami T, Nakamura S, et al. Primary gastrointestinal T-cell lymphoma resembling multiple lymphomatous polyposis. *Gastroenterology.* 1996;111(3):778–782.
34. Carbonnel F, d'Almagne H, Lavergne A, et al. The clinicopathological features of extensive small intestinal CD4 T cell infiltration. *Gut.* 1999;45(5):662–667.
35. Zivny J, Banner BF, Agrawal S, Pihan G, Barnard GF. CD4+ T-cell lymphoproliferative disorder of the gut clinically mimicking celiac sprue. *Dig. Dis. Sci.* 2004;49(4):551–555.



Fig. 1

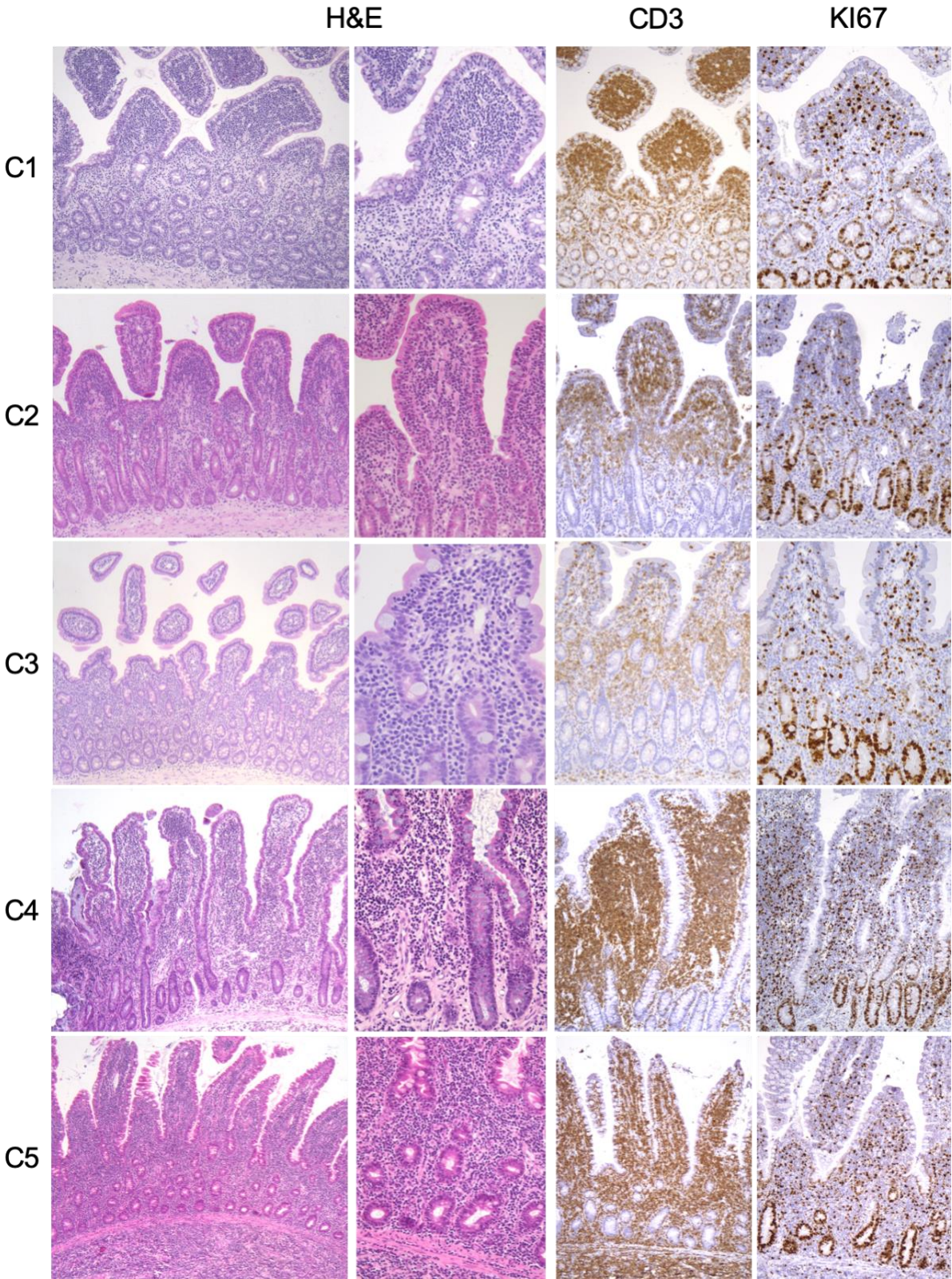




Fig.2

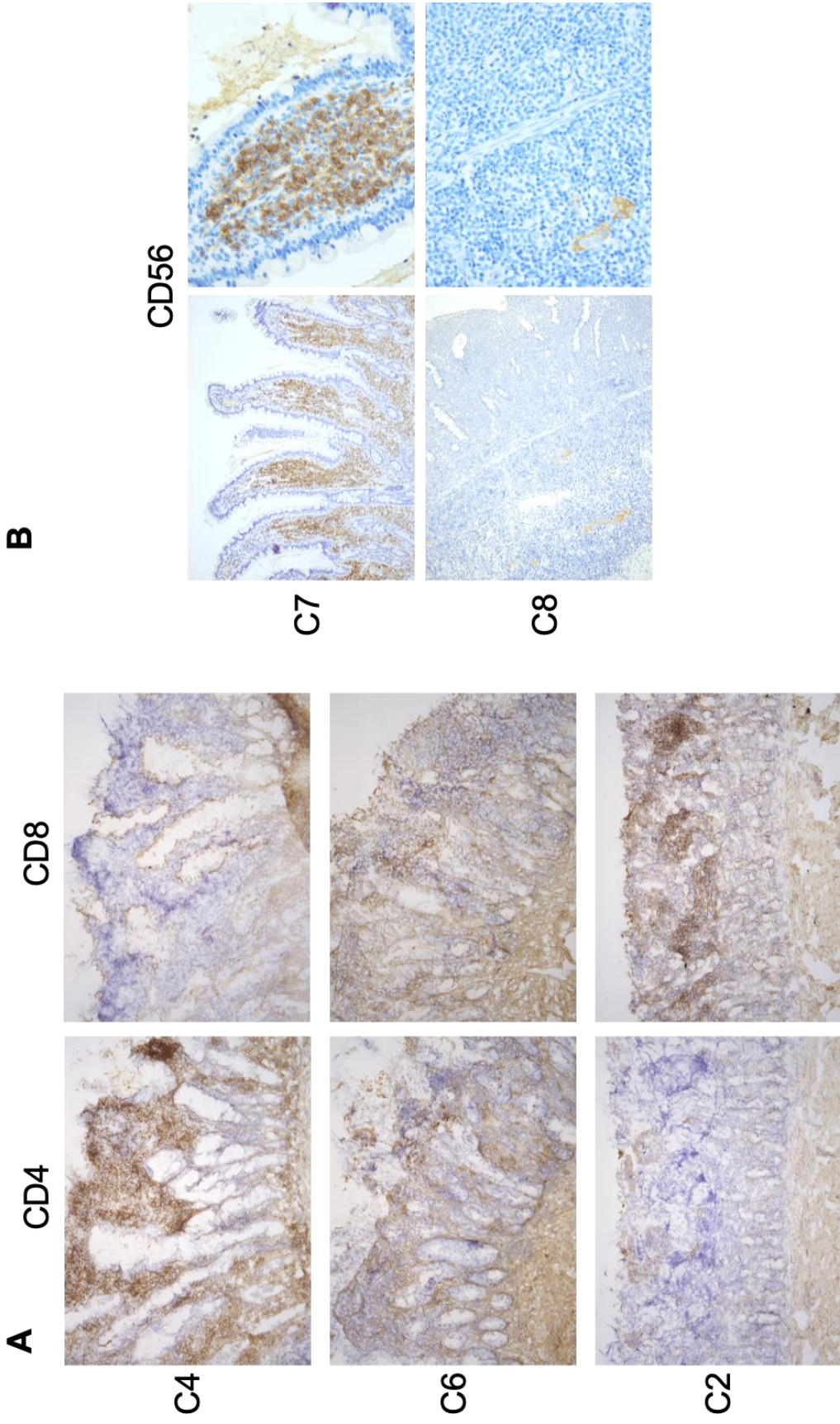


Fig.3

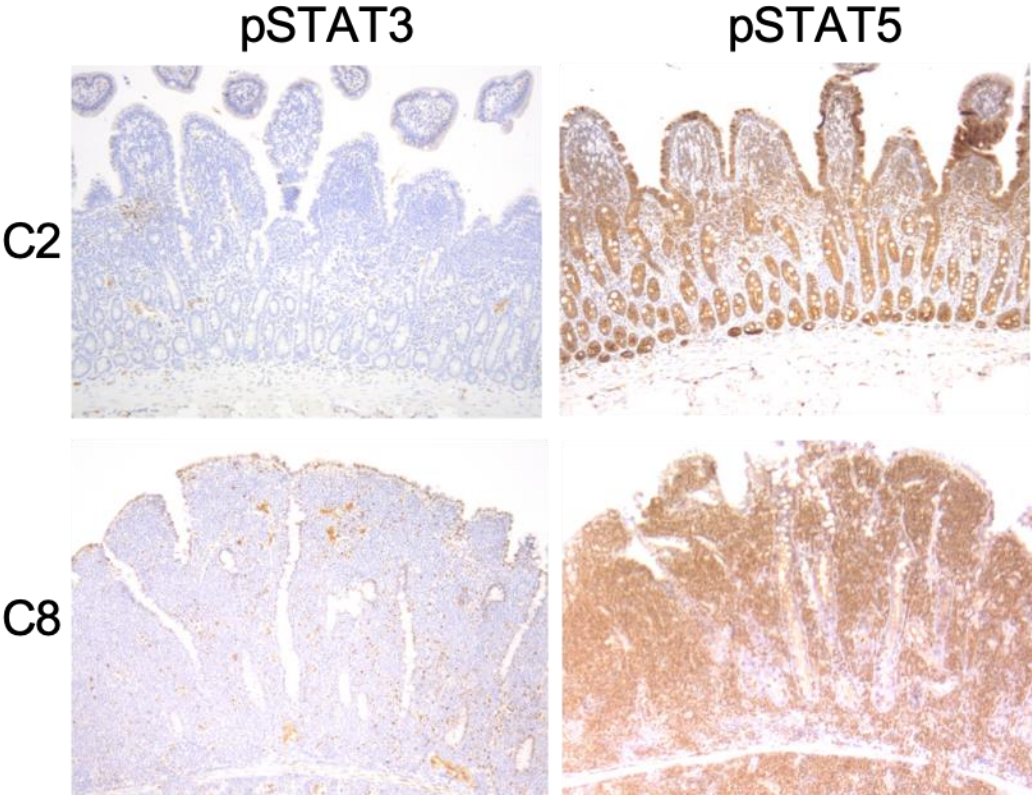


Table 1

Histological criteria		Number of cases (%)
<b>Villi</b>	Villous atrophy	19/22 (86%)
<b>Epithelium</b>	Epithelial infiltration by small lymphocytes	19/22 (86%)
	Patchy infiltration by small lymphocytes	11/22 (50%)
<b>Lamina Propria</b>	Dense infiltration of <i>lamina propria</i>	21/22 (95%)
	Patchy infiltration of <i>lamina propria</i>	5/22 (23%)
	Apical to basal gradient of small lymphocytes	9/22 (41%)
<b>Crypts</b>	Compensatory hyperplasia	17/22 (77%)
	Lymphocytic cryptitis	20/22 (91%)
	Neutrophilic cryptitis	3/22 (14%)
	Abscesses	6/22 (27%)
	Epithelial apoptosis	1/22 (5%)
<b>Monomorphism</b>	Monomorphic small lymphoid cells population in <i>lamina propria</i> and epithelium	19/22 (85%)
	Lymphocytes and neutrophils cells	1/22 (5%)
	Lymphocytes, neutrophils and macrophages	1/22 (5%)
<b>Depth of infiltration<sup>1</sup></b>	Lymphocytes, plasmocytes and neutrophils	1/22 (5%)
	Sub-mucosal infiltration by lymphocytic population	15/22 (68%) <sup>1</sup>
	Muscularis infiltration by lymphocytic population	10/21 (48%) <sup>1</sup>
<b>Fibrosis</b>	Serosal infiltration by lymphocytic population	5/21 (24%) <sup>1</sup>
	Fibrosis located to <i>lamina propria</i>	16/21 (76%)
	Fibrosis located to deep <i>lamina propria</i> and sub mucosa layers	9/21 (43%)

Table 2

Immunophenotypic findings (median, range)		T-LGIL
<b>CD3 expression (%)</b>	<i>Lamina propria</i>	91 [20-99], n=22
	Epithelium	97 [20-100], n=22
<b>CD20 expression (%)</b>	<i>Lamina propria</i>	20 [10-40], n=22
	Epithelium	5 [1-5], n=22
<b>Ki67 expression (%)</b>	<i>Lamina propria</i>	30 [7.5-65], n=22
	Epithelium	20 [5-45], n=22
<b>PhosphoStat3 expression</b>	Global assessment	Negative, 22/22
<b>PhosphoStat5 expression</b>	Global assessment	Positive, 22/22
<b>CD56 expression</b>	Global assessment	Negative, 19/20

Table 3

	Human GI-TLPDs	Feline T-LGIL
<b>Epidemiology</b>	Very rare	Increasing prevalence over the last decade
<b>Number of cases</b>	57 cases over 25 years	22 cases over 24 months
<b>Median age (years, range)</b>	51.5 [15-77]	13 [8-16]
<b>Median duration of clinical signs (days)</b>	2562 days [122-6.222]	365 days [62-1460]
<b>Male</b>	64%	73%
<b>Clinical signs</b>	Weight loss, diarrhea, vomiting, abdominal pain	Weight loss, vomiting, diarrhea, anorexia
<b>Tumor location</b>	Oral cavity, duodenum, jejunum, ileum, colon and liver	Duodenum, jejunum, ileum, liver
<b>Histopathology</b>	Normal or villous blunting Monomorphic infiltrate of small lymphocytes in <i>lamina propria</i>	Villous atrophy (86%) Monomorphic infiltrate of small lymphocytes in <i>lamina propria</i>
<b>IEL</b>	Variable degree of epitheliotropism	Strong epitheliotropism (86%)
<b>Immunophenotype</b>	CD3+ (100%) CD4+/CD8- (56%), CD4-/CD8+ (33%), and CD4-/CD8- (7%) and CD4+/CD8+ (4%) CD56- PhosphoSTAT3 + (12%) PhosphoSTAT5 + (55%) Ki67 <i>lamina propria</i> < 10%	CD3+ (97%) CD4+/CD8- (36%), CD4-/CD8+ (27%) and CD4-/CD8- (36%) CD56 - (85%) PhosphoSTAT3- PhosphoSTAT5 + (100%) Ki67 <i>lamina propria</i> 30%
<b>Clonality (Small intestine TCR)</b>	Mainly clonal (94%)	Mainly clonal (86%)
<b>Main differentials</b>	Autoimmune enteropathy, Inflammatory bowel disease, Refractory Celiac Sprue	Inflammatory bowel disease
<b>Outcome</b>	Indolent evolution (persistent disease at median follow up of 5 years)	Indolent evolution (median survival time of 2 years)

## Supplemental figure legends

**Supplemental figure 1:** Method of semiquantitative assessment of immunohistochemistry staining based on double reading. Data have been retained when absolute difference between reading values from human and veterinary pathologists was  $\leq 5$  for the [0-10; 90-100] range values and  $\leq 10$  for the [10-90] range values. Higher discrepancies have been discussed and reviewed until agreements were found.

\*: average percent of positive cells is calculated out of 100 cells in each compartment.

**Supplemental figure 2:** Kaplan-Meier estimates of overall survival (OS) (A) and progression-free survival (PFS) (B) of 22 cats with T-LGIL

**Supplemental figure 3:** Molecular detection of clonal T-cell receptor (TCR  $\gamma$ ) chain rearrangements: examples of monoclonal (A) and polyclonal (B) profiles

Fig.S1

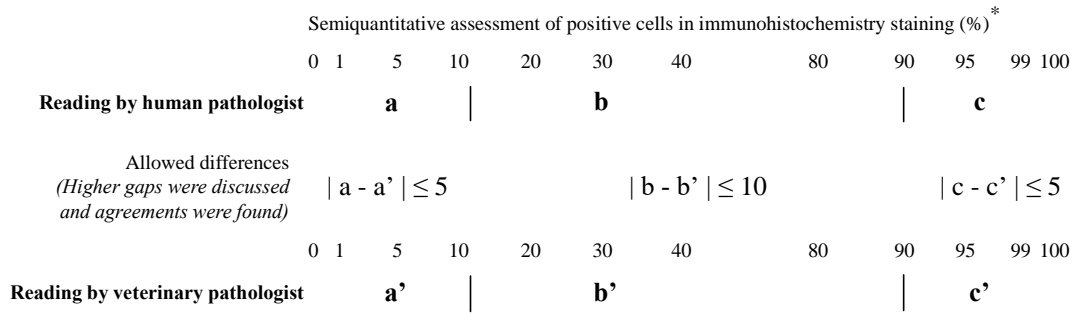


Fig.S2

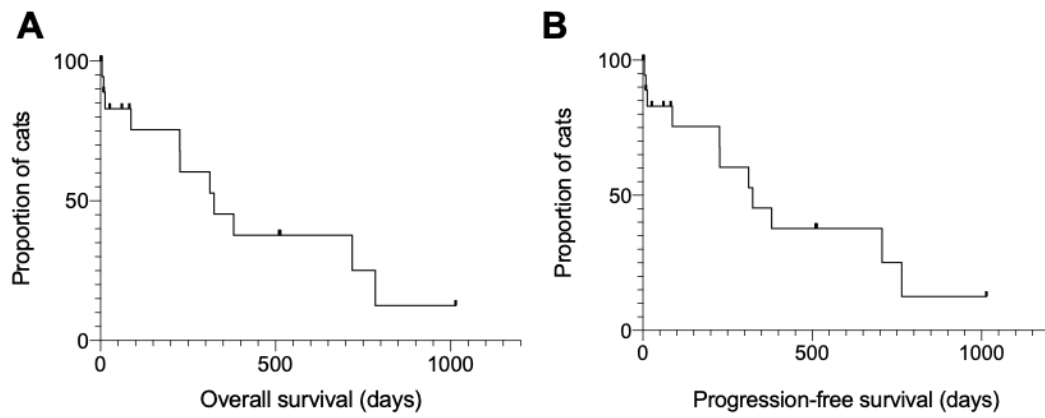
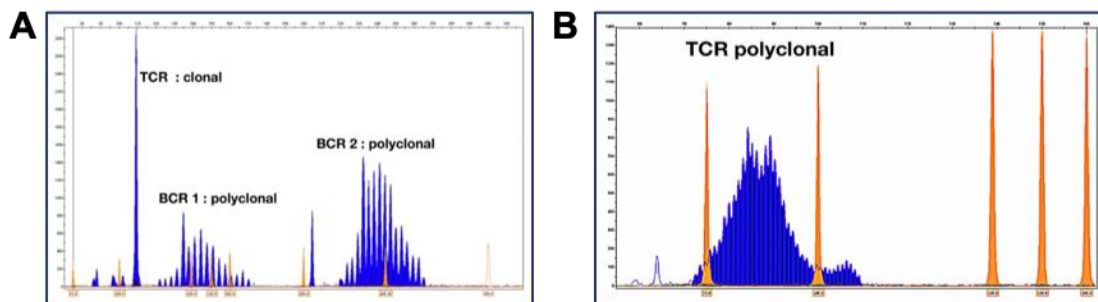


Fig.S3



## Supplemental tables legends

**Supplemental table 1:** Reference values for blood parameters analyzed by Biopôle or Idexx® laboratories.<sup>1</sup>Hypocobalaminemia was defined by cobalaminemia < 200 ng/L. <sup>2</sup>When cobalaminemia was < 150 ng/L (detection threshold), quantitative statistical analyzes were performed considering the 75 ng/L value.

**Supplemental table 2:** Epidemiological data of cats diagnosed with T-LGIL. Median and range are indicated for each quantitative value.

**Supplemental table 3:** Clinical data of cats diagnosed with T-LGIL. Median and range are indicated for each quantitative value.

**Supplemental table 4:** Biochemical data in cats with T-LGIL. Median and range are indicated for each quantitative value. <sup>1</sup>f-PLi dosage was available in 19 T-LGIL. <sup>2</sup>Cobalaminemia dosage was available in 21 T-LGIL

**Supplemental table 5:** Hematological data in cats with T-LGIL. Median and range are indicated for each quantitative value.

Table S1

Blood parameters	Reference values	
	BioPôle® Lab.	IDEXX® Lab.
Creatinine	46,0 – 157,4 µmol/L	< 168,0 µmol/L
Alanine aminotransferase (ALT)	15 - 123 UI/L	< 175 UI/L
Alkaline phosphatase (ALP)	22 - 187 UI/L	< 73 UI/L
Total protein	6.4 – 9.6 g/dL	5.9 – 8.7 g/dL
Albumin	2.9 – 3.5 g/dL	2.7 – 4.4 g/dL
Feline pancreatic lipase immunoreactivity (f-PLi)	/	≤ 3,5 µg/L
Cobalamin (B12) <sup>1,2</sup>	/	200 - 1 680 ng/L
Inorganic phosphorus	1.03 mmol/L – 2.51 mmol/L	0.8 mmol/L – 2.2 mmol/L
Hemoglobin	6.08 – 10.49 mmol/L	5.59 – 9.31 mmol/L
Leucocytes	3.7 - 19 G/L	5 - 19 G/L
Lymphocytes	1.1 – 10.36 G/L	1 - 6 G/L
Neutrophils	1.45 – 9.62 G/L	3 - 11 G/L
Eosinophils	0.16 – 1.9 G/L	0,09 – 2.18 G/L
Monocytes	0.09 – 0.82 G/L	0.04 – 0.53 G/L

Table S2

Epidemiological data	T-LGIL (n = 22)
Breed	Domestic Shorthair (18/22, 82%), Siamese (2/22, 9%), Angora (1/22, 4.5%), Norwegian Forest (1/22, 4.5%)
Male sex	16/22 (73%)
Neutered cats	22/22 (100%)
Age (years old)	13 [8-16]
Weight (kg)	4.0 [2.2-7.4]
Exclusive indoor life	10/22 (45%)
Commercial diet	22/22 (100%)



Table S3

Clinical data	T-LGIL (n=22)
Duration of clinical signs (days)	365 [62-1460]
Weight loss	17/22 (77%)
Vomiting	15/22 (68%)
Alimentary vomiting	12/15 (80%)
Non-alimentary vomiting	12/15 (80%)
Small intestinal diarrhea	14/22 (64%)
Small intestinal diarrhea among cats with jejunal lesions	11/18 (61%)
Large intestinal diarrhea	4/22 (18%)
Dysorexia	10/22 (45%)
Lethargy	8/22 (36%)
Polyphagia	6/22 (27%)
Constipation	1/22 (4.5%)
Hematochezia	1/22 (4.5%)
Melena	1/22 (4.5%)
Hyperthermia	1/22 (4.5%)
Abnormal abdominal palpation	16/22 (73%)
Thickened intestinal loops	7/16 (44%)
Abdominal pain	4/16 (25%)

Table S4

Biochemical data	T-LGIL (n = 22)
Albuminemia (g/dL)	3.0 [2.0-5.0]
Hypoalbuminemia	3/22 (14%)
Total proteinemia (g/dL)	7.3 [5.9-10.7]
Hypoproteinemia	0/22 (0%)
ALT (IU/L)	68 [23-451]
ALP (IU/L)	41 [10-262]
Increased liver enzymes (ALT and/or ALP)	3/22 (14%)
f-PLi ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>1</sup>	2.9 [1.2-26]
Increased f-PLi	6/19 (32%)
Hypophosphatemia	2/21 (10%)
Cobalaminemia (ng/L) <sup>2</sup>	75 [75-1488]
Hypocobalaminemia (< 200 ng/L)	12/21 (57%)

Table S5

<b>Hematological data</b>	<b>T-LGIL (n=22)</b>
<b>Hemoglobinemia (mmol/L)</b>	7.6 [4.7-9.5]
<b>Anemia</b>	4/22 (18%)
<b>Leucocytes (G/L)</b>	13.3 [5.7-35.2]
<b>Leukocytosis</b>	6/22 (27%)
<b>Leucopenia</b>	0/22 (0%)
<b>Neutrophils (G/L)</b>	9.4 [2.34-33.5]
<b>Neutrophilia</b>	8/22 (36%)
<b>Neutropenia</b>	0/22 (0%)
<b>Eosinophils (G/L)</b>	0.4 [0-7.3]
<b>Eosinophilia</b>	2/22 (9%)
<b>Eosinopenia</b>	2/22 (9%)
<b>Lymphocytes (G/L)</b>	1.6 [0.4-10.2]
<b>Lymphocytosis</b>	1/22 (5%)
<b>Lymphopenia</b>	8/22 (36%)
<b>Monocytes (G/L)</b>	0.5 [0.2-1.8]
<b>Monocytosis</b>	9/22 (41%)
<b>Monocytopenia</b>	0/22 (0%)

## 3.2 Analyse histologique, immunohistochimique et moléculaire comparative des LDBG et des ELP chez le chat

Comme décrit dans l'introduction, l'ELP est le principal diagnostic différentiel du LDBG et il est parfois difficile de distinguer ces deux entités. Il n'existe à l'heure actuelle pas de critères discriminants validés qui pourraient aider au diagnostic. Dans cette partie du travail, nous avons donc réalisé une étude anatomopathologique comparant 22 chats avec LDBG à 22 chats avec ELP.

### 3.2.1 Matériels et méthodes

Le schéma d'inclusion ainsi que les analyses histologique, immunohistochimique et de clonalité ont été réalisés selon les mêmes modalités que décrites dans la partie 3.1. Les 22 chats avec LDBG sont ceux analysés dans la partie 3.1. Les chats avec ELP ont été inclus durant la même période par la même clinicienne.

#### 3.2.1.1 Histologie : critères de lecture

Pour rappel, les critères définis pour l'analyse histologique ont été choisis parmi les critères publiés par le World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group<sup>192,193</sup> et par Kiupel *et al.* en 2011<sup>72</sup>. De plus, les critères ont été validés après concertation entre les docteurs Nathalie Cordonnier (anatomopathologiste vétérinaire de l'ENVA) et Julie Bruneau (anatomopathologiste certifiée de l'Hôpital Necker – Enfants malades et spécialiste dans l'étude des lymphoproliférations digestives humaines). Une coloration « trichrome de Masson » a en outre été réalisée sur les lames des deux groupes de chats en raison de la distribution de la fibrose qui semblait très différente entre les deux groupes.

#### 3.2.1.2 Immunohistochimie : critères de lecture

Les immunomarquages suivants ont été réalisés sur les tissus FFPE pour tous les chats : CD3, CD20, KI67. Phospho-STAT3 et Phospho-STAT5 ont été réalisés sur 20 cas de LGAL et 18 cas d'ELP. La lecture a été réalisée à l'aveugle : les anatomopathologistes ne

connaissaient ni l'histoire de l'animal ni les précédents diagnostics histologiques et immunohistochimiques établis par leurs confrères. Le comptage a été réalisé par une méthode semi-quantitative, dans la *lamina propria* et dans l'épithélium, selon la méthode décrite dans la Fig. S1 de l'article présenté dans la partie 3.1.

### 3.2.1.3 Clonalité

La clonalité a été réalisée systématiquement sur l'ensemble des cas de LDBG et d'ELP et non pas seulement sur les cas douteux comme cela était habituellement réalisé dans la littérature<sup>72</sup>.

## 3.2.2 Résultats

### 3.2.2.1 Résultats histologiques

#### a) Épithélium villositaire : analyse de l'infiltrat

Les chats avec LDBG se caractérisent par un épithélium villositaire significativement plus infiltré, avec la présence plus fréquente de nids ou de plaques de petits lymphocytes ou d'un infiltrat diffus sévère (Figure 14).

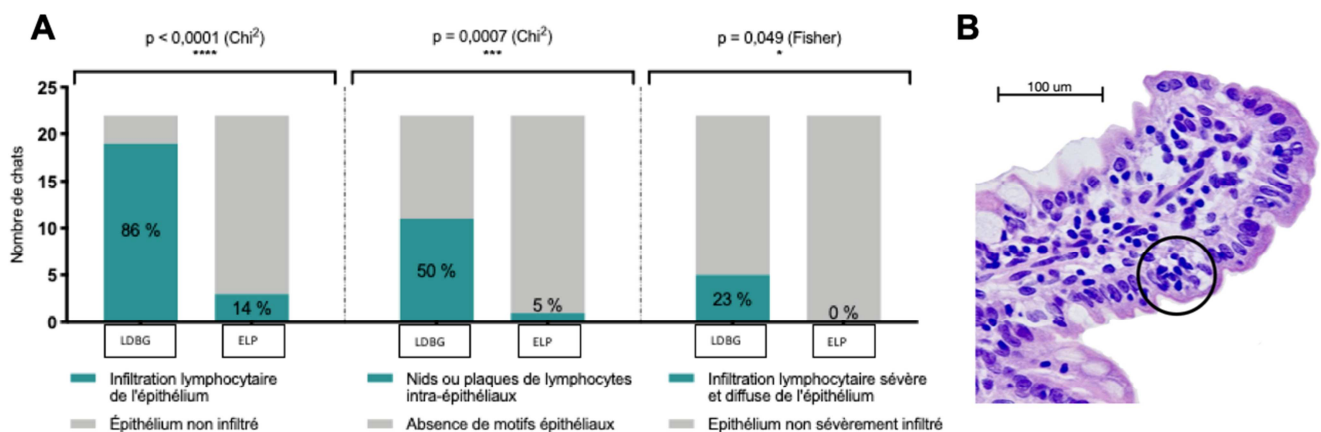


Figure 14 : Infiltration lymphocytaire de l'épithélium chez les chats atteints de LDBG et d'ELP.

A : Fréquence de répartition entre les groupes LDBG et ELP

B : Nid de lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) (cercle noir) chez un chat atteint de LDBG (coloration HES) (crédit photographique : Laboratoire d'anatomopathologie de l'EnvA).

b) Atrophie villositaire et aspect des cryptes

Une atrophie villositaire, une hyperplasie des cryptes et une cryptite lymphocytaire sont plus souvent retrouvées chez les chats atteints de LDBG que chez les chats atteints d'ELP. Les figures d'apoptose épithéliale sont significativement plus fréquentes chez les chats atteints d'ELP. Nous n'avons pas observé de différence significative en ce qui concerne la présence de cryptite neutrophilique et d'abcès cryptiques (Figure 15).

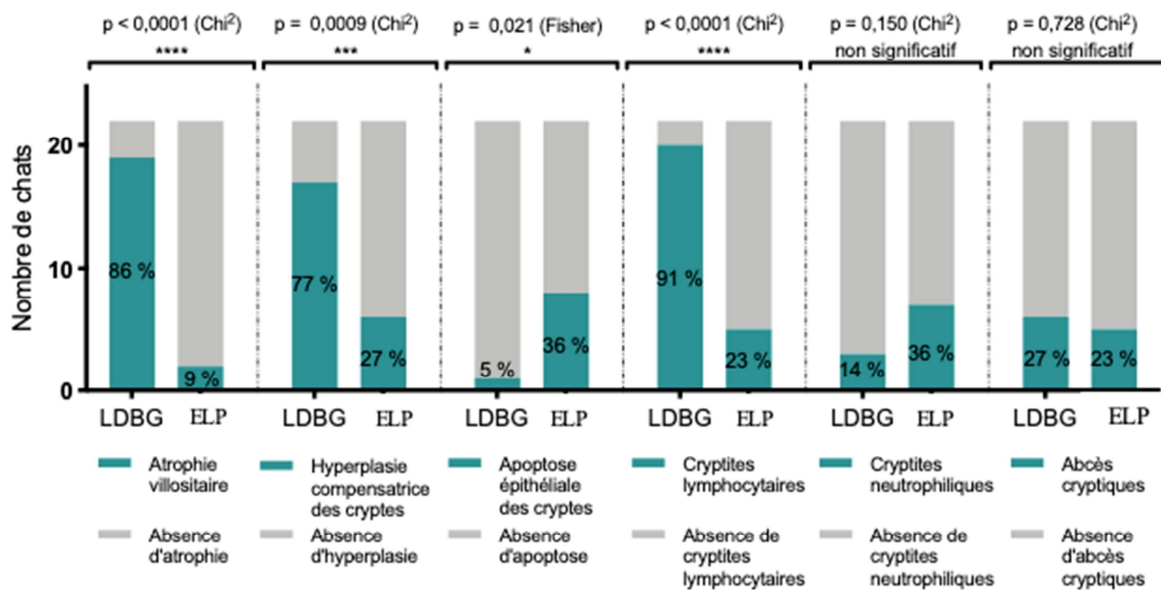


Figure 15 : Anomalies villositaires et cryptiques dans les groupes LDBG et d'ELP

c) Lamina propria : analyse de l'infiltrat

En comparaison avec les chats du groupe ELP, la lamina propria des chats atteints de LDBG est infiltrée par une population monomorphe et de richesse cellulaire élevée. Elle est également significativement plus souvent hétérogène, avec des zones d'hyper infiltration lymphocytaire (23 % des cas) et décrit de manière plus fréquente un gradient apico-basilaire (densité de l'infiltrat lymphocytaire supérieure dans l'apex des villosités). La figure 16 illustre les caractéristiques comparatives de l'infiltrat lymphocytaire de la lamina propria au sein des deux groupes (LDBG et ELP).

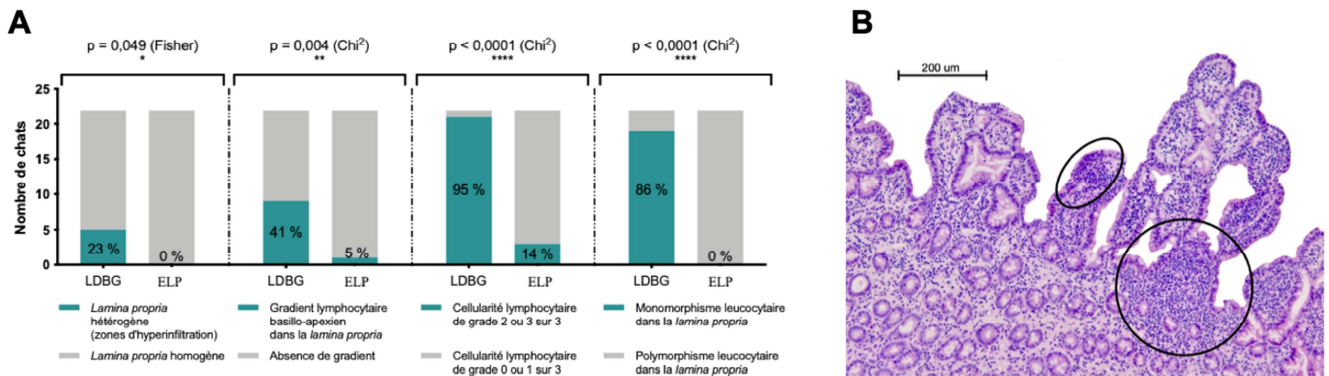


Figure 16 : Caractérisation de l'infiltrat lymphocytaire dans la lamina propria chez les chats atteints de LDBG et d'ELP.

A : Fréquence de répartition entre les groupes LDBG et ELP

B : Lamina propria comportant des zones hétérogènes d'hyper infiltration lymphocytaire (cercle noir) associées à des plaques de lymphocytes intra-épithéliaux (ovale noir), chez un chat atteint de LDBG (crédit photographique : laboratoire d'anatomopathologie de l'EnvA).

d) Infiltration de la paroi digestive

Une infiltration lymphocytaire de la sous-muqueuse, de la musculuse et de la séreuse étaient significativement plus fréquentes lors de LDBG. Aucun chat atteint d'ELP ne présentait une infiltration de la musculuse ni de la séreuse (Figure 17).

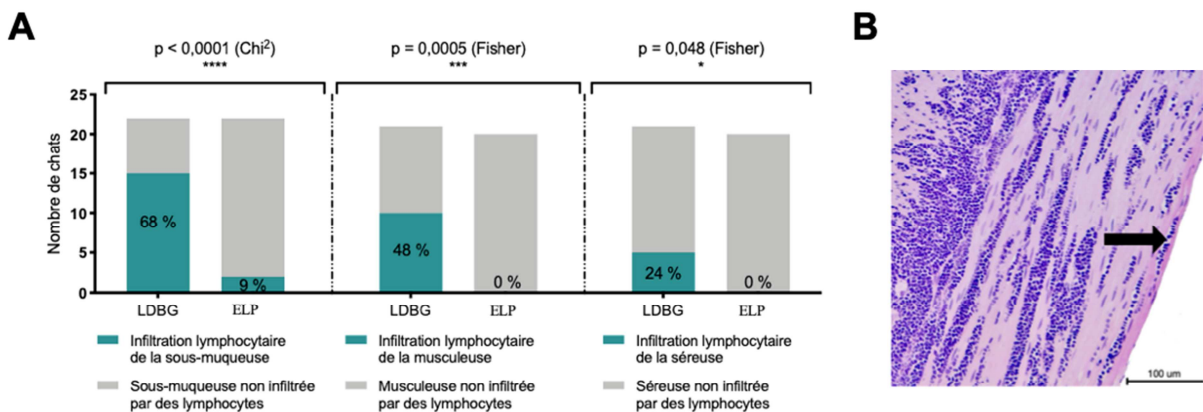


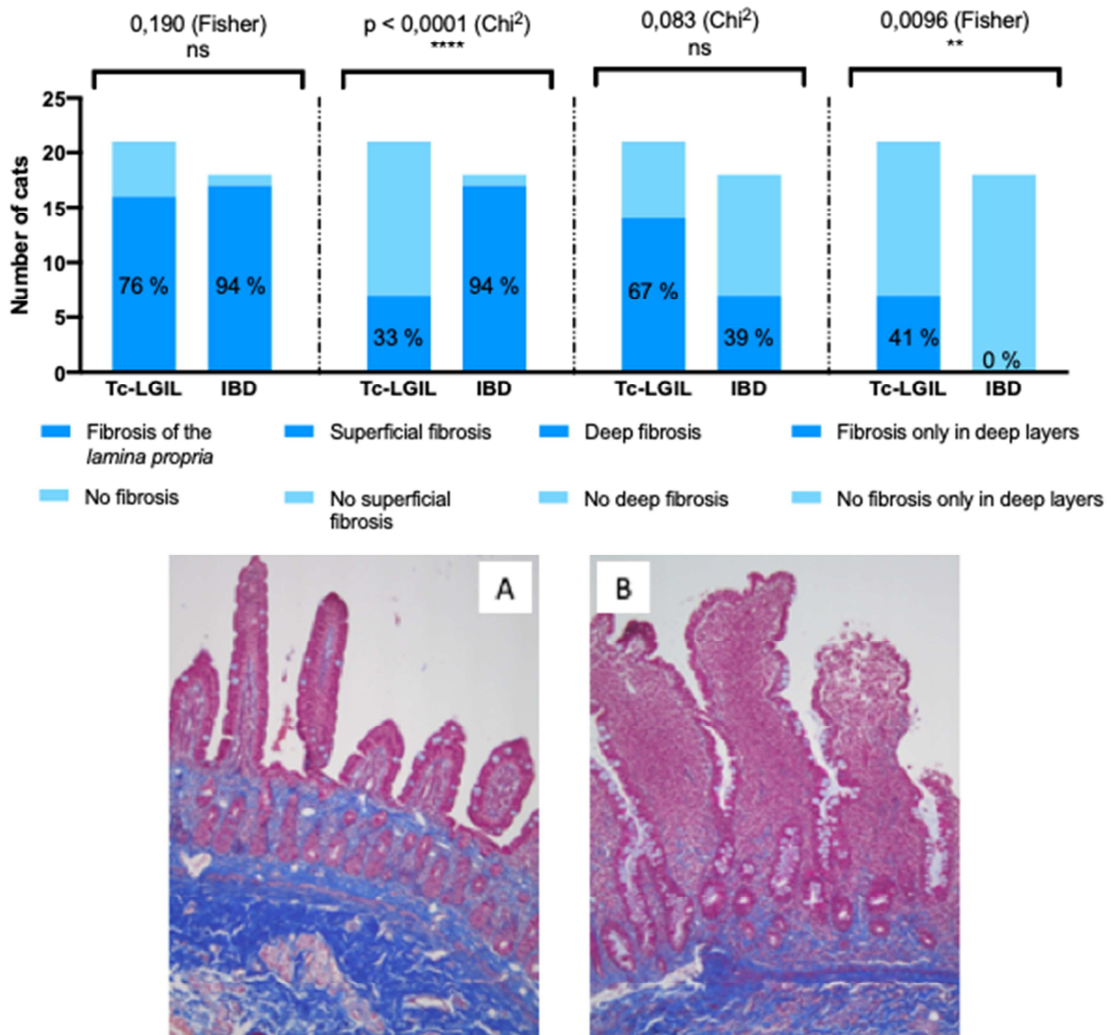
Figure 17 : Infiltration lymphocytaire des couches profondes (sous-muqueuse, musculuse et séreuse) chez les chats atteints de LDBG et d'ELP.

A : Fréquence de répartition entre les groupes LDBG et ELP

B : Infiltration lymphocytaire des couches profondes (sous-muqueuse, musculuse et séreuse : flèches) chez un chat atteint de LDBG (coloration HES)

e) Évaluation de la fibrose par coloration au trichrome de Masson

La présence d'une bande de fibrose superficielle est majoritairement observée dans le groupe des chats à ELP et seule une bande de fibrose profonde est présente chez 41% des cas de LDBG et aucun cas d'ELP (Figure 18).



**Figure 18 :** Fibrose superficielle ou profonde chez les chats présentant un LDBG ou une ELP  
 Panel du haut : Fréquence de répartition entre les groupes LDBG (Tc-LGIL) et ELP (IBD)  
 Panel du bas : Coloration trichrome de Masson. A : ELP, B : LDBG



### 3.2.2.2 Résultats immunohistochimiques

#### a) Gradient apico-basilaire

L'immunohistochimie confirme le gradient apico-basilaire identifié en coloration HES chez plusieurs cas de LDBG (Figure 19) et met également en évidence l'épithéliotropisme lymphocytaire, la présence de nids et/ou de plaques de lymphocytes intra-épithéliaux et la présence de zones hétérogènes d'hyper infiltration lymphocytaire dans la *lamina propria*.

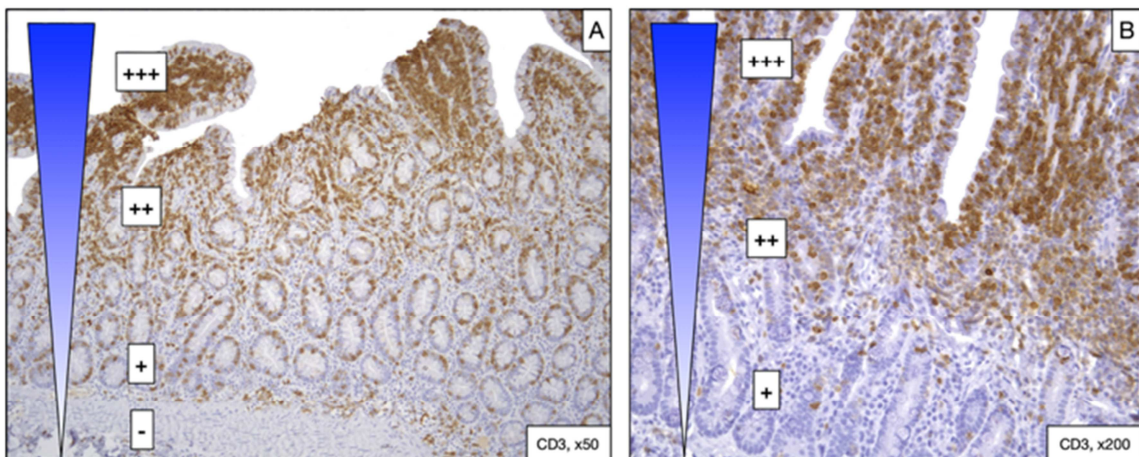


Figure 19 : Gradient apico-basilaire observé avec un anticorps ant-CD3 chez deux chats atteints de LDBG.

(crédits photographiques : Laboratoire d'anatomopathologie de l'EnvA)

#### b) Analyses immunohistochimiques semi-quantitatives pour les épitopes CD3, CD20, KI67

Comme attendu, les médianes des niveaux d'expression de l'épitope CD3 dans la *lamina propria* et dans l'épithélium sont significativement plus élevées chez les chats atteints de LDBG que chez les chats atteints d'ELP (Figure 20A). La médiane du niveau d'expression de l'épitope CD20 dans la *lamina propria* est significativement plus élevée chez les chats atteints d'ELP (Figure 20B). Les médianes du niveau d'expression de l'index de prolifération cellulaire Ki-67 dans la *lamina propria* et dans l'épithélium sont significativement plus élevées dans le groupe LDBG (Figure 20C). En se basant sur ces résultats, nous avons établi un seuil de Ki67 à 20%, permettant de différencier les chats avec LDBG des chats avec ELP. Ainsi le pourcentage de chats ayant un niveau d'expression de Ki-67 supérieur ou égal à 20 % est significativement plus élevé dans le groupe LDBG que dans le



groupe ELP, à la fois dans la *lamina propria* (respectivement 18/22 et 7/22 [ $p = 0,0008$ ]) et dans l'épithélium (respectivement 13/22 et 1/22 [ $p = 0,0001$ ])

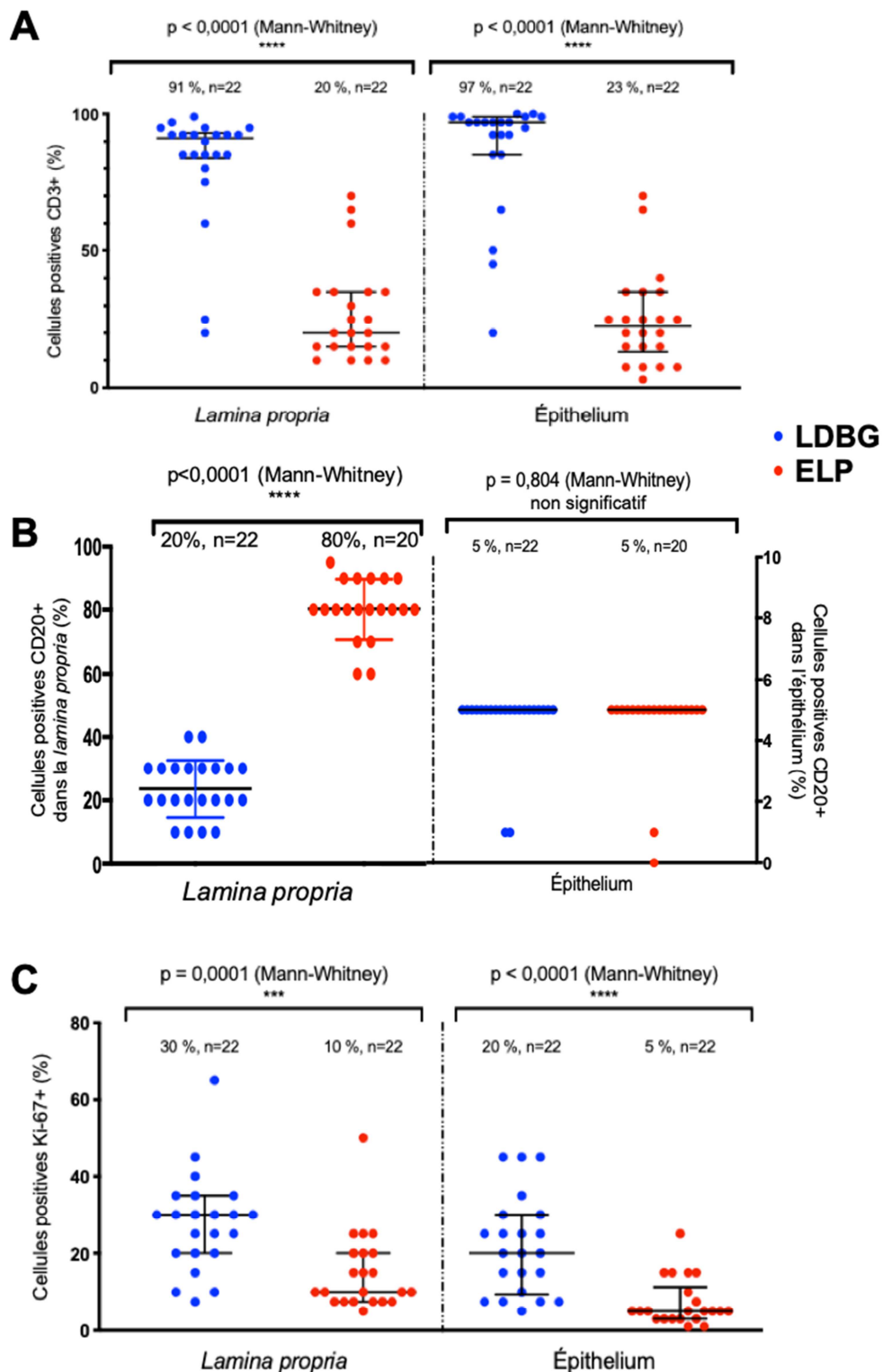


Figure 20 : Niveaux d'expression de l'épitope CD3 (A), CD20 (B) et Ki-67 (C) dans la *lamina propria* et l'épithélium chez les chats atteints de LDBG ou d'ELP.

Les médianes et quartiles sont représentés sur les nuages de points.

c) Analyse de l'expression de phosphoSTAT3/phosphoSTAT5

Si l'expression de phosphoSTAT3 au sein de la *lamina propria* est assez faible et peu discriminante entre les deux groupes, l'expression de phosphoSTAT5 est massive dans le groupe LDBG, comme illustré dans la figure 21.

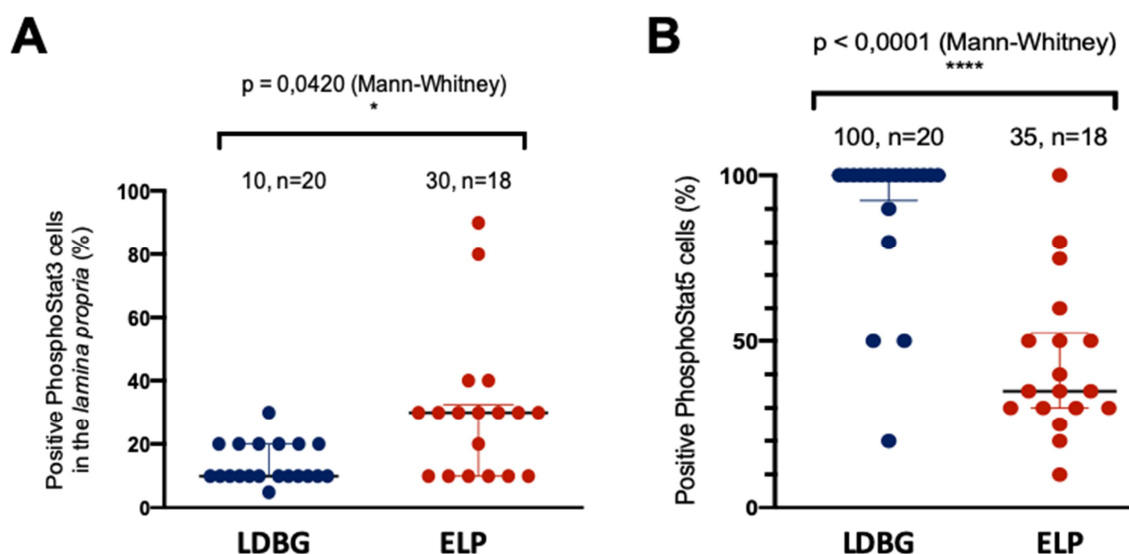


Figure 21 : Expression de phosphoSTAT3 (A) et de phosphoSTAT5(B) au sein de la *lamina propria* des chats du groupe ELP et de ceux du groupe LDBG

3.2.2.3 Résultats de clonalité

Une monoclonalité du TCR est observée plus fréquemment chez les chats atteints de LDBG. Néanmoins, on retrouve 40 % de réarrangements clonaux du TCR chez les chats atteints d'ELP (Figure 22).

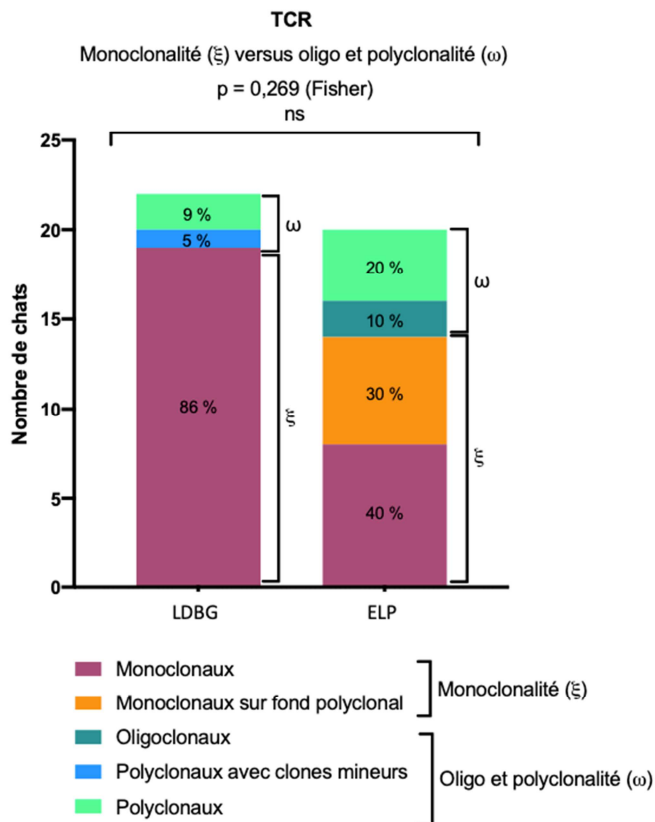


Figure 22 : Analyse de la clonalité chez les chats atteints de LDBG ou d’ELP

### 3.2.3 Synthèse

Cette étude nous a permis d’identifier des critères histologiques et immunohistochimiques discriminants entre le LDBG et l’ELP, ce qui facilitera le diagnostic différentiel entre ces deux entités.

En revanche, contrairement à ce qui était communément admis dans la communauté vétérinaire<sup>51,72</sup>, nos données de clonalité confirment que la présence d’un réarrangement monoclonal du TCR n’est pas un critère de malignité en soi et ne doit en aucun cas faire poser à lui seul le diagnostic de lymphome. Une monoclonalité peut en effet être mise en évidence lors de forte stimulation antigénique, comme cela a été déjà rapporté chez l’homme, notamment lors de maladie de Crohn<sup>174</sup>.

Toutefois, le pourcentage assez élevé de profils monoclonaux identifiés au sein de la population de chats à ELP pourrait s’intégrer dans le cadre d’un continuum histologique entre ELP et LDBG. En effet, la forte stimulation antigénique associée à l’ELP favoriserait l’émergence de clones tumoraux et, à terme, le développement d’un lymphome de bas grade au sein de l’épithélium intestinal.

### 3.3 Séquençage du microbiote chez le chat sain âgé, lors d'ELP ou de LDBG

Dans ce travail, nous avons réalisé une analyse comparative du microbiote de chats présentant un LDBG ou une ELP et de chats sains âgés sans signes cliniques.

Les objectifs de cette étude étaient les suivants :

- Identifier des différences d'altérations du microbiote entre chats malades (LDBG et ELP) et chats sains ou entre chats avec LDBG et chats avec ELP
- Confronter ces résultats avec les profils obtenus lors d'entéropathie inflammatoire chez l'homme.

#### 3.3.1 Matériels et méthodes

Le microbiote fécal de trois groupes de chats a été séquencé :

- Un groupe de chats présentant un LDBG (n=21)
- Un groupe de chats présentant une ELP (n=16)
- Un groupe contrôle de chats sains « séniors » ne recevant pas de traitement antibiotique ni de corticostéroïdes (n=23). Concernant ce groupe contrôle, les selles ont été recueillies par les propriétaires des animaux lors de la défécation et immédiatement congelées, puis transportées sur le froid vers l'ENVA.

La caractérisation de l'ARN 16S a été réalisée par séquençage Illumina MISEQ 300bp paired end V3-4 region (séquençage de variant amplicons, silva v132 taxonomic classifier).

Pour tous les animaux, au préalable du séquençage, les paramètres suivants ont été répertoriés :

- Age
- Sexe
- Mode de vie (intérieur ou sorties à l'extérieur)
- Antiparasitaire interne administré (molécule, fréquence, date de dernière administration)
- Présence éventuelle d'autres congénères

En ce qui concerne les groupes d'animaux malades, les données cliniques et paracliniques ont été répertoriées.

### 3.3.2 Résultats

#### 3.3.2.1 Mode de vie

Dans notre série le mode de vie des chats n'a pas eu d'influence sur l'abondance du microbiote des animaux comme le montre la figure 23A. En revanche, paradoxalement, le fait de vivre avec un ou plusieurs congénères se traduit par une abondance de flore digestive significativement plus importante, comme l'illustre la figure 23B.

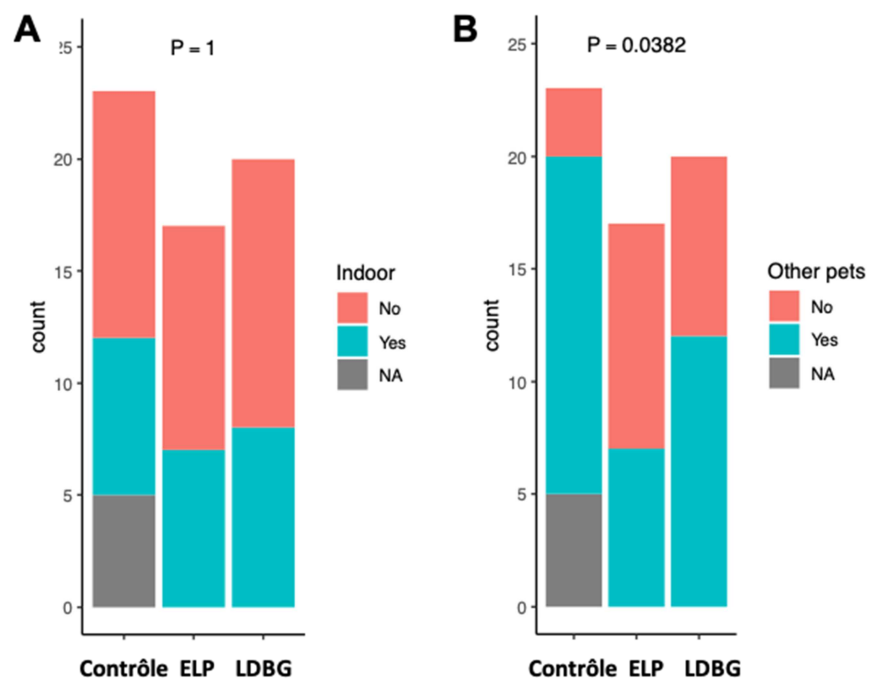


Figure 23 : Abondance du microbiote selon le mode de vie (A) ou la présence de congénères (B)

#### 3.3.2.2 Alpha diversité

L'alpha diversité correspond à la diversité et à l'équilibre entre les espèces dans un écosystème donné. Elle est évaluée à l'aide des index Chao1 et Shannon. Chao1 estime le nombre d'espèces uniques au sein de chaque échantillon. Shannon reflète le nombre d'espèce, leur abondance ainsi que la régularité de la distribution.

Dans ce contexte, les résultats obtenus montrent une différence entre chats avec LDBG et chats sains avec les deux index (Figure 24). L'analyse de l'alpha diversité avec l'index

de Shannon semble indiquer une réduction plus importante dans le groupe LDBG que dans le groupe ELP mais ceci n'est pas confirmé par l'index de Chao1.

Globalement ces premiers résultats indiquent que les animaux souffrant de troubles digestifs, quelle qu'en soit l'étiologie, présentent un microbiote moins riche que les animaux sains du même âge.

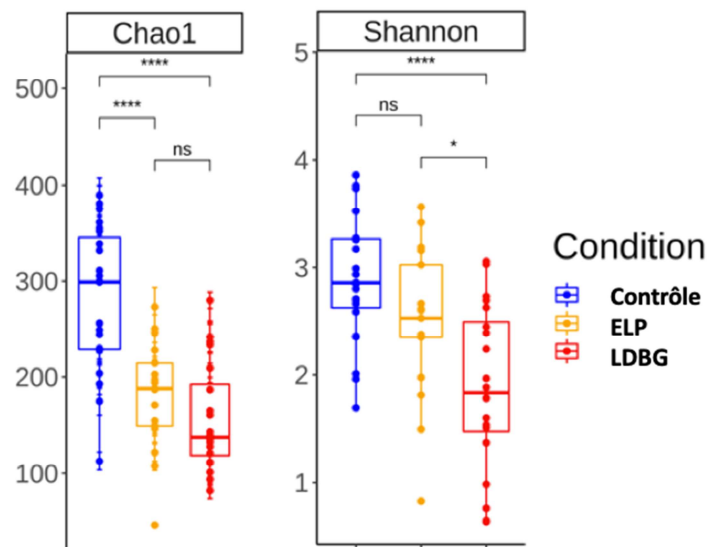


Figure 24 : Alpha diversité discriminant les chats malades des chats sains

### 3.3.2.3 Abondance différentielle

L'abondance différentielle est analysée par LDA (Linear Discriminant Analysis) effect size (LEfSe). Les chats sains ont été comparés d'une part aux chats à ELP et d'autre part aux chats présentant un LDBG afin de déterminer quelles bactéries prédominent de manière différentielle au sein des 3 groupes.

Une réduction des Firmicutes (incluant *Faecalibacterium and Roseburia*) est nette chez les chats souffrant d'une ELP. De plus les protéobactéries sont surreprésentées (*Escherichia/Shigella*) (Figure 25, comparaison Contrôle vs ELP). Ces données sont parfaitement concordantes à ce qui est décrit lors de MICI chez l'homme<sup>165</sup>.

On observe la perte majeure des Firmicutes lors de LDBG félin, notamment les bactéries indispensables à la production de butyrate (*Faecalibacterium and Roseburia*). Les protéobactéries associées habituellement aux pathobiontes, membres opportunistes normalement sous-dominants de la flore commensale, présente une surreprésentation

(Figure 25, comparaison Contrôle vs LDBG). Ces données sont aussi comparables à ce qui est décrit chez l'homme lors de MICI, notamment ici le groupe *Escherichia/Schigella*<sup>166</sup>.

Il n'existe qu'une différence minimale entre les deux groupes malades et seulement 5 genres bactériens présentent une abondance différente (augmentée lors d'ELP) (Figure 25, comparaison LDBG vs ELP).

La figure 25 présente le résultat de l'analyse différentielle entre chaque entité (chats sains, LDBG, ELP).

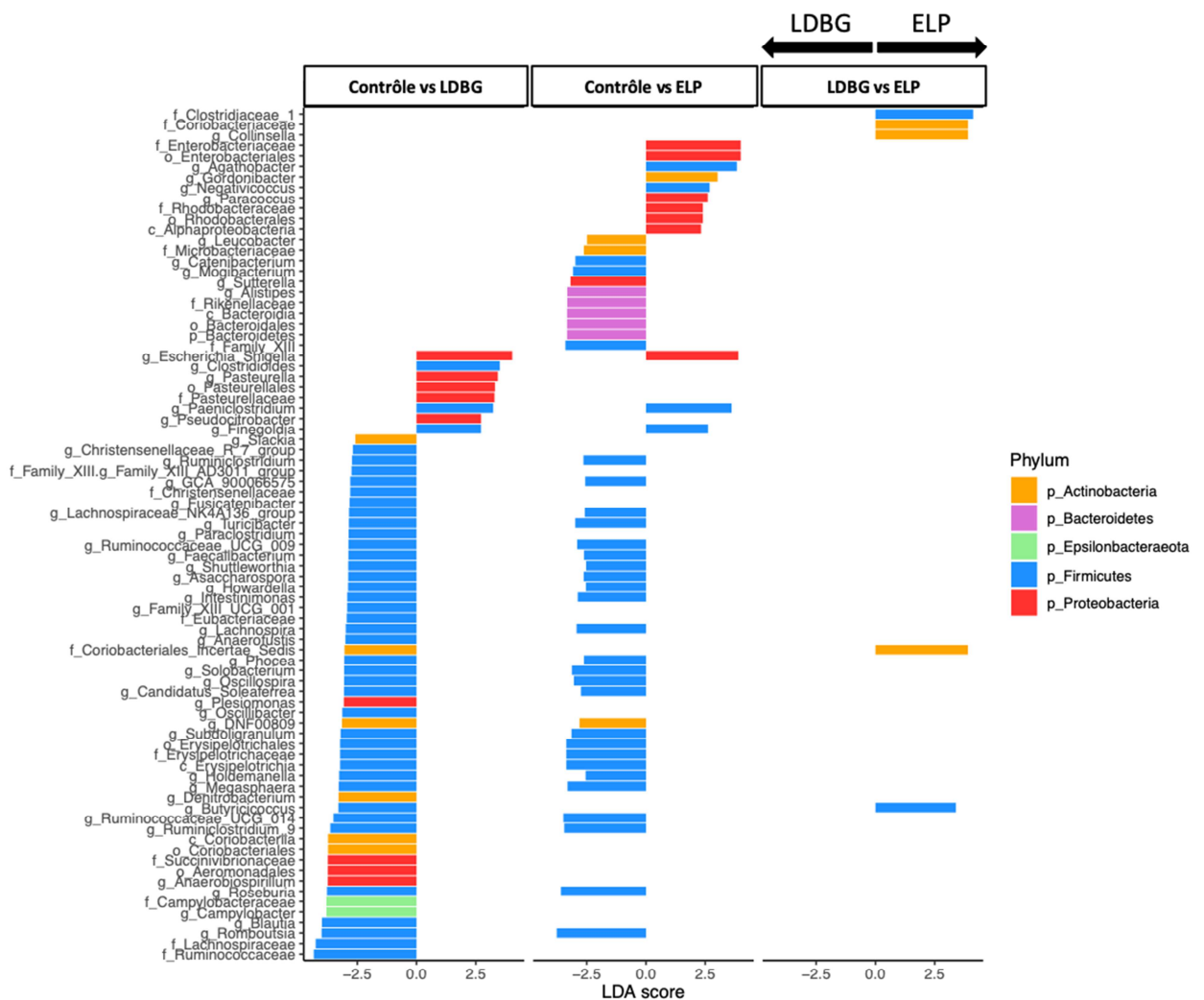


Figure 25 : Abondance différentielle : Différence minimale entre les chats du groupe LGAL ceux du groupe ELP.

Une réduction de la diversité du microbiote est commune aux deux pathologies félines étudiées (LDBG et ELP). Il en résulte une perte significative de genres bactériens et ou

de grands groupes phylogénétiques bénéfiques (Firmicutes) ainsi qu'une augmentation de germes pathogènes (Protéobactéries) lors d'entéropathie inflammatoire ou de lymphoprolifération de bas grade. Bien que non identiques, les profils pathologiques inflammatoire vs néoplasique présente un important degré de communauté et il n'a pas été possible de discriminer les deux entités dans cette étude.

A partir des données obtenues, une modélisation mathématique appliquée à une cohorte de validation prospective pourrait permettre un séquençage plus ciblé du microbiote et conduire à l'obtention d'une signature moléculaire spécifique au lymphome. Potentiellement, un nouveau biomarqueur des lymphomes de bas grade pourrait émerger de ce travail. Enfin, une étude spécifique pourrait être focalisée sur le phylum Actinobacteria (notamment *collinsella* et *coriobacteriaceae*)



## 4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

### 4.1 Vers un nouveau modèle de lymphomagenèse ?

#### 4.1.1 Le LDBG : un modèle pertinent de GI-TLPD

Il a été suggéré par Moore *et al.* que le LDBG félin se rapprocherait d'avantage des MEITL (anciennement EATL de type 2) que des EATL (anciennement EATL de type 1)<sup>68</sup>. Les EATL de type 1 se caractérisent par la présence de moyens à grands lymphocytes néoplasiques, par opposition aux petits lymphocytes tumoraux observés chez les chats atteints de T-LGIL. Les MEITL (10-20 % des EATL) sont caractérisées par une population monomorphe de lymphocytes T de taille moyenne avec une expression fréquente de CD56 contrairement aux EATL de type 1. Dans notre série, le marquage CD56 était négatif chez la grande majorité des cas. Dans l'étude de Moore *et al.*, le marquage CD56 n'avait pas été réalisé. Notre travail met en évidence davantage de caractéristiques communes avec les GI-LPDs, en prenant en compte la dernière classification WHO publiée. Nos données permettent donc de valider le LDBG félin comme un modèle animal spontané pertinent de GI-TLPD humaines, en prenant en compte la dernière classification WHO publiée.

#### 4.1.2 Implication de la voie STAT5 dans les lymphoproliférations digestives

##### 4.1.2.1 Anomalies oncogéniques

Dans notre étude, nous avons montré chez les chats atteints de LDBG une activation spécifique de la voie STAT5 aux dépens de la voie STAT3. Nous ne connaissons pour l'instant pas les causes de cette activation. L'activation de la voie STAT5 peut être liée avec des mutations activatrices du gène *STAT5B*. Ceci a été décrit dans plusieurs entités de lymphome T telles que le lymphome T cutané, la leucémie à grands lymphocytes granuleux, le lymphome T hépato-splénique  $\gamma\delta$ , les lymphomes NK/T ou encore la leucémie prolymphocytaire T<sup>175</sup>.

Concernant plus spécifiquement les lymphomes T digestifs, les mutations de *STAT5B* sont retrouvées dans les MEITL avec une fréquence comprise entre 40 et 60% des cas mais ne sont pas observées dans les EATL<sup>12,176,177</sup>. Une étude récente a analysé le profil mutationnel des GI-TLPD. Aucune mutation de *STAT5A/B* n'a été détectée chez les 10

patients analysés<sup>17</sup>. En revanche, des fusions *JAK2-STAT3* conduisant à l'activation de la voie *STAT5* ont été observées dans plus de la moitié des lymphoproliférations indolentes *CD4+*<sup>17,20</sup>. Toutefois, des mutations de *STAT3* sont également observées chez ce type de patients, suggérant que, chez l'homme, une voie n'est pas privilégiée par rapport à l'autre. De plus, l'activation de la voie *JAK/STAT* est en réalité non spécifique et commune à de nombreuses entités de lymphome T/NK, qu'elles présentent ou non des mutations de la voie *JAK/STAT*. Elle peut en effet être liée à l'augmentation locale de la production de cytokines  $\gamma$ c ou à un défaut des régulateurs négatifs de la voie telle que les membres de la famille *SOCS*<sup>175</sup>.

#### 4.1.2.2 Une nouvelle piste thérapeutique ?

La dysrégulation de la voie *JAK/STAT* qui a été mise en évidence dans notre étude au sein de la cohorte de chats atteints de LDBG pourrait représenter une cible thérapeutique potentiellement bénéfique aux deux espèces.

Cette dernière peut être ciblée par plusieurs types de molécules (Figure 26) :

- Inhibiteurs des *JAK* kinases : tofacitinib, ruxolitinib
- Inhibiteurs de *STAT*
- Anticorps neutralisant les cytokines  $\gamma$ c (anti IL-2, IL-15 et IL-21)
- Anticorps bloquant les récepteurs (Anti-IL-2R $\alpha$ , daclizumab, basiliximab, IL-2/IL-15R $\beta$ , Hu-Mik- $\beta$ -1)
- Micromolécules inhibitrices empêchant les interactions des récepteurs aux cytokines avec leurs ligands (BNZ-1, H9-RETR)

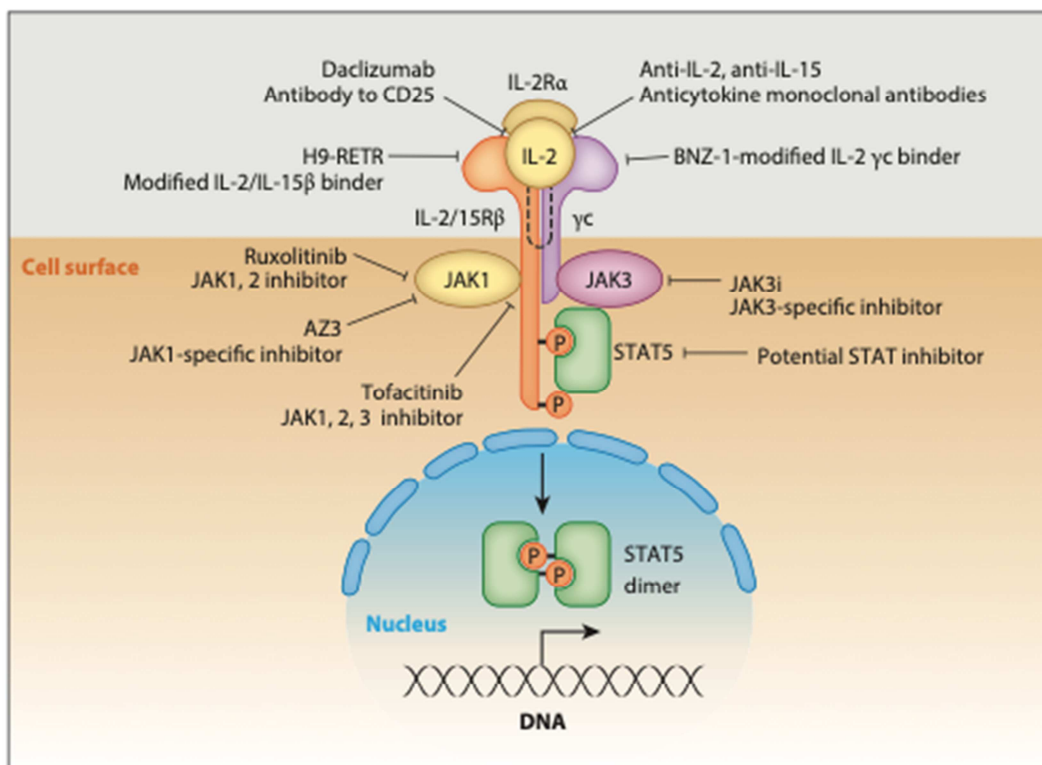


Figure 26 : Illustration schématique des molécules pouvant cibler la voie JAK/STAT dans un contexte de lymphoprolifération T. D'après Waldmann<sup>175</sup>.

Seuls quelques cas isolés de LGL<sup>197</sup> ou TPLL<sup>198</sup> ont été traités par inhibiteurs de la voie JAK/STAT<sup>197</sup>. Il n'y a actuellement pas d'essai clinique publié concernant les patients atteints de lymphome T. Le ruxolitinib fait actuellement l'objet d'une étude multicentrique de phase II chez les patients avec lymphome T périphérique<sup>196</sup>.

#### 4.1.3 Modèle de lymphomagenèse

Les lymphomes non hodgkiniens sont des maladies multifactorielles pour lesquelles un certain nombre de facteurs étiologiques ont déjà été identifiés : immunodépression, prédisposition familiale, facteurs environnementaux (pesticides, radiations ionisantes, UV, etc...), infection (bactéries, virus), dysimmunité<sup>178</sup>. Outre ces facteurs de risque, plusieurs anomalies moléculaires plus ou moins spécifiques de tel ou tel sous type de lymphome ont également été rapportées<sup>179</sup>.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons obtenu des résultats suggérant que la pathogenèse des LDBG félines pourrait au moins en partie être liée à un phénomène de stimulation antigénique chronique à l'origine d'une réponse immune anormale au niveau

digestif. La stimulation chronique par l'antigène, que celui-ci soit un autoantigène ou un antigène exogène, peut en effet être à l'origine d'un environnement pro-inflammatoire qui stimule la prolifération cellulaire et favorise l'acquisition ultérieure de mutations oncogéniques. Ce phénomène est bien décrit dans certains types de lymphomes.

#### 4.1.3.1 Exemples de stimulation antigénique chronique dans les lymphomes

##### a) Lymphome du MALT gastrique et Helicobacter Pylori

Un premier exemple est le lymphome du MALT gastrique associé à la bactérie, *Helicobacter pylori*. *H. pylori* est en effet la première cause de ce type de lymphomes puisqu'elle est retrouvée dans la quasi-totalité des cas. L'efficacité de l'antibiothérapie d'éradication dans le traitement des lymphomes aux stades précoces est par ailleurs un argument fort en faveur d'un lien de causalité<sup>180</sup>. La physiopathologie des lymphomes associés à *H. pylori* repose sur un processus multi-étapes.

La première étape consiste en une prolifération polyclonale de lymphocytes B. Celle nécessite la coopération de lymphocytes T spécifiques d'*H. pylori* qui vont stimuler les lymphocytes B via la signalisation CD40-CD40 ligand<sup>181</sup>. Dans ce cadre, les antigènes reconnus par les lymphocytes B lymphomateux peuvent être soit des antigènes bactériens soit des auto-antigènes présentant un mimétisme moléculaire avec les antigènes bactériens<sup>182</sup>. De plus, l'infection par *H. pylori* est à l'origine d'une réponse inflammatoire qui va participer à la mise en place d'un microenvironnement favorisant le développement tumoral. En effet, les cellules de la muqueuse vont libérer des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines qui vont participer au recrutement des lymphocytes B. La production de dérivés réactifs de l'oxygène dans ce contexte inflammatoire peut favoriser la survenue de mutations de l'ADN potentiellement oncogènes. Enfin, l'acquisition d'anomalies génétiques ou épigénétiques va donner un avantage sélectif au clone B et le rendre indépendant de la stimulation antigénique chronique<sup>183</sup>. Parmi ces anomalies génétiques, on peut citer la translocation t(11;18) retrouvée fréquemment dans les lymphomes du MALT<sup>180</sup>. Elle est à l'origine d'une protéine de fusion API2-MALT1 capable d'activer la voie NF-κB, voie centrale à la fois impliquée dans l'inflammation et l'activation B.

#### b) IPSID et *Campylobacter jejuni*

Un autre exemple concerne *Campylobacter jejuni* et son association à la maladie immunoproliférative de l'intestin grêle (IPSID), anciennement appelée maladie des chaînes lourdes  $\alpha$ <sup>185</sup>. L'IPSID atteint préférentiellement les adultes jeunes et correspond à une infiltration de l'intestin grêle par une population mixte de cellules d'aspect centrocytique et de plasmocytes qui sécrètent une chaîne lourde alpha d'immunoglobuline monotypique tronquée qui n'est pas associée à une chaîne légère. Les caractéristiques histologiques sont similaires à celles du lymphome gastrique du MALT, à l'exception d'une différenciation plasmocytaire plus marquée au niveau intestinal.

La physiopathologie de ces lymphomes n'a pas encore été complètement élucidée. Il a été suggéré que la toxine cytoléthale du *C. jejuni* engendrerait des cassures double-brin de l'ADN qui pourraient favoriser le développement de cellules B mutées, différenciées en cellules plasmocytaires aberrantes produisant des chaînes lourdes tronquées<sup>186</sup>. L'absence de région variable à la surface des cellules B mutées leur permettrait ensuite d'échapper au système immunitaire anti-tumoral. La plupart des stades précoces d'IPSID répondent à l'antibiothérapie, confirmant le rôle de cette bactérie dans la pathogenèse de ces lymphomes<sup>186</sup>.

#### c) Lymphomes et pathologies dysimmunitaires

Par ailleurs, des associations entre pathologies dysimmunitaires et lymphomes ont été rapportées. Il existe en particulier un sur-risque de lymphome dans trois des principales maladies auto-immunes systémiques : la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique (LES) et le syndrome de Gougerot Sjögren primitif (SSp) avec un risque relatif évalué respectivement à 2, 3 et 15 à 20<sup>187</sup>.

La physiopathologie du lymphome de MALT des glandes salivaires associé au SSp a été particulièrement bien étudiée. Le premier évènement consiste en une stimulation antigénique chronique par des auto-antigènes (SSA/Ro, SSB/La ou autres) qui survient dans des centres germinatifs ectopiques des glandes salivaires. Celle-ci entraîne la production de complexes immuns qui stimuleraient secondairement des cellules B à activité facteur rhumatoïde de la zone marginale. De plus, la sécrétion de BAFF, une cytokine produite en excès chez les patients atteints de SSp, par l'environnement et les cellules B elles-mêmes, favorise la survie de ces clones via des boucles autocrines et paracrines. Enfin, des anomalies

somatiques ou germinales de *TNFAIP3*, un régulateur négatif de la voie NFκB, retrouvées chez presque 80% des patients SSp atteints de lymphomes du MALT, seraient à l'origine d'une activation de la voie NFκB, permettant ainsi la survie des cellules B et l'acquisition de mutations oncogéniques<sup>188</sup>.

#### d) Lymphome digestif T et maladie coéliquaue

Concernant les lymphomes digestifs de phénotype T, un exemple bien caractérisé de stimulation antigénique chronique est celui de l'EATL qui survient par définition chez des patients atteints de maladie coéliquaue. Celle-ci se caractérise par une accumulation de lymphocytes intraépithélicaux (LIE) cytotoxiques qui est responsable de l'atrophie villositaire.

Les données actuelles attribuent un rôle clé à l'interleukine 15 (IL-15), une cytokine surexprimée dans l'intestin des patients avec maladie coéliquaue. L'IL15 est impliquée à plusieurs niveaux. Elle diminue la réponse des cellules effectrices T CD8+ à l'immuno-régulation par les lymphocytes T régulateurs et le TGFβ. Elle exerce également un effet anti-apoptotique via l'induction d'une cascade impliquant la phosphorylation de JAK3 et STAT5 et également en stimulant la transcription de la protéine anti-apoptotique BCL XL<sup>189</sup>. L'IL15 active aussi les LIE cytotoxiques en induisant la transcription du granzyme B et en régulant positivement NKG2D. Enfin, l'IL15 augmente la production d'IFNγ par les lymphocytes CD4+ et les LIE<sup>190</sup>. Par ailleurs, la maladie coéliquaue se caractérise par une activation des lymphocytes T CD4+ en réponse aux peptides dérivés du gluten présentés par le HLA-DQ2 ou HLA-DQ8. Ces lymphocytes vont sécréter des cytokines telles que l'IL2 qui vont agir en synergie avec l'IL15 et induire l'expansion et l'activation de LIE cytotoxiques, responsable des dommages au niveau de la muqueuse digestive<sup>190</sup>.

Une fraction de patients atteints de MC peut devenir résistante au régime sans gluten et on parle alors de sprue réfractaire (SR) clonale. Récemment, il a été montré que les cellules de SR dérivent de LIE ayant un profil de cellules innées. Ces cellules proviennent de précurseurs lymphoïdes qui initient leur différenciation T dans l'épithélium digestif en réponse au signal NOTCH mais subissent ensuite une reprogrammation vers un profil de cellule innée en présence d'IL15. En effet, l'IL15 induit la transcription du granzyme B qui clive Notch en un peptide inactif sur le plan transcriptionnel. Ceci entraîne la répression des gènes cibles de Notch, indispensables à la différenciation T, et conduit à la reprogrammation en cellules innées qui néanmoins conservent une expression intra cytoplasmique du CD3 et

un TCR réarrangé. Dans un second temps, les cellules de SR acquièrent des mutations gains de fonction de *JAK1* ou *STAT3* qui leur confèrent un avantage sélectif et permet leur expansion<sup>191</sup>.

#### *4.1.3.2 Modèle proposé pour la lymphomagenèse du LDBG*

La synthèse des données de notre cohorte de 22 chats présentant une lymphoprolifération -que nous validons comme un modèle pertinent de GI-TLPD de l'homme- nous permet d'énoncer les faits suivants. D'après notre nouvelle caractérisation histologique et immunohistochimique, les LDBG félines naissent probablement au sein de l'épithélium (gradient, épithéliotropisme...). De plus, les arguments en faveur d'un continuum histologique entre une inflammation chronique et une lymphoprolifération sont multiples (durée d'évolution des signes cliniques plus longue dans le groupe lymphome que dans le groupe ELP, présence de polynucléaires neutrophiles (cryptite neutrophilique dans 14% des cas de LDBG), « patchy disease »)

Au vu de ces éléments et sur la base des différents exemples présentés ci-dessus, nous proposons donc un modèle de lymphomagenèse multi-étapes pouvant s'appliquer au LDBG félin (Figure 27). La première étape consisterait en une stimulation antigénique chronique, suggérée par la présence d'un gradient apico-basal. L'antigène incriminé pourrait être d'origine alimentaire ou infectieuse (bactérie ? virus ?). Ceci conduirait à l'expansion d'une population lymphocytaire T (CD4 et/ou CD8) spécifique de cet antigène et à la sécrétion de cytokines permettant le recrutement de cellules immunitaires et inflammatoires (monocytes, polynucléaires neutrophiles, plasmocytes, macrophages, etc....) qui à leur tour, stimuleraient la prolifération des lymphocytes T. Secondairement, la survenue d'évènements génétiques et/ou épigénétiques additionnels (par exemple anomalies de la voie JAK/STAT conduisant à l'activation de la voie STAT5) permettrait l'émergence du clone T et favoriserait sa transformation et son expansion. Malgré son manque de spécificité, la voie JAK/STAT est reconnue comme majeure dans l'oncogenèse des lymphoproliférations T. Une autre partie de notre travail pour poursuivre la caractérisation de la lymphomagenèse sera d'identifier les activateurs de la voie JAK/STAT en cause lors de LDBG.

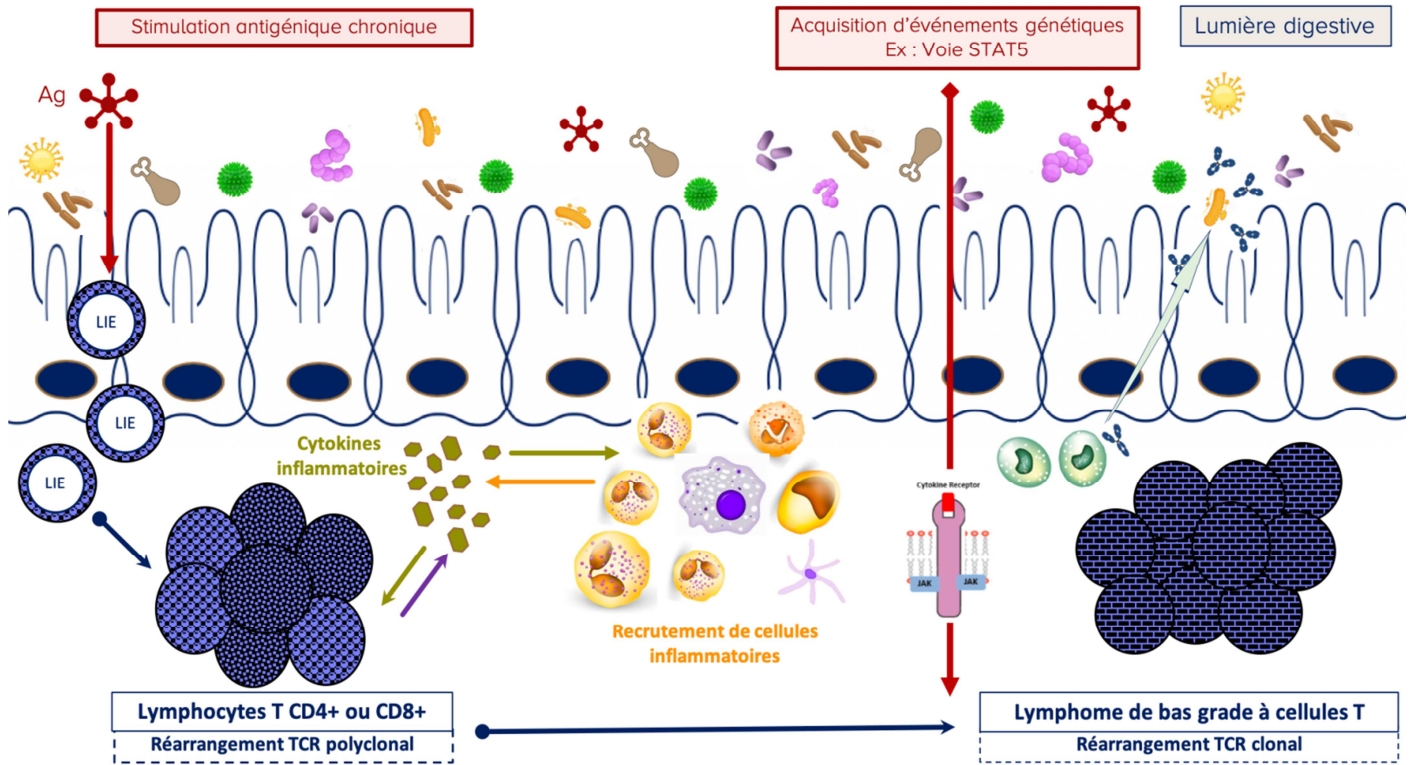


Figure 27 : Modèle proposé pour la lymphomagenèse du LDBG félin

Chez l'homme, le développement de lymphomes digestifs primitifs intestinaux sur des patients traités pour une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (maladie de Crohn dans 60% des cas) a fait l'objet de plusieurs études. Il est clair que les patients atteints de maladie Crohn sous thiopurines ont un risque significativement augmenté de développer un lymphome non hodgkinien (SIR à 49,5)<sup>199,200</sup>. En revanche, ceci ne semble plus être le cas chez les patients naïfs de tout immunosuppresseur<sup>199,201</sup>. Néanmoins, l'inflammation chronique est associée à un sur-risque d'adénocarcinome chez les patients atteints d'une maladie de Crohn<sup>202</sup>. De plus, les lymphomes digestifs survenant chez ces patients sont majoritairement positifs pour l'EBV<sup>199, 200,203</sup>. Il a donc été suggéré que l'inflammation chronique locale pourrait être à l'origine de la sécrétion de cytokines immunosuppressives qui favoriserait la prolifération clonale de cellules infectées par l'EBV<sup>203</sup>. Les mécanismes mis en jeu dans la lymphomagenèse associée aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont sans doute encore multifactoriels et font intervenir plusieurs acteurs tels que l'inflammation chronique, l'infection à EBV et/ou l'immunosuppression induite par les traitements<sup>199</sup>.



De façon intéressante, quelques cas d'entéropathie inflammatoire ou auto-immune préexistantes ont été rapportées dans la littérature chez les patients atteints de GI-TLPD (maladie de Crohn :  $n=3^{17,23}$ , maladie coéliqua :  $n=1^{27}$ , entéropathie auto-immune :  $n=1^{27}$ ). Notre modèle pourrait donc s'appliquer également aux GI-TLPD humaines au moins dans un certain nombre de cas.

## 4.2 Poursuite du travail

Notre travail a permis de confirmer que le LDBG était un modèle animal spontané pertinent pour l'étude des GI-TLPD humaines. Afin de préciser les événements impliqués dans l'oncogenèse moléculaire de ces lymphomes, nous avons réalisé un WGS et un RNA seq chez 20 chats atteints de LDBG (Centre national de génotypage, Évry, financement France Génomique).

La première version du génome du chat (taux de couverture X 1.9) a été annotée pour la première fois en 2007 en séquençant des banques d'ADN de plasmides et fosmidés issus d'une chatte femelle Abyssin<sup>188</sup>. La dernière version (*Felis catus* v9.0) a été publiée en novembre 2017. Celle-ci comporte 19587 gènes qui présentent une homologie avec l'homme pour plus de 80% d'entre eux<sup>185,190</sup>. Il n'existe à l'heure actuelle pas de bases de données publiques des polymorphismes présents chez le chat et en particulier, spécifiques à chaque race. Afin d'identifier des événements spécifiques à la tumeur et éliminer les variants germinaux, nous avons donc décidé de séquencer pour chaque chat, la tumeur et un tissu non tumoral (sang ou ganglion non infiltré), de façon à ce que chaque chat soit son propre contrôle.

Le WGS et le RNA seq ont donc été réalisés par paires appariées (tissu tumoral / tissu normal) sur l'ADN et l'ARN de 20 chats présentant un LDBG. Pour chacun des chats, l'ADN et l'ARN ont été extraits à partir de biopsies congelées, réalisées principalement par laparotomie exploratrice (19/20) ou par endoscopie. Ces 20 chats appartiennent à la même cohorte de LDBG que celle décrite dans la partie « résultats ».

Les analyses préliminaires réalisées au CNG ont montré une bonne qualité des acides nucléiques extraits. La profondeur obtenue pour les WGS est de 100X et environ 200 millions

de reads ont été générés pour chaque RNA seq. L'analyse bio-informatique de ces données est actuellement en cours et aura pour objectifs :

- Pour le WGS : identification de variants ponctuels (substitutions, insertions et délétions de petite taille), et structuraux (translocations, inversions, insertions, délétions, anomalies du nombre de copies)
- Pour le RNA seq : analyse du profil d'expression génique, détection de transcrits alternatifs, identification de transcrits de fusion, détection de séquences virales

Compte tenu des résultats obtenus en immunohistochimie qui montrent une activation de la voie STAT5 dans 100% des cas de LDBG, nous allons par ailleurs orienter spécifiquement les analyses sur cette voie. Nous allons tout d'abord rechercher en RNA Seq une dérégulation de la voie JAK/STAT5 afin de confirmer nos résultats. Nous allons ensuite chercher des évènements génétiques (mutations, amplifications, transcrits de fusion) pouvant expliquer cette dérégulation et impliquant STAT5 lui-même, des activateurs de la voie (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2) ou des régulateurs négatifs tels que la famille des SOCS.

Compte tenu de l'implication connue de pathogènes et en particulier de virus dans les lymphomes, nous avons également prévu d'identifier la présence de pathogènes viraux transcriptionnellement actifs dans les lésions. Nous avons prévu de collaborer avec un laboratoire spécialisé de l'Institut Pasteur. Les séquences issues du RNA-seq seront comparées à une base exhaustive de protéines virales (RVDB). En cas de résultat positif, la distribution de ces séquences d'ARN sera vérifiée 1) par comparaison avec les lymphocytes périphériques des mêmes chats 2) par comparaison avec le tissu intestinal sain des chats chez qui ces séquences sont exprimées dans la tumeur. En cas de résultat impliquant un rétrovirus, la séquence du provirus sera recherchée dans les résultats de WGS par alignement avec la séquence dérivée du RNA-seq.

## 5 CONCLUSION

Au cours ce travail, nous avons montré que le LDBG, une maladie émergente depuis 25 ans dans l'espèce féline, présentait des caractéristiques histologiques et immunohistochimiques très similaires à celles des GI-TLPD de l'homme et en faisait donc un très bon modèle d'étude de la pathologie humaine.

Nos résultats dans l'espèce féline suggèrent un possible *continuum* entre entéropathie inflammatoire et lymphoprolifération de bas grade, ce qui constituerait un nouveau modèle de lymphomagenèse.

L'activation de la voie STAT5, identifiée chez 100% des chats du groupe lymphome, pourrait représenter un événement additionnel dans l'histoire de la maladie qui contribuerait à la transformation tumorale. Par ailleurs, la détection d'une activation constante de STAT5 ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques chez le chat mais également chez l'homme.

Dans la suite du travail, les résultats obtenus par l'analyse pangénomique et pantranscriptomique permettront probablement d'identifier des anomalies récurrentes essentielles pour la lymphomagenèse féline ainsi que d'éventuelles cibles thérapeutiques. A terme, l'objectif est de pouvoir transférer les données obtenues dans l'espèce féline chez l'homme de façon à mieux comprendre les GI-TLPD et améliorer la prise en charge des patients.

A l'instar des quelques études déjà publiées, la globalité de ce travail confirme l'intérêt majeur de l'animal de compagnie et notamment du chat, comme modèle naturel de cancers pour l'homme.

## 6 BIBLIOGRAPHIE

1. Foukas PG, de Leval L. Recent advances in intestinal lymphomas. *Histopathology*. 2015;66(1):112-136.
2. Howell J, Auer-Grzesiak I, Zhang J, et al. Increasing Incidence Rates, Distribution and Histological Characteristics of Primary Gastrointestinal Non-Hodgkin Lymphoma in a North American Population. *Can J Gastroenterol*. 2012;26(7):452–456.
3. Kim S, Choi C, Mun Y-C, et al. Multicenter retrospective analysis of 581 patients with primary intestinal non-hodgkin lymphoma from the Consortium for Improving Survival of Lymphoma (CISL). *Bmc Cancer*. 2011;11(1):321.
4. Matysiak-Budnik T, Fabiani B, Hennequin C, et al. Gastrointestinal lymphomas: French Intergroup clinical practice recommendations for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCO, SFED, SFRO, SFH). *Digest Liver Dis*. 2018;50(2):124–131.
5. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390.
6. Lepage C, Bouvier A-M, Manfredi S, Dancourt V, Faivre J. Incidence and Management of Primary Malignant Small Bowel Cancers: A Well-defined French Population Study. *Am J Gastroenterology*. 2006;101(12):ajg2006526.
7. Margolskee E, Jobanputra V, Lewis SK, et al. Indolent small intestinal CD4+ T-cell lymphoma is a distinct entity with unique biologic and clinical features. *Plos One*. 2013;8(7):e68343.
8. Delabie J, Holte H, Vose JM, et al. Enteropathy-associated T-cell lymphoma: clinical and histological findings from the international peripheral T-cell lymphoma project. *Blood*. 2011;118(1):148-155.
9. Ondrejka S, Jagadeesh D. Enteropathy-Associated T-Cell Lymphoma. *Curr Hematol Malig R*. 2016;11(6):504-513.
10. Ranheim E, Jones C, Zehnder J, Warnke R, Yuen A. Spontaneously relapsing clonal, mucosal cytotoxic T-cell lymphoproliferative disorder: case report and review of the literature. *The American journal of surgical pathology*. 2000;24(2):296-301.
11. Malamut G, Chandesris O, Verkarre V, et al. Enteropathy associated T cell lymphoma in

celiac disease: A large retrospective study. *Digest Liver Dis.* 2013;45(5):377-384.

12. Roberti A, Dobay M, 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(1):12602.

13. Tan S-Y, Chuang S-S, Tang T, et al. Type II EATL (epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma): a neoplasm of intra-epithelial T-cells with predominant CD8 $\alpha$  phenotype. *Leukemia.* 2013;27(8):1688.

14. Chan J, Chan A, Cheuk W, et al. Type II Enteropathy-Associated T-Cell Lymphoma. *Am J Surg Pathology.* 2011;35(10):1557–1569.

15. Carbonnel F, Lavergne A, Messing B, et al. Extensive small intestinal T-cell lymphoma of low-grade malignancy associated with a new chromosomal translocation. *Cancer.* 1994;73(4):1286-1291.

16. Guo L, Wen Z, Su X, Xiao S, Wang Y. Indolent T-cell lymphoproliferative disease with synchronous diffuse large B-cell lymphoma: A case report. *Medicine.* 2019;98(17):e15323.

17. Soderquist CR, Patel N, Murty VV, et al. Genetic and phenotypic characterization of indolent T-cell lymphoproliferative disorders of the gastrointestinal tract. *Haematologica.* 2019; 104:xxx. [Epub ahead of print]

18. Wang X, Ng C-S, Chen C, Yu G, Yin W. An unusual case report of indolent T-cell lymphoproliferative disorder with aberrant CD20 expression involving the gastrointestinal tract and bone marrow. *Diagn Pathol.* 2018;13(1):82.

19. Perry AM, Bailey NG, Bonnett M, Jaffe ES, Chan WC. Disease Progression in a Patient With Indolent T-Cell Lymphoproliferative Disease of the Gastrointestinal Tract. *Int J Surg Pathol.* 2018;27(1):1066896918785985.

20. Sharma A, Oishi N, Boddicker RL, et al. Recurrent STAT3-JAK2 fusions in indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the gastrointestinal tract. *Blood.* 2018;131(20):2262-2266.

21. Matnani R, Ganapathi KA, Lewis SK, et al. Indolent T- and NK-cell lymphoproliferative disorders of the gastrointestinal tract: a review and update. *Hematol Oncol.* 2017;35(1):3-16.

22. Leventaki V, Jr. JT, Luthra R, et al. Indolent peripheral T-cell lymphoma involving the gastrointestinal tract. *Hum Pathol.* 2014;45(2):421-426.

23. Perry AM, Warnke RA, Hu Q, et al. Indolent T-cell lymphoproliferative disease of the gastrointestinal tract. *Blood*. 2013;122(22):3599-3606.
24. Said J. T-cell LPD of the GIT: first do no harm. *Blood*. 2013;122(22):3548 3550.
25. Egawa N, Fukayama M, Kawaguchi K, et al. Relapsing oral and colonic ulcers with monoclonal T-cell infiltration. A low- grade mucosal T-lymphoproliferative disease of the digestive tract. *Cancer*. 1995;75(7):1728 1733.
26. Carbonnel F, d'Almagne H, Lavergne A, et al. The clinicopathological features of extensive small intestinal CD4 T cell infiltration. *Gut*. 1999;45(5):662 667.
27. Malamut G, Meresse B, Kaltenbach S, et al. Small intestinal CD4+ T-cell lymphoma is a heterogenous entity with common pathology features. *Clin Gastroenterol H*. 2014;12(4):599 608.e1.
28. Zivny J, Banner BF, Agrawal S, Pihan G, Barnard GF. CD4+ T-cell lymphoproliferative disorder of the gut clinically mimicking celiac sprue. *Digestive diseases and sciences*. 2004;49(4):551 555.
29. 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*. 2007;451(6):1091 1093.
30. Hirakawa K, Fuchigami T, Nakamura S, et al. Primary gastrointestinal T-cell lymphoma resembling multiple lymphomatous polyposis. 1996;111(3):778 782.
31. Mendes L, Attygalle AD, Cunningham D, et al. CD4-positive small T-cell lymphoma of the intestine presenting with severe bile-acid malabsorption: a supportive symptom control approach. *Brit J Haematol*. 2014;167(2):265 269.
32. van Dongen J, Langerak A, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257.
33. 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.
34. Carbonnel F, d'Almagne H, Lavergne A, et al. The clinicopathological features of

extensive small intestinal CD4 T cell infiltration. *Gut*. 1999;45(5):662 667.

35. Baumgärtner AK, Zettl A, Chott A, et al. High Frequency of Genetic Aberrations in Enteropathy-Type T-Cell Lymphoma. *Lab Invest*. 2003;83(10):1509.

36. Cellier C, Delabesse E, Helmer C, et al. Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Lancet*. 2000;356(9225):203–208.

37. Russell KJ, Beatty JA, Dhand N, et al. Feline low-grade alimentary lymphoma: how common is it?: *J Feline Med Surg*. 2012;14(12):910 912.

38. Lingard AE, Briscoe K, Beatty JA, et al. Low-Grade Alimentary Lymphoma: Clinicopathological Findings and Response to Treatment in 17 Cases: *J Feline Med Surg*. 2009;11(8):692 700.

39. Sabattini S, Bottero E, Turba M, et al. Differentiating feline inflammatory bowel disease from alimentary lymphoma in duodenal endoscopic biopsies. *J Small Anim Pract*. 2016;57(8):396 401.

40. Willard MD. Alimentary neoplasia in geriatric dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Animal Pract*. 2012;42(4):693 706-vi.

41. Barrs V, Beatty J. Feline alimentary lymphoma: 1. Classification, risk factors, clinical signs and non-invasive diagnostics. *J Feline Med Surg*. 2012;14(3):182 190.

42. Gieger T. Alimentary Lymphoma in Cats and Dogs. *Vet Clin North Am Small Animal Pract*. 2011 ; 41(2): 419 432.

43. Victor P. Caractérisations clinique, paraclinique, histologique, immunohistochimique et clonalité lymphoïde comparées du lymphome T digestif de bas grade et de la maladie inflammatoire chronique idiopathique de l'intestin sur un panel prospectif de 44 chats (2016-2019). *THÈSE Pour le DOCTORAT VÉTÉRINAIRE Présentée et soutenue publiquement devant LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL Le 25 juin 2019.*

44. Barrs V, Beatty J. Feline alimentary lymphoma. *J Feline Med Surg*. 2012;14(3):191–201.

45. Kiselow MA, Rassnick KM, Nough SP, et al. Outcome of cats with low-grade lymphocytic lymphoma: 41 cases (1995-2005). *J Am Vet Med Assoc*. 2008;232(3):405 410.

46. Valli V, Jacobs R, Norris A, et al. The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. *J Vet*

*Diagn Invest.* 2000;12(4):295 306.

47. Paulin M, Beguin J, GOE R, FREICHE V. Les lymphomes digestifs félines : épidémiologie, clinique et diagnostic. *Le Point Vétérinaire*.

48. Wolfesberger B, Fuchs-Baumgartinger A, Gress V, et al. World Health Organisation Classification of Lymphoid Tumours in Veterinary and Human Medicine: A Comparative Evaluation of Gastrointestinal Lymphomas in 61 Cats. *J Comp Pathol.* 2018; 159:1 10.

49. Wilson HM. Feline Alimentary Lymphoma: Demystifying the Enigma. *Top Companion Anim M.* 2008;23(4):177 184.

50. CHINO J, FUJINO Y, KOYASHI T, et al. Cytomorphological and Immunological Classification of Feline Lymphomas: Clinicopathological Features of 76 Cases. *J Vet Med Sci.* 2013;75(6):701–707.

51. Paulin MV, Couronné L, Beguin J, et al. Feline low-grade alimentary lymphoma: an emerging entity and a potential animal model for human disease. *Bmc Vet Res.* 2018;14(1):306.

52. COURT E, WATSON A, PEASTON A. Retrospective study of 60 cases of feline lymphosarcoma. *Aust Vet J.* 1997;75(6):424–427.

53. Richter KP. Feline gastrointestinal lymphoma. *Vet Clin North Am Small Animal Pract.* 2003;33(5):1083–1098.

54. Fondacaro J, Richter K, Carpenter J, Gastroenterol HJ, 1999. Feline gastrointestinal lymphoma: 67 cases (1988–1996). *Eur. J. Comp. Gastroenterology.* .

55. Ruaux C, Steiner J, Williams D. Early biochemical and clinical responses to cobalamin supplementation in cats with signs of gastrointestinal disease and severe hypocobalaminemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 2005;19(2):155 160.

56. Penninck DG, Moore AS, Tidwell AS, Matz ME, Freden GO. ULTRASONOGRAPHY OF ALIMENTARY LYMPHOSARCOMA IN THE CAT. *Vet Radiol Ultrasound.* 1994;35(4):299 306.

57. Daniaux LA, Laurenson MP, Marks SL, et al. Ultrasonographic thickening of the muscularis propria in feline small intestinal small cell T-cell lymphoma and inflammatory bowel disease. *J Feline Med Surg.* 2014;16(2):89 98.

58. Gaschen L. Ultrasonography of small intestinal inflammatory and neoplastic diseases in



dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Animal Pract.* 2011;41(2):329-344.

59. Gianella P, Pietra M, Crisi P, journal of BP, 2017. Evaluation of clinicopathological features in cats with chronic gastrointestinal signs. *degruyter.com.* .

60. Zwingenberger A, Marks S, Baker T, Moore P. Ultrasonographic Evaluation of the Muscularis Propria in Cats with Diffuse Small Intestinal Lymphoma or Inflammatory Bowel Disease. *J Vet Intern Med.* 2010;24(2):289-292.

61. Penninck D. Atlas of small animal ultrasonography. 2015;

62. Linton M, Nimmo JS, Norris JM, et al. Feline gastrointestinal eosinophilic sclerosing fibroplasia: 13 cases and review of an emerging clinical entity. *J Feline Med Surg.* 2015;17(5):392-404.

63. Evans SE, Bonczynski JJ, Broussard JD, Han E, Baer KE. Comparison of endoscopic and full-thickness biopsy specimens for diagnosis of inflammatory bowel disease and alimentary tract lymphoma in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2006;229(9):1447-1450.

64. Smith AL, Wilson AP, Hardie RJ, Krick EL, Schmiedt CW. Perioperative complications after full-thickness gastrointestinal surgery in cats with alimentary lymphoma. *Vet Surg.* 2011;40(7):849-852.

65. Ettinger SN. Principles of treatment for feline lymphoma. *Clin Tech Small An P.* 2003;18(2):98-102.

66. Sato H, Fujino Y, Chino J, et al. Prognostic Analyses on Anatomical and Morphological Classification of Feline Lymphoma. *J Vet Medical Sci.* 2014;76(6):807–811.

67. Briscoe K, Krockenberger M, Beatty J, et al. Histopathological and Immunohistochemical Evaluation of 53 Cases of Feline Lymphoplasmacytic Enteritis and Low-Grade Alimentary Lymphoma. *J Comp Pathol.* 2011;145(2–3):187-198.

68. Moore P, Rodriguez-Bertos A, Kass P. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality. *Vet Pathol.* 2012;49(4):658-668.

69. Pohlman L, Higginbotham M, Welles E, Johnson C. Immunophenotypic and Histologic Classification of 50 Cases of Feline Gastrointestinal Lymphoma: *Vet Pathol.* 2009;46(2):259-268.

70. Carreras JK, Goldschmidt M, Lamb M, et al. Feline Epitheliotropic Intestinal Malignant

Lymphoma: 10 Cases (1997–2000). *J Vet Intern Med.* 2003;17(3):326 331.

71. Jergens AE. Feline Idiopathic Inflammatory Bowel Disease: What we know and what remains to be unraveled. *J Feline Med Surg.* 2012;14(7):445 458.

72. Kiupel M, Smedley R, Pfent C, et al. Diagnostic algorithm to differentiate lymphoma from inflammation in feline small intestinal biopsy samples. *Vet Pathol.* 2011;48(1):212 222.

73. Roccabianca P, Woo J, Moore P. Characterization of the diffuse mucosal associated lymphoid tissue of feline small intestine. *Vet Immunol Immunop.* 2000;75(1–2):27 42.

74. Moore PF, Woo JC, Vernau W, Kosten S, Graham PS. Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Vet Immunol Immunop.* 2005;106(3–4):167 178.

75. Waly N, Gruffydd-Jones T, Stokes C, Day M. Immunohistochemical Diagnosis of Alimentary Lymphomas and Severe Intestinal Inflammation in Cats. *J Comp Pathol.* 2005;133(4):253 260.

76. Patterson-Kane J, Kugler PB, Francis K. The Possible Prognostic Significance of Immunophenotype in Feline Alimentary Lymphoma: a Pilot Study. *J Comp Pathol.* 2004;130(2–3):220 222.

77. Noland EL, Kiupel M. Coexpression of CD3 and CD20 in Canine Enteropathy-Associated T-cell Lymphoma: *Vet Pathol.* 2018;55(2):241 244.

78. Rahemtullah A, Longtine JA, Harris N, et al. CD20+ T-cell lymphoma: clinicopathologic analysis of 9 cases and a review of the literature. *Am J Surg Pathology.* 2008;32(11):1593 1607.

79. Matnani RG, Stewart RL, Pulliam J, Jennings CD, Kesler M. Peripheral T-Cell Lymphoma with Aberrant Expression of CD19, CD20, and CD79a: Case Report and Literature Review. *Case Reports Hematology.* 2013;2013(3):183134 5.

80. Misra D, Bhardwaj M, Bahuguna G, Malhotra V. An unusual case of enteropathy-associated T-cell lymphoma with CD20 positivity. *Indian J Pathol Micr.* 2014;57(4):658 659.

81. Keller S, Vernau W, Moore P. Clonality Testing in Veterinary Medicine: A Review with Diagnostic Guidelines. *Vet Pathol.* 2016;53(4):711 725.

82. Andrews C, Operacz M, Maes R, Kiupel M. Cross Lineage Rearrangement in Feline

Enteropathy-Associated T-cell Lymphoma: *Vet Pathol.* 2015;53(3):559 562.

83. Weiss TA, Klopffleisch R, Gruber A. T-cell receptor  $\gamma$  chain variable and joining region genes of subgroup 1 are clonally rearranged in feline B- and T-cell lymphoma. *J Comp Pathol.* 2011;144(2–3):123 134.

84. Couto GC. What is new on feline lymphoma? *J Feline Med Surg.* 2001;3(4):171 176.

85. Louwerens M, London CA, Pedersen NC, Lyons LA. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 2005;19(3):329 335.

86. Gabor L, Malik R, Canfield P. Clinical and anatomical features of lymphosarcoma in 118 cats. *Aust Vet J.* 1998;76(11):725 732.

87. Risetto K, Villamil AJ, Selting KA, Tyler J, Henry CJ. Recent trends in feline intestinal neoplasia: an epidemiologic study of 1,129 cases in the veterinary medical database from 1964 to 2004. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2011;47(1):28 36.

88. Stützer B, Simon K, Lutz H, et al. Incidence of persistent viraemia and latent feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma. *J Feline Med Surg.* 2011;13(2):81 87.

89. Weiss AA, Klopffleisch R, Gruber AD. Prevalence of feline leukaemia provirus DNA in feline lymphomas. *J Feline Med Surg.* 2010;12(12):929 935.

90. Shelton G, Grant C, Cotter S, et al. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections and their relationships to lymphoid malignancies in cats: a retrospective study (1968-1988). *J Acq Immun Def Synd.* 1990;3(6):623–30.

91. Kaye S, Wang W, Miller C, et al. Role of Feline Immunodeficiency Virus in Lymphomagenesis--Going Alone or Colluding? *Ilar J.* 2016;57(1):24 33.

92. McLuckie AJ, Barrs VR, Lindsay S, et al. Molecular Diagnosis of *Felis catus* Gammaherpesvirus 1 (FcaGHV1) Infection in Cats of Known Retrovirus Status with and without Lymphoma. *Viruses.* 2018;10(3):128.

93. Bridgeford EC, Marini RP, Feng Y, et al. Gastric *Helicobacter* species as a cause of feline gastric lymphoma: a viable hypothesis. *Vet Immunol Immunop.* 2008;123(1–2):106 113.

94. Hoehne S, Nough S, Rishniw M, Simpson K. Identification of Mucosa-Invading and Intravascular Bacteria in Feline Small Intestinal Lymphoma. *Vet Pathol.* 2017;54(2):234 241.

95. Mahony O, Moore A, Cotter S, et al. Alimentary lymphoma in cats: 28 cases (1988-1993). *J Am Vet Med Assoc.* 1995;207(12):1593–8.
96. Bertone ER, Snyder LA, Moore AS. Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. *American journal of epidemiology.* 2002;156(3):268–273.
97. Masuoka H, Shimada K, Kiyosue-Yasuda T, et al. Transition of the intestinal microbiota of cats with age. *Plos One.* 2017;12(8):e0181739.
98. Suchodolski JS, Foster ML, Sohail MU, et al. The Fecal Microbiome in Cats with Diarrhea. *Plos One.* 2015;10(5):e0127378.
99. Ramadan Z, Xu H, Laflamme D, et al. Fecal Microbiota of Cats with Naturally Occurring Chronic Diarrhea Assessed Using 16S rRNA Gene 454-Pyrosequencing before and after Dietary Treatment. *J Vet Intern Med.* 2014;28(1):59–65.
100. Farinha P, Gascoyne RD. Helicobacter pylori and MALT Lymphoma. *Gastroenterology.* 2005;128(6):1579–1605.
101. Kempf W, Kazakov DV, Hübscher E, et al. Cutaneous borreliosis associated with T cell–predominant infiltrates: A diagnostic challenge. *J Am Acad Dermatol.* 2015;72(4):683–689.
102. He Z, Gharaibeh RZ, Newsome RC, et al. Campylobacter jejuni promotes colorectal tumorigenesis through the action of cytolethal distending toxin. *Gut.* 2019;68(2):289.
103. McNab A. The 2017 Doyne Lecture: the orbit as a window to systemic disease. *Eye.* 2018;32(2):248–261.
104. Garraway K, Johannes CM, Bryan A, et al. Relationship of the mucosal microbiota to gastrointestinal inflammation and small cell intestinal lymphoma in cats. *J Vet Intern Med.* 2018;32(5):1692–1702.
105. Stein TJ, Pellin M, Steinberg H, Chun R. Treatment of feline gastrointestinal small-cell lymphoma with chlorambucil and glucocorticoids. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2010;46(6):413–417.
106. Vanhooren V, Libert C. The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Res Rev.* 2013;12(1):8–21.
107. Muñoz-Lorente MA, Cano-Martin AC, Blasco MA. Mice with hyper-long telomeres show less metabolic aging and longer lifespans. *Nat Commun.* 2019;10(1):4723.

108. Schuh J. Trials, Tribulations, and Trends in Tumor Modeling in Mice. *Toxicol Pathol.* 2004;32(1-suppl):53–66.
109. Teicher BA. Tumor Models in Cancer Research. 2001.
110. Mélinda L. Les modèles murins de cancers : Synthèse bibliographique et contribution à la mise en place d'un modèle orthotopique de cancer du côlon pour des études précliniques d'évaluation thérapeutique.
111. Vail DM, Macewen GE. Spontaneously Occurring Tumors of Companion Animals as Models for Human Cancer. *Cancer Invest.* 2009;18(8):781–792.
112. Tamazian G, Simonov S, Dobrynin P, et al. Annotated features of domestic cat – *Felis catus* genome. *Gigascience.* 2014;3(1):13.
113. Montague MJ, Li G, Gandolfi B, et al. Comparative analysis of the domestic cat genome reveals genetic signatures underlying feline biology and domestication. *Proc National Acad Sci.* 2014;111(48):17230–17235.
114. Porrello A, Cardelli P, Spugnini E. Pet models in cancer research: general principles. *J Exp Clin Cancer Res Cr.* 2004;23(2):181–93.
115. Callaway E. 'I can haz genomes': cats claw their way into genetics. *Nat News.* 2015;517(7534):252.
116. Cannon CM. Cats, Cancer and Comparative Oncology. *Vet Sci.* 2015;2(3):111–126.
117. Thomas R. Cytogenomics of Feline Cancers: Advances and Opportunities. *Vet Sci.* 2015;2(3):246–258.
118. Withrow S, Powers B, Straw R, Wilkins R. Comparative aspects of osteosarcoma. Dog versus man. *Clin Orthop Relat R.* 1991;(270):159–68.
119. Wilkerson AJ, Teeling EC, Troyer JL, et al. Coronavirus outbreak in cheetahs: Lessons for SARS. *Curr Biol.* 2004 ;14(6): R227–R228.
120. Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D, et al. Avian H5N1 Influenza in Cats. *Science.* 2004;306(5694):241–241.
121. Angstadt AY, Thayanithy V, Subramanian S, Modiano JF, Breen M. A genome-wide

approach to comparative oncology: high-resolution oligonucleotide aCGH of canine and human osteosarcoma pinpoints shared microaberrations. *Cancer Genet.* 2012;205(11):572–587.

122. Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(2):147–156.

123. Khanna C, Lindblad-Toh K, Vail D, et al. The dog as a cancer model. *Nat Biotechnol.* 2006;24(9):1065–1066.

124. Gavazza A, Presciuttini S, Barale R, Lubas G, Gugliucci B. Association Between Canine Malignant Lymphoma, Living in Industrial Areas, and Use of Chemicals by Dog Owners. *J Vet Intern Med.* 2001;15(3):190–195.

125. Richards KL, Suter SE. Man's best friend: what can pet dogs teach us about non-Hodgkin's lymphoma? *Immunol Rev.* 2015;263(1):173–191.

126. Su Y, Nielsen D, Zhu L, et al. Gene selection and cancer type classification of diffuse large-B-cell lymphoma using a bivariate mixture model for two-species data. *Hum Genomics.* 2013;7(1):2.

127. Dickinson PJ, LeCouteur RA, Higgins RJ, et al. Canine spontaneous glioma: A translational model system for convection-enhanced delivery. *Neuro-oncology.* 2010;12(9):928–940.

128. Glickman LT, Domanski LM, Maguire TG, Dubielzig RR, Churg A. Mesothelioma in pet dogs associated with exposure of their owners to asbestos. *Environ Res.* 1983;32(3):305–313.

129. Osto M, Zini E, Reusch C, Lutz T. Diabetes from humans to cats. *Gen Comp Endocr.* 2013;182:48–53.

130. Lyons LA, Biller DS, Erdman CA, et al. Feline Polycystic Kidney Disease Mutation Identified in PKD1. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(10):2548–2555.

131. Menotti-Raymond M, David VA, Schäffer AA, et al. Mutation in CEP290 Discovered for Cat Model of Human Retinal Degeneration. *J Hered.* 2007;98(3):211–220.

132. Bienzle D. FIV in cats – a useful model of HIV in people? *Vet Immunol Immunop.* 2014;159(3–4):171–179.

133. Miller C, Abdo Z, Ericsson A, Elder J, VandeWoude S. Applications of the FIV Model to Study HIV Pathogenesis. *Viruses*. 2018;10(4):206.
134. Cannon CM, Trembley JH, Kren BT, et al. Therapeutic Targeting of Protein Kinase CK2 Gene Expression in Feline Oral Squamous Cell Carcinoma: A Naturally Occurring Large-Animal Model of Head and Neck Cancer†. *Hum Gene Ther Cl Dev*. 2017;28(2):80–86.
135. Maria R, Olivero M, Lussich S, et al. Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer. *Cancer research*. 2005;65(3):907–912.
136. Santos S, Bastos E, Baptista CS, et al. Sequence Variants and Haplotype Analysis of Cat ERBB2 Gene: A Survey on Spontaneous Cat Mammary Neoplastic and Non-Neoplastic Lesions. *Int J Mol Sci*. 2012;13(3):2783–2800.
137. Reif JS. Animal Sentinels for Environmental and Public Health. *Public Health Rep*. 2011;126(1\_suppl):50–57.
138. Schmidt PL. Companion Animals as Sentinels for Public Health. *Vet Clin North Am Small Animal Pract*. 2009;39(2):241–250.
139. Fazzi R, Manetti C, Focosi D, et al. Areas with high soil percolation by herbicides have higher incidence of low-grade non-Hodgkin lymphomas. *Ann Hematol*. 2010;89(9):941–943.
140. Takashima-Uebelhoer BB, Barber LG, Zagarins SE, et al. Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human non-Hodgkin’s lymphoma. *Environ Res*. 2012;112: 171–176.
141. Kelsey JL, Moore AS, Glickman T. Epidemiologic Studies of Risk Factors for Cancer in Pet Dogs. *Epidemiol Rev*. 1998;20(2):204–217.
142. Rogers N. Canine clues: Dog genomes explored in effort to bring human cancer to heel. *Nat Med*. 2015;21(12):1374.
143. Zatz M, Vieira NM, Zucconi E, et al. A normal life without muscle dystrophin. *Neuromuscular Disord*. 2015;25(5):371–374.
144. Vieira NM, Elvers I, Alexander MS, et al. Jagged 1 Rescues the Duchenne Muscular Dystrophy Phenotype. *Cell*. 2015;163(5):1204–1213.
145. Lyons LA, Creighton EK, Alhaddad H, et al. Whole genome sequencing in cats, identifies

- new models for blindness in AIPL1 and somite segmentation in HES7. *Bmc Genomics*. 2016;17(1):265.
146. Ito D, Frantz AM, Modiano JF. Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Vet Immunol Immunop*. 2014;159(3–4):192–201.
147. Shapiro S, Raghunath S, Williams C, et al. Canine urothelial carcinoma: genomically aberrant and comparatively relevant. *Chromosome Res*. 2015;23(2):311–331.
148. Roode SC, Rotroff D, Avery AC, et al. Genome-wide assessment of recurrent genomic imbalances in canine leukemia identifies evolutionarily conserved regions for subtype differentiation. *Chromosome Res*. 2015;23(4):681–708.
149. Poorman K, Borst L, Moroff S, et al. Comparative cytogenetic characterization of primary canine melanocytic lesions using array CGH and fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res*. 2015;23(2):171–186.
150. Rowell JL, McCarthy DO, Alvarez CE. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol Med*. 2011;17(7):380–388.
151. Gordon IK, Khanna C. Modeling Opportunities in Comparative Oncology for Drug Development. *Ilar J*. 2010;51(3):214–220.
152. LeBlanc A, Breen M, Choyke P, et al. Perspectives from man's best friend: National Academy of Medicine's Workshop on Comparative Oncology. *Sci Transl Med*. 8(324)
153. Gordon I, Paoloni M, Mazcko C, Khanna C. The Comparative Oncology Trials Consortium: Using Spontaneously Occurring Cancers in Dogs to Inform the Cancer Drug Development Pathway. *Plos Med*. 2009;6(10):e1000161.
154. Hahn K, Ogilvie G, et al. Masitinib is Safe and Effective for the Treatment of Canine Mast Cell Tumors. *J Vet Intern Med*. 2008;22(6):1301–1309.
155. Hahn KA, Legendre AM, Shaw NG, et al. Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. *Am J Vet Res*. 2010;71(11):1354–1361.
156. Cadot P, Hensel P, Bensignor E, et al. Masitinib decreases signs of canine atopic dermatitis: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Vet Dermatol*. 2011;22(6):554–564.



157. Adenis A, Blay J-Y, Bui-Nguyen B, et al. Masitinib in advanced gastrointestinal stromal tumor (GIST) after failure of imatinib: A randomized controlled open-label trial. *Ann Oncol*. 2014;25(9):1762–1769.
158. Cesne A, Blay J-Y, Bui B, et al. Phase II study of oral masitinib mesilate in imatinib-naïve patients with locally advanced or metastatic gastro-intestinal stromal tumour (GIST). *Eur J Cancer*. 2010;46(8):1344–1351.
159. Deplanque G, Marchi, Hebbar M, et al. A randomized, placebo-controlled phase III trial of masitinib plus gemcitabine in the treatment of advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(6):1194–1200.
160. Vermersch P, Benrabah R, Schmidt N, et al. Masitinib treatment in patients with progressive multiple sclerosis: a randomized pilot study. *Bmc Neurol*. 2012;12(1):36.
161. Bermingham EN, Young W, Butowski CF, et al. The Fecal Microbiota in the Domestic Cat (*Felis catus*) Is Influenced by Interactions Between Age and Diet; A Five-Year Longitudinal Study. *Front Microbiol*. 2018;9: 1231.
162. Ritchie LE, Steiner JM, Suchodolski JS. Assessment of microbial diversity along the feline intestinal tract using 16S rRNA gene analysis. *Fems Microbiol Ecol*. 2008;66(3):590–598.
163. et J.Y DP. Le Microbiote intestinal. Rapport de l'Académie Nationale de Médecine 2015. *Rapport de l'Académie de Médecine*. .
164. Honneffer JB, Minamoto Y, Suchodolski JS. Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World J Gastroenterol*. 2014;20(44):16489–16497.
165. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc National Acad Sci*. 2008;105(43):16731–16736.
166. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, et al. A Pyrosequencing Study in Twins Shows That Gastrointestinal Microbial Profiles Vary With Inflammatory Bowel Disease Phenotypes. *Gastroenterology*. 2010;139(6):1844-1854.e1.
167. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*. 2012;13(9):R79.

168. Preter V, Machiels K, Joossens M, et al. Faecal metabolite profiling identifies medium-chain fatty acids as discriminating compounds in IBD. *Gut*. 2015;64(3):447.
169. Pascal V, Pozuelo M, Borrueal N, et al. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut*. 2017;66(5):813.
170. Pontius J, Mullikin J, Smith D, et al. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Res*. 2007;17(11):1675–1689.
171. Longeri M, Chiodi A, Brilli M, et al. Targeted genotyping by sequencing: a new way to genome profile the cat. *Anim Genet*. 2019.
172. Garraway K, Johannes C, Bryan A et al. Relationship of the mucosal microbiota to gastrointestinal inflammation and small cell intestinal lymphoma in cats. *J Vet Intern Med*. 2018; 32:1692–1702.
173. Pope K, Tune A, McNeil C et al. Outcome and toxicity assessment of feline small cell lymphoma: 56 cases (2000–2010). *Veterinary Medicine and Science* 2015;1(2), 51–62
174. Doorenspleet ME, Westera L, Peters CP et al. Profoundly expanded T-cell clones in the inflamed and uninfamed intestine of patients with Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2017;11:831–9.
175. Waldmann TA. and Chen J. Disorders of the JAK/STAT Pathway in T Cell Lymphoma Pathogenesis: Implications for Immunotherapy. *Annu. Rev Immunol*. 2017; 35:533-550.
176. 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):2245-2247
177. Küçük C, Jiang B, Hu X, et al. Activating mutations of *STAT5B* and *STAT3* in lymphomas derived from  $\gamma\delta$ -T or NK cells. *Nat Commun*. 2015; 6(1):6025
178. Müller AM, Ihorst G, Mertelsmann R, et al. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution and geography. *Ann Hematol*. 2005; 84(1):1-12.
179. Pratap S, Scordino TS. Molecular and cellular genetics of non-Hodgkin lymphomas: Diagnostic and molecular implications. *Exp Mol Pathol*. 2019; 106:44-51.
180. Du, M.Q. and P.G. Isaccson, Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment. *Lancet Oncol*. 2002; 3(2): 97-104.

181. Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE et al. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet*, 1993; 342 (8871): 571-4.
182. Negrini R, Savio A, Poiesi C. Antigenic mimicry between *Helicobacter pylori* and gastric mucosa in the pathogenesis of body atrophic gastritis. *Gastroenterology*, 1996; 111(3): 655-65.
183. Suarez F, Lortholary O, Hermine O. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood*, 2006; 107(8): 3034-44.
184. Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I et al. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18) (q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* 1999; 93(11):3601-9.
185. Lecuit M, Abachin E, Martin A et al. Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. *N Engl J Med*. 2004; 350(3):239-48.
186. Al-Saleem T, Al-Mondhiry H. Immunoproliferative small intestinal disease (IPSID): a model for mature B-cell neoplasms. *Blood*. 2005 Mar 15;105(6):2274-80
187. Zintzaras, E., M. Voulgarelis, and H.M. Moutsopoulos. The risk of lymphoma development in autoimmune diseases: a meta-analysis. *Arch Intern Med*, 2005; 165(20): 2337-44.
188. Nocturne G, Mariette X. Sjögren Syndrome-associated lymphomas: an update on pathogenesis and management. *Br J Haematol*. 2015;168(3):317-27.
189. Malamut G, El Machhour R, Montcuquet N. 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.
190. Meresse B, Korneychuk N, Malamut G et al. Interleukin-15, a master piece in the immunological jigsaw of celiac disease. *Dig Dis*. 2015; 33(2): 122-30.
191. Ethersperger 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; 20;45(3):610-625.

192. Day MJ, Bilzer T, Mansell J, et al. Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *J. Comp. Pathol.* 2008; 138 Suppl 1, 1–43
193. Washabau RJ, Day MJ, Willard MD, et al. Endoscopic, Biopsy, and Histopathologic Guidelines for the Evaluation of Gastrointestinal Inflammation in Companion Animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 2010; 24(1), 10–26
194. Waldmann T. JAZK/STAT pathway directed therapy of T-cell leukemia/lymphoma: inspired by functional and structural genomics. *Mol Cell Endocrinol.* 2017; 451: 66-70.
195. Lu XH, Levine R, Tong W et al. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *PNAS.* 2005; 102(52):18962–67
196. Kallam E, Witzig T, Roschewski E et al. Phase-II multi-center study of ruxolitinib phosphate for the treatment of relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and peripheral T-cell lymphoma (PTCL). *Journal of Clinical Oncology.* 2019; 37, n°15.
197. Bilori B, Thota S, Clemente MJ et al. Tofacitinib as a novel salvage therapy for refractory T-cell large-cell granular leukemia. *Leukemia.* 2015; 29(12):2427-9.
198. Gomez-Arteaga A, Margolskee E, Wei MT et al. Combined use of tofacitinib (pan-JAK inhibitor) and ruxolitinib (a JAK1/2 inhibitor) for refractory T cell prolymphocytic leukemia (T-PLL) with a JAK3 mutation. *Leuk Lymphoma.* 2019; 60(7):1626-1631
199. Sokol H, Beaugerie L, Maynadié M et al. Excess primary intestinal lymphoproliferative disorders in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2012; 18 (11):2063-71.
200. Barzilai M, Polliack A, Avivi I et al. Hodgkin lymphoma of the gastrointestinal tract in patients with inflammatory bowel disease: Portrait of a rare clinical entity. *Leuk Res.* 2018; 71:1-5.
201. Smedby KE, Hjalgrim H, Askling J et al., Autoimmune and chronic inflammatory disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma by subtype. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98(1): 51-60.
202. Jess T, Gamborg M, Matzen P, et al. Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100: 2724–2729.

203. Wong NA, Herbst H, Herrmann K, et al. Epstein-Barr virus infection in colorectal neoplasms associated with inflammatory bowel disease: detection of the virus in lymphomas but not in adenocarcinomas. *J Pathol.* 2003; 201(2):312-8.

## 7 ANNEXE

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Feline low-grade alimentary lymphoma: an emerging entity and a potential animal model for human disease

Mathieu V Paulin<sup>1†</sup>, Lucile Couronné<sup>2,3,4†</sup>, Jérémy Beguin<sup>5</sup>, Sophie Le Poder<sup>6</sup>, Maxence Delverdier<sup>7</sup>, Marie-Odile Semin<sup>7</sup>, Julie Bruneau<sup>8,9</sup>, Nadine Cerf-Bensussan<sup>3,10</sup>, Georgia Malamut<sup>11,12</sup>, Christophe Cellier<sup>11,12</sup>, Ghita Benchekroun<sup>5</sup>, Laurent Tiret<sup>13</sup>, Alexander J German<sup>14</sup>, Olivier Hermine<sup>2,3,4</sup> and Valérie Freiche<sup>5\*</sup>

## Abstract

**Background:** Low-grade alimentary lymphoma (LGAL) is characterised by the infiltration of neoplastic T-lymphocytes, typically in the small intestine. The incidence of LGAL has increased over the last ten years and it is now the most frequent digestive neoplasia in cats and comprises 60 to 75% of gastrointestinal lymphoma cases. Given that LGAL shares common clinical, paraclinical and ultrasonographic features with inflammatory bowel diseases, establishing a diagnosis is challenging. A review was designed to summarise current knowledge of the pathogenesis, diagnosis, prognosis and treatment of feline LGAL. Electronic searches of PubMed and Science Direct were carried out without date or language restrictions.

**Results:** A total of 176 peer-reviewed documents were identified and most of which were published in the last twenty years. 130 studies were found from the veterinary literature and 46 from the human medicine literature. Heterogeneity of study designs and outcome measures made meta-analysis inappropriate. The pathophysiology of feline LGAL still needs to be elucidated, not least the putative roles of infectious agents, environmental factors as well as genetic events. The most common therapeutic strategy is combination treatment with prednisolone and chlorambucil, and prolonged remission can often be achieved. Developments in immunohistochemical analysis and clonality testing have improved the confidence of clinicians in obtaining a correct diagnosis between LGAL and IBD. The condition shares similarities with some diseases in humans, especially human indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the gastrointestinal tract.

**Conclusions:** The pathophysiology of feline LGAL still needs to be elucidated and prospective studies as well as standardisation of therapeutic strategies are needed. A combination of conventional histopathology and immunohistochemistry remains the current gold-standard test, but clinicians should be cautious about reclassifying cats previously diagnosed with IBD to lymphoma on the basis of clonality testing. Importantly, feline LGAL could be considered to be a potential animal model for indolent digestive T-cell lymphoproliferative disorder, a rare condition in human medicine.

**Keywords:** Comparative oncology, Cat, Inflammatory bowel disease, Human indolent digestive T-cell lymphoproliferative disorder

\* Correspondence: [valerie.freiche@vet-alfort.fr](mailto:valerie.freiche@vet-alfort.fr)

†Mathieu V Paulin and Lucile Couronné contributed equally to this work.

<sup>5</sup>Internal Medicine Department, Université Paris-Est, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France

Full list of author information is available at the end of the article



## Background

Lymphoma is a clonal expansion of neoplastic lymphocytes in solid organs and is the most common feline neoplasm [1–7]. Feline lymphomas are usually classified according to anatomical location, with various types recognised including mediastinal, multicentric, and extra-nodal. A final type, alimentary lymphoma (AL) targets the gastrointestinal tract with variable involvement of extra-intestinal sites including lymph nodes, liver, spleen [3, 4, 7, 8]. Not only is this the most common anatomical form of lymphoma (50 to 75%), it is also the most common alimentary neoplasia in cats [1–5, 8–19].

Several subtypes of AL can be defined according to the histological grade (low, intermediate or high), cell size (small or large) and phenotype (T or B) of the neoplastic lymphocytes [6, 8, 14, 18, 20–23]. Originally, lymphomas were classified according to the World Health Organization (WHO) scheme into Enteropathy-Associated T-cell Lymphoma (EATL) type 1 and 2. Recent studies in human medicine indicate that EATL consists of two diseases that are morphologically and genetically distinct. They also differ in how frequently they are associated with coeliac disease [24]: EATL type I (80–90% of EATL) is strongly associated with coeliac disease, has usually a large-cell or pleomorphic cytology and may express CD30 [24]. EATL type II (10–20% of EATL) is less frequently associated with coeliac disease and is characterised by monomorphic population with frequent expression of CD56 [24]. EATL type II has been recently renamed as Monomorphic Epitheliotropic T-cell Lymphoma (MEITL), calling into question its relationship with classical EATL and implying that it might be best to consider it as a separate entity [25].

The current classification system for this disease has been defined by Moore et al. and distinguishes two entities [6]: first, “mucosal lymphomas” which are usually low-grade forms of alimentary lymphoma (LGAL) and are predominantly of small T-cell type (nuclear diameter < 2 red cell diameters) that Moore et al. found to match the WHO entity EATL type II. Second, “transmural lymphomas”, which are more frequently high-grade alimentary lymphomas (HGAL) and are composed of small or large cells that can be of B- or T-cell type. Transmural intermediate to large-sized T-cell lymphomas would match the WHO entity EATL type I for Moore et al. When of large T-cell type, these lymphomas are mostly Large Granular Lymphocytic Lymphomas (LGLL) and express the cytotoxic granule protein, granzyme B. LGLL is less frequent, but the most aggressive subform of AL and can be considered as a separate histological sub-classification of AL with LGAL and HGAL [8, 26, 27].

LGAL may be the most common subtype in cats, representing 60 to 75% of AL [18–20]. However, the real incidence is not accurate since it is based upon a few

small sample studies. Moreover, for unknown reasons, it appears to be an emerging entity with an increasing incidence over the last ten years [8, 28]. The aim of this review is to provide an overview of current knowledge regarding the aetiology, clinical and biological presentation, diagnosis, treatment and prognosis of LGAL. Comparisons of this condition with the rare human disease, indolent T-cell lymphoproliferative disorder (LPD) of the gastrointestinal tract, will also be highlighted.

## Methods

Electronic searches of PubMed and Science Direct were carried out without date or language restrictions. A total of 176 peer-reviewed documents were identified and most of which were published in the last twenty years. 130 studies were found from the veterinary literature and 46 from the human medicine literature. Heterogeneity of study designs and outcome measures made meta-analysis inappropriate.

## Results

### Aetiopathogenesis

The aetiopathogenesis of feline LGAL is poorly understood. Several factors have been implicated as possible causes, but their involvement remains inconclusive, particularly considering the relationship with the AL histological grade and phenotype [14].

### Feline retroviruses

An infectious aetiology has been suggested because the risk of developing AL is greater in cats infected by feline retroviruses (feline leukaemia virus [FeLV] or feline immunodeficiency virus [FIV]). However, this hypothesis has been challenged on account of the fact that most lymphocytic cancers in all species are non-retroviral-associated [29].

FeLV infects the lymphoid tissue, intestine and bone marrow [3], and is suspected to be a major risk factor in development of leukaemia and lymphoma in cats, particularly T-cell lymphoma with a mediastinal location [30, 31]. Immunohistochemical studies have identified that 50 to 70% of all feline lymphomas are positive for FeLV [3, 7, 13, 32, 33] and its presence is associated with poor prognosis in all lymphoma subtypes [2, 34]. The exact mechanisms by which FeLV causes neoplastic transformation are not known but could be related to virus genome insertion, resulting in modulation of neighbouring oncogenic or tumour suppressor gene expression [30, 35]. Further, in contrast to multicentric lymphoma, the exact role of FeLV in development of AL is also unclear since it is inconsistently identified in AL cases [34, 36, 37], and many forms of lymphoma, including AL, can effectively develop without exposure to FeLV in pathogen-free cats [2, 10]. Over the past 30 years, circulating FeLV antigen has been observed in

2 to 30% of cats with AL [3, 20, 36–38] but, more recently, most AL cases do not have circulating FeLV antigen [13]. One possible explanation for this is the success of widespread implementation of test and vaccination programmes, which have helped to decrease FeLV prevalence in cats [2, 5, 20, 39].

Using immunohistochemistry (IHC), only 3% of AL tumours are positive for FeLV [20, 37, 40] although, in one study involving 25 cats with AL, alimentary lymphoma provirus sequences were detected in approximately 1/3 of B-cell AL and almost 2/3 of T-cell AL [36]. These latter findings suggest that FeLV may be present in a latent or replication-defective form in some cases [36, 40]. In contrast, no provirus form of FeLV was detected in another study involving 32 AL cases, 30 of which were FeLV-antigen-negative [38]. The discrepancies between both studies could be due to variability in assay sensitivity, with the higher prevalence of FeLV provirus detection in the first study possibly result of use of a highly-sensitive semi-nested PCR assay [36]. Additional epidemiological, functional and highly-sensitive molecular analyses are therefore required to clarify the role that FeLV plays in AL. In particular, it would be helpful to clarify the association between the presence of FeLV and different histological grades of AL, especially LGAL given its increasing prevalence.

Like human (HIV) and simian (SIV) immunodeficiency viruses [41–43], FIV can induce indirect immune dysregulation, resulting in partial loss of antitumoral immunity and ultimately promoting tumour development [3, 44, 45]. Studies have shown that FIV infection may increase the risk of developing various types of lymphoma, including AL [7, 14, 34, 46]. In addition, components of the FIV genome were detected in tissues from 7 of 8 AL that had developed in FIV-positive cats [47], 4 and 3 of which were B- and T-lymphoma, respectively. Various parts of the gastrointestinal tract were affected, and there was mesenteric lymph node involvement in 3 cats. However, unfortunately histological grade was not determined.

A final virus that has been implicated as an aetiological agent is the panlymphotropic *Felis catus* gammaherpesvirus 1 (FcaGHV1), and this virus is known to infect at least one quarter of cats. A possible role is plausible given the detection of two human gammaherpesviruses (Epstein-Barr and Kaposi's sarcoma-associated viruses) in some lymphoma cases [48, 49]. However, in one study, neither detection of FcaGHV1 DNA nor whole blood virus load was related to a diagnosis of lymphoma [50]. That said, the presence of circulating FcaGHV1 DNA was associated with significantly shorter survival compared with FcaGHV1 qPCR negative cases [50]. A limitation of this study was the fact that the criteria used to recruit lymphoma cases excluded lymphocytic

low-grade gastrointestinal lymphoma and, as a consequence, further studies are required.

### **Bacterial infections**

Over the last two decades, bacterial mucosal colonisation, particularly involving argyrophilic organisms such as *Helicobacter* spp., has been highlighted as a potential oncogenic factor in feline gastric cancer as a result of chronic antigenic stimulation [51, 52]. *Helicobacter pylori* infection is strongly associated with development of adenocarcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma in humans [53, 54]. The gastric mucosa of dogs is often colonised by non-*Helicobacter pylori* helicobacters. Although their pathogenic significance in dogs is poorly understood, there is evidence of *Helicobacter* spp. infection in laboratory beagle dogs resulting in gastric lymphoid follicle formation that is considered a precursor of MALT lymphoma in humans [55].

Gastric *Helicobacter heilmannii* (Hhe) strains were reported to promote feline gastric lymphoma in one study involving 47 cats, where respectively 14 out of 16 and 2 out of 16 lymphoblastic and lymphocytic lymphomas were positive for Hhe organisms (especially the Hhe2 and Hhe 4 strains) [52]. Amongst a population of 33 low-grade T-cell epitheliotropic small intestinal lymphomas, mucosa-invasive bacteria and serosal colonisation have been identified in 18% and 11% of cases, respectively. In comparison, of the 17 high grade small intestinal lymphomas, 14 (82%) were associated with mucosal-invasive bacteria, serosal colonisation was evident in 10 (57%), and intravascular bacteria were observed in 5 (29%) [56]. In contrast, bacteria were not detected in any of the cases of LGAL [56]. However, it remains unclear whether invasive bacteria might trigger the development of AL or are instead opportunistically colonising the damaged mucosa after AL has developed [56]. Further prospective studies are required to establish whether lymphomatous mucosa could be permissive for bacterial colonisation in this context.

### **Chronic inflammation**

It is suggested that chronic inflammation can increase the risk of developing AL, not least given that concurrent inflammatory bowel disease (IBD) has been described in up to 60% of AL cases [57–61], with many hypothesising that IBD may precede or promote digestive neoplasia [20, 38, 59, 62–66]. It has also been suggested that certain forms of human coeliac disease might actually represent low-grade intraepithelial T-cell malignant lymphoma rather than being a reactive T-cell proliferation [67, 68], and this has also been suggested for feline lymphoplasmacytic enteritis [20].

However, to date, there is no published veterinary evidence demonstrating the development of AL subsequent



to chronic intestinal inflammation. In one recent study, MDR1 gene expression (MDR1, which encodes an efflux pump membrane protein) and cyclo-oxygenase 2 (COX2) were assessed in cats with chronic enteropathies, and were found to be greater in cats with LGAL than in cats with IBD [63]. It is not possible to determine if increased MDR1 expression plays a role in the aetiopathogenesis of feline IBD and LGAL but these results could explain the necessity of a more aggressive therapy in the lymphoma [63]. However, human patients with IBD show reduced expression of MDR1 in the colon and over-expression of COX2 may be associated with cell proliferation and angiogenesis [69, 70].

#### Other factors

Chronic cigarette smoke exposure and geographic factors have been suggested to promote AL but reported cases were not further subdivided based upon grade [8, 11, 14, 71]. Dietary factors have also been implicated in the development of LGAL, although this is controversial, because there is no direct evidence for it [11, 29]. Further studies are required to clarify the role played by all such factors.

### Clinical presentation

#### Signalment

LGAL usually affects ageing cats (median age 13 years) [8, 28, 59, 60, 72–74], and some studies have suggested that male cats are predisposed [4, 11, 20, 40, 60]. The role of breed is less clear; to date, no specific association has consistently been found between breed and LGAL in cats, although domestic shorthair and Siamese are over-represented in some studies of AL, [59, 60, 73].

#### Clinical signs

LGAL has a chronic progressive course over weeks or months, with clinical signs (in order of frequency) including: weight loss (80–90%), vomiting (70–80%), anorexia (60–70%), diarrhoea (50–65%), and to a lesser extent, icterus, splenomegaly, polydipsia/polyuria and lethargy [2, 3, 7, 8, 14, 38, 59, 61, 62, 72, 75–78]. These signs are not pathognomonic and overlap with other alimentary and indeed non-alimentary diseases. Therefore, differential diagnosis requires excluding metabolic diseases, endocrinopathies, inflammatory diseases such as feline triaditis, infectious processes, and other neoplastic diseases. Given the fact that LGAL mainly affects older cats, potential comorbidities may complicate the clinical features. However, the major diagnostic challenge faced by clinicians is distinguishing LGAL from IBD (see Table 4) and other forms of AL. It is suggested that abdominal palpation can help because, in contrast to LGAL, aggressive forms of AL are more commonly associated with abdominal mass lesions, lymphadenomegaly, peritonitis or ascites

[1, 3, 7, 77]. Nevertheless, the findings of abdominal palpation do not reliably distinguish IBD and AL [2, 8, 17]. When LGAL is involved, thickened bowel loops may be identified, although this can also be a non-specific finding [8, 15]. Finally, it should be noted that abdominal palpation may also be normal in cats with LGAL [79].

#### Gastrointestinal location

In LGAL, lesions are diffuse rather than localised, and can be focal or multiple, affecting any component of the gastrointestinal tract including the stomach, small intestine or large intestine as well as the mesenteric lymph nodes, liver or spleen [2, 11, 14, 38, 59, 73]. Although all sections of the gastrointestinal tract can be affected by LGAL, the most common sites include the jejunum and the ileum, followed by the duodenum [6, 20, 59]. Gastric involvement is uncommon for this type of AL (see Table 1) [1, 6, 15, 20, 59, 74, 80, 81].

#### Diagnosis

As mentioned above, the clinical signs of LGAL are not pathognomonic making diagnosis challenging. During diagnostic investigations, metabolic diseases, endocrinopathies, infectious diseases, chronic cholangitis, pancreatitis, and exocrine pancreatic insufficiency should first be ruled out using clinicopathological testing and diagnostic imaging [79, 82]. Thereafter, LGAL should be differentiated from other gastrointestinal tract diseases such as food-responsive enteropathy (FRE) and IBD. Whilst dietary trials can usually eliminate FRE as a possible cause, distinguishing LGAL from IBD (such as lymphoplasmacytic enteritis [LPE] or eosinophilic enteritis [EE]) is more challenging because clinical signs, results of clinical pathology, diagnostic imaging findings, and even histological features can overlap [8, 11, 15, 60, 83–85]. Ultimately, more advanced diagnostic techniques such as immunohistochemistry and PCR for Antigen Receptor Rearrangement (PARR) are required to confirm the diagnosis.

#### Paraclinical data

Extensive tests are often required to distinguish LGAL from other diseases, and a typical investigation would involve haematology, serum biochemistry, urine and faecal analyses, total thyroxine concentration, diagnostic imaging and intestinal biopsies. Cats should also be tested

**Table 1** Segments of the gastrointestinal tract affected by low-grade alimentary lymphoma (LGAL)

Segments of the small intestine	Prevalence	Study
Duodenum	83% (10/12)	Lingard et al. [59]
Jejunum	100% (15/15)	Lingard et al. [59]
	86% (43/50)	Fondacaro et al. [20]
Ileum and ileocaecocolic junction	93% (13/14)	Lingard et al. [59]

for FeLV and FIV, given the previously-reported associations with AL [75], and serum folate and cobalamin concentrations should be measured to determine the presence of malabsorption.

### Biomarkers

Biomarkers that have been used in cases of AL are summarised in Table 2. To the authors' knowledge, no study has yet demonstrated the ability of paraclinical data to differentiate LGAL from IBD. However, failure to recognise and correct hypcobalaminaemia is known to delay clinical recovery, even when specific therapy for AL or IBD is instituted [82, 86]. Hypoalbuminaemia is reported in 70% of cats with AL, 49% with LGAL, and 77% with IBD respectively [20, 87]. The reason why hypoalbuminaemia is less common in LGAL, compared with other types of AL, is not known but might reflect the fact that mucosal integrity is preserved until later in the disease process [2, 8, 14]. In dogs, cytokine IL6 suppresses albumin synthesis and may be released by neoplastic cells [88], and this might contribute to the progressive hypoalbuminaemia observed in AL [88, 89]. Previous studies have documented the prevalence of hypcobalaminaemia in cats with gastrointestinal disease, with approximately a third of IBD cases being affected [82, 83, 87, 90–93]. Between 50 and 80% of LGAL are associated with hypcobalaminaemia (Ref.: > 290 ng/L) [2, 8, 11, 72, 75, 83, 87, 90, 94]. Not only is hypcobalaminaemia of diagnostic and prognostic significance, it can also exacerbate signs of diarrhoea, vomiting, anorexia, and weight loss, as well as causing weakness when severe.

### Ultrasonography

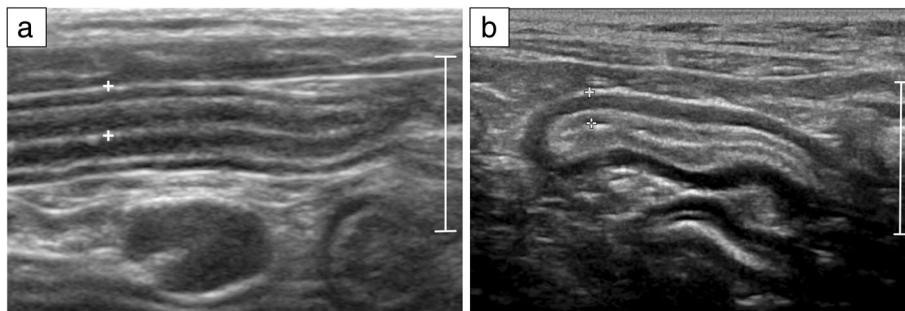
Abdominal ultrasonography allows reliable detection of focal or diffuse thickening as well as loss of the normal

layered appearance of the gastrointestinal wall (Fig. 1) [15, 95]. In addition, this imaging modality may reveal other LGAL-associated lesions, such as mesenteric lymphadenomegaly, hepatomegaly and splenomegaly [2]. The most common ultrasonographic finding is a diffuse thickening of muscular layer in the small bowel, and this characteristic is observed in 50–80% of cases [15, 59, 77, 95–97]. Unfortunately, given that this is also commonly observed in feline patients with IBD [98], ultrasonographic distinction between LGAL and IBD is not possible (Fig. 2 and Table 3). For example, in one study involving 22 cats with FRE, 17 with IBD and 17 with AL, there were no significant differences in ultrasonographic findings between the three groups [82]. Moreover, ultrasonography is less sensitive for the detection of small lesions of the gastrointestinal tract than is endoscopy [2]. Therefore, LGAL can never be excluded on the basis of a normal ultrasonographic examination and histological analysis is always required to make a definitive diagnosis [2, 95].

Thickening of the gastrointestinal wall is the most common lesion observed in AL (Fig. 2) [2]. However, although reference measurements for wall thickness have been reported in cats, clear diagnostic cut-points for either LGAL or IBD have not been reported [95, 99]. Potentially of more utility, is the identification of a thickened muscularis propria, which might be twice as thick as that seen in healthy cats [15]. Typically, the ratio of muscularis width to submucosal width in calculated, with measurements  $\geq 0.5$  being considered abnormal [15, 95]. This feature is reported to be common in feline LGAL [15, 82, 95], although it is not pathognomic because it is also reported in IBD [15, 82], particularly in eosinophilic enteritis (EE) [100]. That said, older cats with ultrasonographic evidence of muscularis propria thickening are more likely to have AL versus IBD [78, 95].

**Table 2** Description and prevalence of paraclinical data abnormalities reported in alimentary lymphoma (AL)

Data	Description	Paraclinical data	AL	
			Cases	Prevalence
Albumin	Biomarker of gastrointestinal protein loss [87]	Decreased [87]	LGAL	49% (21/43) [20]
Cobalamin (Vitamin B12)	Biomarker of absorption [8, 72, 83, 92, 170]	Decreased [87]	LGAL	50–80% [2, 8, 11, 72, 75, 83, 87, 90, 94]
			AL	35,3% (6/17) whose 12 LGAL [77]
Folate (Vitamin B9)	Biomarker of absorption and dysbiosis [8, 72, 83, 86, 92, 170]	Increased or decreased [82, 87]	LGAL	37% (10/27) > 21.6 ng/ml [72]
			AL	31% (4/13) < 9.7 ng/ml [83, 87]
Lactate dehydrogenase (LDH)	Biomarker of cellular necrosis [171]	Increased [172]	LGAL	47% (9/19) [172]
Fecal $\alpha 1$ proteinase inhibitor concentration	Biomarker of gastrointestinal protein loss [87]	Increased [87]	AL	100% (8/8) [87]
Total serum protein	Biomarker of gastrointestinal protein loss [87]	Decreased [87]	AL	100% (7/7) [87]



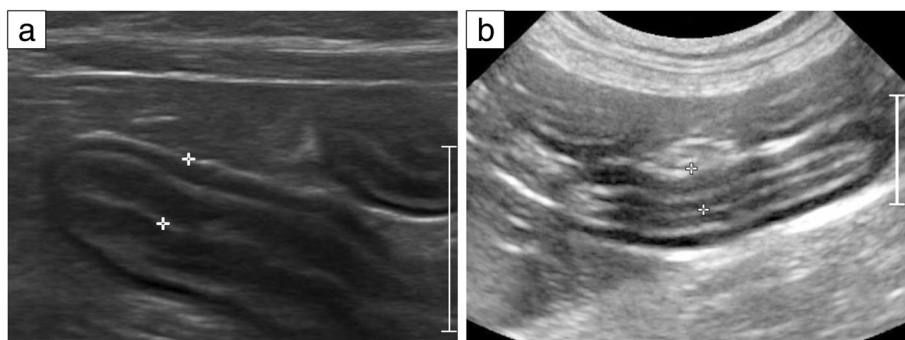
**Fig. 1** Ultrasonographic appearance of normal intestine (a) and low-grade alimentary lymphoma (LGAL) (b), longitudinal section. Note the marked thickening of the muscularis propria in the patient with LGAL (b) compared to a cat with a normal jejunal layering (a). The full thickness of both loops (between calipers) is within normal limits: normal jejunum 2.7 mm and LGAL jejunum 2.5 mm. Scale: 10 mm

Enlarged mesenteric lymph nodes are another common ultrasonographic finding [8, 82, 95, 101, 102]. In one retrospective study, mesenteric lymphadenomegaly was reported in 6 out of 10 AL cases, and 2 out of 12 IBD cases [77]. Mesenteric lymph node thickness can vary, with the average being 4 to 6 mm for jejunal lymph nodes and 5 mm for ileo-caecal lymph nodes [15, 99]. In AL, changes in lymph node size can be highly variable, ranging from minimal to markedly enlarged, although, in recent studies, moderate enlargement is most likely [2, 59, 77, 95, 96]. Mesenteric lymph node enlargement was reported in 17 LGAL cases in one study, with a mean diameter of 15.9 mm (range 6.5–30 mm) [59]. In a more recent study, colic lymph nodes in LGAL cats were reported to be 1.6-fold larger in size than those from healthy cats whereas jejunal lymph node hypertrophy was not systematically associated with LGAL [15].

**Endoscopy and coeliotomy**

Gastrointestinal endoscopy is an important investigative tool in feline gastroenterology providing the ability to access the stomach, duodenum, distal ileum and colon,

as well as allowing direct visualisation of the mucosa [75, 103]. Experienced endoscopists can often reach the proximal jejunum [103, 104]. It is a minimally invasive and rapid technique allowing macroscopic lesions to be described and multiple intestinal biopsy samples to be collected, albeit exclusively from mucosa or submucosa [15, 20, 72, 105]. Mucosal lesions that cannot be characterised by ultrasonographic examination may be identified by endoscopy [75, 106, 107]. Macroscopic differentiation between inflammatory lesions (congestion, oedema, mucosal fibrosis) and LGAL lesions is not possible by endoscopic examination [20, 107]. In addition, the jejunum and the proximal part of the ileum, which are the most frequent locations of LGAL, are often not accessible by endoscopy [105]. Evans et al. suggested exploratory coeliotomy may be preferable to endoscopy [77]. However, in their study involving 10 AL and 12 IBD, duodenal assessment was limited in half the cats and biopsies were performed blindly in 8 of the cats which might have contributed to the poor sensitivity of endoscopic biopsies. By obtaining endoscopic specimens of the jejunum and ileum, laparoscopy may improve the



**Fig. 2** Ultrasonographic images depicting a diffuse intestinal wall thickening in low-grade alimentary lymphoma (LGAL) (a) and inflammatory bowel disease (IBD) (b). a Cat with advanced LGAL (duodenum): a moderate thickening of the muscularis propria is observed. Full-thickness (between calipers): 3.7 mm. b Cat with IBD, eosinophilic enteritis (small intestine): note the similar ultrasonographic appearance of the intestine compared to LGAL aspect. Full thickness (between calipers): 3.9 mm. Scale: 10 mm

**Table 3** Comparison of ultrasonographic features observed in low-grade alimentary lymphoma (LGAL) and inflammatory bowel disease (IBD)

Ultrasonographic parameter	LGAL	IBD
Gastrointestinal wall thickness	Muscularis propria frequently thickened [8, 15, 59, 82, 95, 101]	Muscularis propria frequently thickened in eosinophilic enteritis (EE), possibly increased in lymphoplasmacytic enteritis (LPE) [15, 78, 82, 84, 95, 101]
Size of mesenteric lymph nodes	Lymphadenomegaly (> 5 mm) frequent but not systematic [8, 82, 95, 101, 102]	Lymphadenomegaly frequent but not systematic [78, 82, 95]
Gastrointestinal intramural masses	Rare but possible [75]	Rare but possible [75]
Stratification and architecture	Normal [8, 59] to modified [61, 82, 101]	Normal to modified [82, 95]
Motility	Normal to reduced [95]	Normal to reduced [95]
Intussusception	Rare but possible [2, 75]	Very rare but possible [2, 75]
Liver appearance	Hypo- or hyperechogenicity possible, lobular pattern if liver involved [2]	Non specific [2]
Pancreas	NA	Changes suggestive of pancreatitis (pancreatic hypoechogenicity, peripancreatic hyperechoic fat) [78, 173]

NA not available

diagnostic sensitivity and may therefore be a minimally invasive alternative to exploratory coeliotomy [77].

Although exploratory coeliotomy is more invasive than endoscopy, all segments can be inspected, full-thickness biopsies (mucosa, submucosa, muscularis and serosa) can be taken from various sites (stomach, duodenum, jejunum and ileum) [3, 4, 11, 15, 59, 75], and biopsies of other organs (e.g. peripheral lymph nodes, liver, and pancreas) if indicated [99]. The technique is generally safe with post-operative complications being uncommon [108]. Indeed, there was no clinical evidence of postoperative leakage from the biopsy sites and a low incidence of post-operative complications in published reports involving 70 AL cases where full-thickness gastrointestinal biopsies were taken [75, 76]. Unfortunately, regardless of method used for biopsy sampling, diagnosis remains challenging because of the frequent lack of gross changes in cases of LGAL. Multiple systematic biopsies of all the digestive areas are therefore recommended [14, 61, 79, 107].

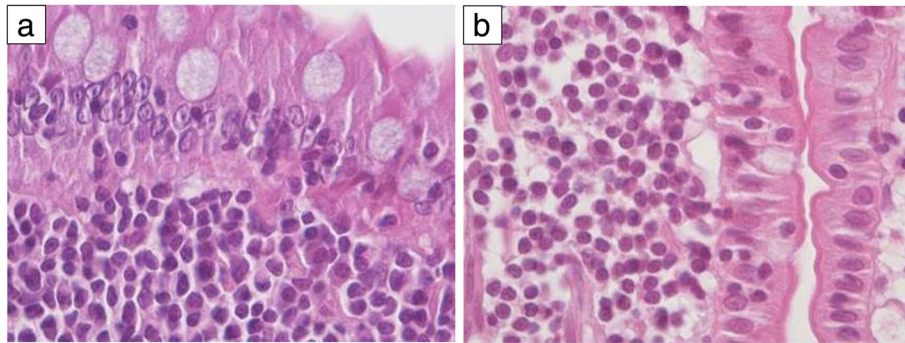
### Cytology and histology

Both cytological and histological assessment can be used to aid in the diagnosis of AL in cats. Whilst cytology samples can be easier to collect, results may be unreliable, particularly for LGAL, where the rate of false-negatives for mesenteric lymph nodes can reach 50% [59, 60, 75, 107, 109–111]. Few intra-abdominal lymph node cytology results are positive for LGAL, possibly because the neoplastic lymphocyte population mainly comprises small lymphocytes, which would not be considered to be unusual in a lymph node [60]. Conversely, aspiration cytology of focal intestinal wall masses or enlarged mesenteric lymph nodes are considered adequate to diagnose HGAL or LGLL [82, 107].

Histological examination of the small intestine is important in establishing a diagnosis of AL [1, 28, 97, 101, 109, 112], and it is advisable to define clinical features according to the guidelines of the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group [104, 113]. LGAL lesions are characterised by an infiltrate of neoplastic lymphocytes of small-to-intermediate size and involving the epithelium and lamina propria of the villus (Fig. 3); infiltration of the submucosa and muscularis is also frequent [6, 58, 60, 75]. Since the MALT includes the largest population of lymphoid and accessory immune cells in the gastrointestinal tract, it is the primary site of neoplastic proliferation [6, 114]. Differentiation between inflammatory and neoplastic infiltrates is often challenging because the histological features of LGAL and IBD (especially lymphoplasmacytic enteritis) can be similar (Fig. 3) [58, 82]. However, amongst the criteria to distinguish LGAL from IBD, epitheliotropism, defined as the characteristic homing of neoplastic T-cells to the mucosal epithelium [60], is arguably most important, and in particular the presence of intraepithelial nests and plaques [6, 19, 60, 61, 79]. An intraepithelial nest is defined as 5 or more small T-lymphocytes clustered within the villous epithelium, and an intraepithelial plaque as 5 or more adjacent epithelial cells obscured by infiltrates of small T-lymphocytes [61, 85]. Mild cases may be limited to purely intra-mucosal infiltration of small T-cells into the epithelium layer [60]. Two studies found that the majority of the intraepithelial lymphocytes in healthy and specific pathogen-free cats were CD3<sup>+</sup> [114, 115]. Whilst epitheliotropism is suggestive of LGAL rather than IBD, its absence cannot be used to exclude the condition because it is not observed in all digestive T-cell lymphomas [61].

Therefore, intraepithelial lymphocytes are an important cell population to study during histological assessment of feline gastrointestinal biopsies, and are usually of T-cell phenotype [6, 60]. In healthy cats, there are many more intraepithelial lymphocytes in the villous epithelium than in the crypt epithelium in all regions of the small intestine, and this is also for cats with IBD, AL,





**Fig. 3** Histological features of low-grade alimentary lymphoma (LGAL) and plasmacytic enteritis (haematoxylin-eosin-staining, 400X). **a** LGAL: monomorphic dense infiltrate of small lymphocytic cells with discrete nuclear atypia; some plasma cells are present. **b** Plasmacytic enteritis: less compact infiltrate of small lymphocytes with dense nucleus; more plasma cells are present

and epitheliotropic intestinal malignant lymphoma (EIL) [60, 115]. However, there are usually markedly more intraepithelial lymphocytes in cats with EIL than either healthy cats or cats with IBD [60]. Further, the common occurrence of epitheliotropism in small intestinal T-cell lymphoma has been described [6, 57, 60], with one study demonstrating that 62% of mucosal T-cell lymphoma of small-cell type had characteristics of EIL. Epitheliotropism is also an important feature of HGAL, occurring in 58% of transmural T-cell lymphoma and in some T-cell LGLL of the small intestine [6, 114, 116].

Inter-observer variability can occur and histology must be correlated with clinical status and outcome [117, 118]. Moreover, a discrepancy between the perceived lower number of intraepithelial lymphocytes based on HE stains and the greater number of intraepithelial lymphocytes based on CD3 stain has been noted, possibly because of the difficulty in differentiating them from enterocytes in HE-stained sections [60, 115]. In addition to the described changes in lymphocyte populations, concurrent histological abnormalities in neoplastic regions include lymphoid microabscesses in the mucosal epithelium, villous blunting and fusion, increased plasma cell infiltrate within the lamina propria and eosinophil infiltrate into the lamina propria [60].

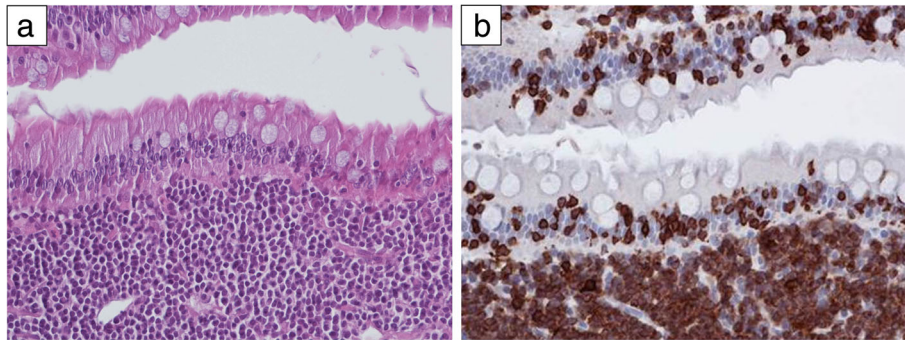
### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry has become an increasingly important molecular technique to improve the diagnosis of AL, especially to aid in the differentiation of LGAL and IBD [10, 15, 62, 77, 103, 106, 119]. Since it can often be performed on formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) biopsies, it must be readily performed as a complementary technique to standard histological examination. With IHC, specific monoclonal antibodies are applied that recognise antigenic determinants (epitopes), thereby enabling microscopic detection of differentiation and proliferation biomarkers [10, 62, 111]. The most

commonly-used antibodies include anti-CD3 to detect T-lymphocytes [6, 10, 39, 60–62, 79, 120], coupled with anti-CD79a, anti-CD20 and anti-BLA36 to detect B-lymphocytes [39, 60–62, 72, 103], MAC387 highlights macrophages [10, 62], and anti-CD57 is used to detect natural killer (NK) cells [6]. Moreover, the percentage of proliferating cells can also be determined immunohistochemically by detecting Ki67 expression [10]. Ki67 is expressed in the nucleus during all phases of the cell division cycle, with its concentration increasing during the cell cycle, becoming maximal expression in M-phase and then totally disappearing after mitosis [10, 121, 122]. However, whilst useful, the authors are not aware of any threshold value that reliably discriminates either between the different feline AL subtypes, or IBD [10]. Other specific feline antibodies (anti-CD4, anti-CD8 $\alpha$ , anti-CD8 $\beta$ ) can be used to detect additional epitopes and define the immunophenotype of lymphomas, but their routine clinical application is limited by the fact that formalin-fixed samples cannot be used as frozen sections are required [10].

LGAL is of T-cell phenotype in 90% of the cases, staining positively with anti-CD3 antibody (Fig. 4), with a B-cell phenotype observed in the remaining 10% of cases [6, 8, 10, 11, 58, 63, 75, 97]. However, there is increasing evidence that some human and canine T-cell lymphomas co-express the B-cell marker CD20 [123–125]. In a three-case series reported by Nolan and Kiupel (2018), the majority of neoplastic CD3<sup>+</sup> lymphocytes expressed CD20 but not Pax5. In all cases, PARR testing demonstrated clonal rearrangement of the T-cell receptor gamma gene, suggesting a diagnosis of CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> enteropathy-associated T-cell lymphoma, large cell type [80]. This explains why the PARR is most suited to detecting clonally expanded lymphocyte populations, rather than determining phenotype [85].

Moreover, human peripheral T-cell lymphoma may exhibit aberrant expression of CD20 [123], and a subset of



**Fig. 4** Histological (a) (haematoxylin-eosin-staining, 200X) and immunohistochemical (b) (anti-CD3, immunoperoxidase, 200X) features of low-grade alimentary lymphoma (LGAL) showing dense infiltration of the lamina propria composed of a mixture of small CD3<sup>+</sup> T lymphocytes and plasma cells, with epitheliotropism (small intestine biopsies)

T-lymphocytes with low-expression of CD20 (known as CD20<sup>dim</sup> T-lymphocytes) has been detected in normal peripheral human blood [126]. It is not currently known whether CD20 expression in canine lymphoma reflects aberrant expression or whether the neoplastic lymphocytes originated from a subpopulation of normal CD20<sup>dim</sup> T-cells. Finally, in a recent study involving 40 T-cell AL, 5 B-cell AL and 8 IBD, T-cell lymphomas in particular were characterised by a high percentage of Bcl-2 (B-cell lymphoma gene 2) labelled cells, whilst B-cell lymphomas varied more widely in the number of positively-labelled cells [19]. Further studies are required to clarify the exact phenotypes of LGAL, although this has been hampered by the limited number of antibodies available for IHC studies.

#### Clonality testing

In conjunction with other diagnostic techniques, clonality analyses have been increasingly used in veterinary pathology to differentiate reactive and neoplastic lymphoid proliferations, for example differentiating IBD from LGAL [6, 112, 127]. This diagnostic tool was first reported for feline intestinal T-cell lymphoma by Moore et al. in 2005 [57], with the most commonly reported approach being PARR. This technique is based on PCR targeting of the CDR3 region of T-cell receptor gamma (TCR $\gamma$ ) for T-cells and immunoglobulin heavy chain genes (IGH) for B-cells [57, 58, 85, 95, 111, 127–129], and can detect clonally expanded lymphocyte populations. However, PARR cannot determine lymphocyte phenotype and, therefore, it complements rather than replaces the use of immunohistochemistry. This is because neoplastic lymphocytes may have clonal rearrangement of either or both the T- or B-cell antigen receptor genes, regardless of phenotype [57, 61, 85, 130]. For example, cases of mucosal T-cell lymphoma of small cell type may show clonal rearrangement of the IGH gene. This is termed *cross-lineage rearrangement* and can be

an effect of malignant transformation but causes remain to be elucidated [61, 85, 131, 132]. *Cross-lineage rearrangement* has previously been reported in both human and canine T-cell malignancies [133, 134].

More than 90% of LGAL exhibit a clonal or oligoclonal TCR $\gamma$  gene rearrangement, whereas IBD usually displays a polyclonal pattern [6, 57]. Moreover, the diagnostic sensitivity and specificity of PCR-based clonality assays for routine diagnosis of feline TCR $\gamma$  gene rearrangement are currently close to 90% [6, 57, 128, 135]. As a result, Sabatini et al. recommended the assessment of clonality in duodenal endoscopic biopsies to increase the detection sensitivity to distinguish between LGAL and IBD [112]. Taken together, these data suggest that clonality testing should be integrated in the routine diagnosis work-up of LGAL. Initially developed on frozen samples, molecular clonality testing can now be performed on formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE)-derived samples [136], making this assay more easily accessible. The average sensitivity for diagnosis of feline AL was highest (0.83), intermediate (0.78), and lowest (0.72) for using histology and IHC and clonality, histology and IHC, and histology alone, respectively [61, 107].

Even where there is agreement between histological findings and clonality analysis, clinical, morphological, and immunophenotypic data should ideally be integrated with clonality analysis in order to reduce the chances of a misdiagnosis [6, 19, 61, 82, 127]. *Cross-lineage rearrangement* of the IGH gene was detected in at least 9% of cases diagnosed as T-cell AL [85, 129]. Moreover, a polyclonal rearrangement of the TCR $\gamma$  gene can also be observed. Reasons for this pattern include the presence of inflammatory T-cell infiltrates within the evaluated tissues which then mask the clonal T-cell population, or the exclusive amplification of the TCR $\gamma$  gene of resident or inflammatory T-cell populations of the intestine [57, 85]. Conversely, detection of a clonal lymphocyte population is not always indicative of

**Table 4** Comparison of aetiology, epidemiology, and clinical features in cats with low-grade alimentary lymphoma (LGAL) and inflammatory bowel diseases (IBD)

	LGAL	IBD
Aetiology	Currently unknown	Currently unknown, multifactorial disease, though many factors implicated including genetic factors and enteric bacteria or protozoa [3, 11, 52, 63]
Age	Mainly older cats [4]	Any age [63, 78, 79, 82]
Breed	No breed predisposition [59]	Domestic shorthair and longhair, Persian, Siamese predisposed [63, 78, 79, 87]
Gastrointestinal locations	Any but jejunum and ileum most common (90%) [58, 59, 119]	Any but duodenum and ileum most common (70–90%) [58, 59, 119]
Clinical signs	Weight loss, vomiting, anorexia, diarrhea, lethargy [8, 63, 79]	Weight loss, vomiting, anorexia, diarrhea, lethargy [8, 63, 79]
Biomarkers		
Albumin	Decreased (49%)	Decreased (77%) [87]
Total proteins	NA	Increased (18%) [78]
Cobalamin	Decreased (50–80%) [2, 8, 11, 75, 82, 83, 87, 90, 94]	Decreased (18–47%) [78, 82, 87]
Folate	Increased (37%) [72]	Increased (22%) [87]
LDH	Increased (47%) [172]	Increased (26%) [172]
ALP and ALT	NA	Increased (23%) [78]
fPLI	NA	Increased (18%) [78]
Phosphate	NA	Decreased (47%) [78]
Ultrasonography	Muscularis propria frequently thickened [8, 15, 59, 95, 101]; mesenteric (i.e. jejunal) lymphadenomegaly frequent [95]; gastrointestinal intramural masses rare [75]; stratification, architecture and motility normal to modified [95]	Muscularis propria frequently thickened in eosinophilic enteritis (EE), and occasionally in lymphoplasmacytic enteritis (LPE) [15, 78, 84, 95, 101]; mesenteric lymphadenomegaly frequent [78, 95]; gastrointestinal intramural masses rare [75]; stratification architecture, and motility normal to modified [95]
Histological features and immunohistochemistry	Diffuse infiltration by monomorphic neoplastic T-cells [6, 8]	Polymorphic inflammatory infiltrate of lymphocytes, plasma cells (LPE), neutrophils, eosinophils (EE), and macrophages [75, 84, 174]
Clonality test	Clonal population of lymphocytes [10, 15, 62, 95]	Polyclonal population of lymphocytes [10, 15, 95, 174]

NA not available

neoplasia, since this can sometimes be seen as a response to pathogens and concurrent malignancies [61, 85]. In the study of Kiupel et al., involving 47 AL and 16 IBD, one case had clonal population of B-cells and a final diagnosis of IBD was made, when histomorphology and immunophenotyping results were taken into consideration. Amongst ten cats with an oligoclonal population of T-cells, one case was diagnosed as IBD [61]. Moreover, high percentage of clonality has been associated with marked inflammatory process in humans [137].

That said, whilst clonality testing can provide additional information on a particular case, the use in diagnosis has not yet been critically reviewed and properly validated. Therefore, for now, clinicians should be cautious about reclassifying cats previously diagnosed with

IBD to lymphoma on the basis of PARR, and a combination of conventional histopathology and immunohistochemistry (IHC) remains the current gold-standard test.

### Staging

To our knowledge, the staging criteria classically defined for other types of lymphoma cannot be reliably used to classify LGAL [3, 5, 20, 38].

### Distinguishing low-grade alimentary lymphoma from inflammatory bowel disease

As discussed above, a major challenge of the clinician is to distinguish LGAL from IBD given that their clinical presentations overlap. Table 4 provides a summary of

**Table 5** Description of chemotherapy protocols based on Chlorambucil (PO) and Prednisolone (PO) administration in low-grade alimentary lymphoma (LGAL) [20, 59, 72, 97]

Study	Stein et al. [97]	Lingard et al. [59]	Kiselow et al. [72]	Fondacaro et al. [20]
Number of cases	28	12	41	29
Prednisolone	1–2 mg/kg PO q24h <sup>b</sup>	3 mg/kg PO q24h, tapering to 1–2 mg/kg once in remission	5 mg/cat PO q12-24 h	10 mg/cat PO/cat/day
Chlorambucil	20 mg/m <sup>2</sup> PO q2wk <sup>c</sup>	15 mg/m <sup>2</sup> PO q24h for 4d q3wk	2 mg/cat PO q48h	15 mg/m <sup>2</sup> PO q24h for 4d q3wk <sup>d</sup>
Number responding	27 (96%)	NA	37 (95%)	NA
Complete remission rate	NA	NA	22 (56%)	20 (69%)
Median remission time <sup>a</sup>	786 days	505 days	897 days	615 days
Median survival time	NA	513 days	704 days	510 days

NA not available

<sup>a</sup>Remission time in days for cats displaying a complete response; <sup>b</sup>Two cats received dexamethasone, initially at immunosuppressive dosages and then at dosages that were gradually tapered over the course of 3 weeks; <sup>c</sup>Because of client preference, two cats were switched to 20 mg/m<sup>2</sup> chlorambucil orally q3wk; <sup>d</sup>Twelve of the 20 cats that achieved CR received cyclophosphamide 225 mg/m<sup>2</sup> PO q3wk, once they were out of remission

the two conditions comparing aetiology, signalment, clinical signs, and diagnosis.

## Treatment

### Chemotherapy

Systemic chemotherapy is generally considered to be the most effective treatment for AL [2, 39], although protocols have not been frequently described [3]. Compared with other forms of lymphoma, less intensive chemotherapy protocols have been suggested [20], with the most common protocols involving oral administration of both glucocorticoids (prednisolone or dexamethasone) and chlorambucil (Table 5) [20, 59, 72, 97]. The optimal duration of chemotherapy has not been determined and, because these drugs are well tolerated, treatment is rarely discontinued. In one study involving 56 cases of feline small cell lymphomas (37 AL), all cats were treated with glucocorticoid and chlorambucil with discontinuation of treatment recommended at one year if complete clinical response was documented. Subsequent reintroduction as rescue chemotherapy appears to be just as effective as continued administration in cats and median overall survival times for cats with AL was 1148 days [96].

### Rescue protocol

Other chemotherapy protocols can be used if relapse is experienced, with examples including: cyclophosphamide and prednisolone; cyclophosphamide, vincristine and prednisolone (COP protocol) +/- L-asparaginase and doxorubicin (VELCAP-C); lomustine PO with or without corticosteroid [2, 4, 7, 39, 82]. In the study of Stein et al., involving 28 cats diagnosed with LGAL and treated with a combination of chlorambucil and glucocorticoids, seven of the nine cats with relapsed disease were treated with a rescue protocol of cyclophosphamide

(PO 200–250 mg/m<sup>2</sup> given on days 1 and 3 q2wk) and prednisolone (5 mg q48h). The response rate was 100% based on resolution of clinical signs and normal abdominal palpation. Three cats died of unrelated diseases, three cats were lost to follow-up, and the final cat relapsed 241 days after starting the rescue protocol [97]. However, to the authors' knowledge, there are no studies comparing the outcome of cats with LGAL treated by other rescue protocols, mainly because studies include all subtypes of AL. Interestingly, one cat in the study of Lingard et al. did not respond to a multi-agent protocol, but entered long-term remission with oral administration of prednisolone and chlorambucil, suggesting that LGAL may be sensitive to alkylating agents such as Chlorambucil [59].

### Surgical resection

Given that LGAL lesions are usually diffuse, surgical resection is rarely indicated as a means of managing the disease. In rare cases where an obstructive mass lesion is present, partial resection could be considered as part of the treatment [107, 138]. The main disadvantage of surgical resection is the risk of post-operative complications [76, 139], which can include dehiscence, typically occurring between 2 and 5 days after surgery [75]. Nevertheless, in one study involving 20 cases of intermediate-/high-grade AL where surgical resection of disease was performed prior to CHOP-based chemotherapy, no post-operative surgical complication occurred [138]. Cats with AL do not appear to be at high risk of post-operative complications after full-thickness gastrointestinal surgery [138, 139].

### Adjuvant therapy

In addition to chemotherapy, a highly digestible diet is typically recommended, with appetite stimulants (most



**Table 6** Pathological features of human digestive T-cell lymphoma [25, 153, 164, 165, 175, 176]

	Clinical features	Histology	Immunophenotype	Outcome
Indolent digestive T-cell lymphoproliferative disease	Diarrhoea, abdominal pain	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Crypt hyperplasia, variable degrees of villous atrophy</li> <li>- Non-destructive superficial infiltrate of small uniform T-cells mostly lamina propria-based</li> <li>- Infiltration into submucosa observed in some cases</li> <li>- No evident major epitheliotropism</li> </ul>	CD3+, CD8+ or CD4+, CD2+, CD5+/-, CD7+/-, CD30-, CD56-, TCR $\alpha\beta$ +	Indolent chronic relapsing course
Enteropathy associated T-cell lymphoma (EATL)	Overt or silent gluten-sensitive enteropathy	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Crypt hyperplasia, villous atrophy</li> <li>- Pleomorphic medium- to large-sized neoplastic lymphocytes with transmural infiltration</li> <li>- Presence of other mixed inflammatory cells such as histiocytes and eosinophils</li> <li>- Intraepithelial lymphocytosis present in non-tumoral mucosa and in epithelium distant from the main mass</li> </ul>	CD3+, CD5-, CD8-/+ , CD56-, CD103+, often CD30+, cytotoxic phenotype +/-, TCR $\alpha\beta$ + (usually)	Aggressive
Monomorphic epitheliotropic T-cell lymphoma	Occurs without a history of coeliac disease	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No crypt hyperplasia, possible villous atrophy</li> <li>- Monomorphic infiltrate with epitheliotropism</li> <li>- Transmural infiltration</li> <li>- No associated inflammatory background</li> </ul>	CD3+, CD5-, CD4-, CD8+, CD56+, cytotoxic phenotype, CD30-, TCR $\gamma\delta$ + (usually)	Aggressive

commonly mirtazapine 3.75 mg/cat PO, every 3 days) used in cats with partial or complete anorexia [75, 107]. A recent paper described the use of growth hormone secretagogues, such as capromorelin, for appetite stimulation in cats [140]. Capromorelin was already shown to increase food intake or weight gain in dogs and humans [141, 142]. Treatment with capromorelin at 6 mg/kg once daily for 91 days in 8 healthy laboratory cats resulted in increased body weight and a greater mean food consumption compared to the 4 placebo-treated cats. The optimal clinical dose of capromorelin in cats has yet to be confirmed, although no serious adverse events were observed in the recent study [140].

Cats with concurrent hypcobalaminaemia are usually treated with supplemental cobalamin (e.g. 250  $\mu$ g/cat SC once weekly for at least 6 weeks), although there is no clear consensus on doses and duration [72, 82, 86, 87]. The clinical benefits of prebiotics, probiotics and gluten-free diet as adjuvant therapies in LGAL have not yet been proved and need to be investigated in randomised studies [107].

### Prognosis

In contrast to HGAL and LGLL, prognosis for LGAL is good with a high remission rate when the treatment is carried out over several months or years [13, 14, 59, 75, 82]. Most causes of death include relapse, comorbidities,

or euthanasia in accordance with the owner's request [20, 59, 107]. Initial response to chemotherapy seems to be the most significant prognostic indicator [5, 20, 40, 143–145], with the presence of lethargy, vomiting and anorexia at initial diagnosis also considered to be negative prognosis factors [59]. However, no association has been observed between the response to LGAL treatment and a variety of other factors including: age, weight, sex, type and duration of clinical signs, presence of extra intestinal lesions, and decreased concentrations of folate, cobalamin and plasma total protein [38, 72, 75, 120]. It remains unclear as to whether, in the long-term, LGAL can progress to more aggressive forms of AL.

### Discussion

#### A model for human indolent T-cell lymphoproliferative disorders of the gastrointestinal tract?

Within the "One-Health" concept, the domestic cat is considered to be a good model for comparative biomedical research. Indeed, naturally-occurring feline cancers offer opportunities for comparative and translational advances that could be of mutual benefit for both human and veterinary oncology [146–148]. Therefore, as well as improving diagnostic tools for feline LGAL, identifying aetiological factors in cats may ultimately be beneficial to human patients with indolent digestive lymphoma.

**Table 7** Comparison of feline low-grade alimentary lymphoma (LGAL) and human indolent digestive T-cell lymphoproliferative disease (LPD)

Data	Feline LGAL	Human indolent digestive T-cell LPD
Epidemiology	Frequent, increasing prevalence over the last decade	Very rare
Clinical signs	Non-specific weight loss, vomiting, anorexia, diarrhoea	Non-specific weight loss, diarrhoea, abdominal pain, digestive bleeding, malnutrition
Gastrointestinal localisation	Multiple lesions affecting all the gastrointestinal tract; small intestine as main involvement	Multiple lesions affecting all the gastrointestinal tract; small intestine as main involvement
Histology	Monomorphic population of small- to intermediate-sized T-lymphocytes; infiltration of neoplastic T-cells in villi and lamina propria; moderate villous atrophy; crypt hyperplasia	Monomorphic population of small- to intermediate-sized T-lymphocytes Infiltration of neoplastic T-cells in villi and lamina propria; villous atrophy (often severe); crypt hyperplasia; erythema of the mucosa; ulcers; mucosal nodularity
Immunophenotyping	CD3+	CD3+ CD4+ (frequent) or CD8+ or CD4-/CD8- (rare)
Clonality pattern	Clonal or oligoclonal TCR $\gamma$ rearrangement	Clonal or oligoclonal TCR $\gamma$ rearrangement
Main differential diagnosis	Inflammatory bowel disease	Refractory coeliac disease, autoimmune enteropathy
Outcome	Indolent evolution Median survival time of 2 years	Indolent evolution Persistent disease at a median follow up of 5 years
Treatment	No gold standard Chlorambucil and steroids most common	No gold standard "Watch and wait" strategy, immunosuppressive agents, chemotherapy (CHOP regimen), anti CD52 monoclonal antibody

### Human indolent T-cell lymphoproliferative diseases of the gastrointestinal tract

Human primary gastrointestinal lymphomas are very rare, accounting for less than 5% of all non-Hodgkin lymphomas (NHL) yet representing the largest group of primary extranodal NHL, with approximately 25% of cases occurring in the gastrointestinal tract [19, 149]. They are predominantly located in the stomach (50–60%), whereas intestinal lymphomas are less common and affect the small and large bowel in 20–30% and 10–20% of cases, respectively [150–152]. Amongst primary intestinal T and NK-cell lymphoma, indolent intestinal T-cell lymphomas are newly described forms of low-grade, diffusely infiltrating T-cell lymphomas.

Indolent T-cell lymphoproliferative diseases (LPD) of the gastrointestinal tract have been described as clonal T-cell proliferations, with an indolent clinical course

after long-term monitoring [153]. These diseases are very rare and have only been reported as sporadic cases or in small case series [154–161]. Patients commonly present with chronic diarrhoea, weight loss, malnutrition, abdominal pain or rectal bleeding. In some cases, autoimmune diseases may develop, for example coeliac disease or autoimmune enteropathy [154–156, 162]. Macroscopic findings include villous atrophy, mucosal erythema, erosions or small ulcerations and, occasionally, small polyps without mass lesions [149]. Patients usually have multiple lesions along the gastrointestinal tract, most commonly in the small intestine and colon [149]. On histological examination, the lamina propria is densely infiltrated with a monomorphic population of small lymphoid cells. Severe intestinal villous atrophy, caused by the lamina propria infiltration, is commonly observed, but there is usually no evidence of epithelial destruction [149]. Tumour cells are CD3<sup>+</sup>, either CD4<sup>+</sup> (more commonly) or CD8<sup>+</sup>, or in rare instances CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>, whilst those expressing CD8 have a cytotoxic profile (TIA1<sup>+</sup>, granzyme B<sup>+</sup>) [153, 154, 156, 163]. Usually, CD56, CD30, CD103 and Epstein-Barr virus are not detected, whilst the Ki67 proliferation index is low e.g. in the range of 5–10% [153, 154, 156, 163]. Tumour cells display TCR $\gamma$  or  $\beta$  gene rearrangements and the TCR $\beta$ -chain is expressed on the surface in most cases, most notably in CD4<sup>+</sup> cases [153, 154, 156, 163].

The condition is clinically indolent, and most patients are still alive with a persistent disease after several years of follow-up [153, 154, 156, 163]. Nevertheless, three cases have been reported where patients died from aggressive T-cell lymphoma several years after being diagnosed [154]. In addition, conventional chemotherapy does not lead to durable clinical and histological responses in such patients and has been associated with high toxicity [153, 154, 156, 163].

Little is known about the mechanisms involved in the pathogenesis of indolent LPD of the gastrointestinal tract. Given the coexistence of autoimmune or inflammatory diseases, it has been speculated that immune dysregulation plays a role in disease pathogenesis [153, 154, 156]. Environmental factors such as diet or infectious agents (e.g. viruses, bacteria) could also be involved in the development of this disease. Human herpes virus 6 (HHV6) was detected in the small intestinal biopsies of one patient by PCR analysis and two patients had positive serology for human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV1) at the time of diagnosis, but with no evidence of viral integration in the intestinal biopsies [156]. In addition, no specific disease-associated chromosomal or genetic alterations have been uncovered so far. To date, the origin of indolent digestive T-cell LPDs remains unknown. In a subset of cases, there is expression of CD103, suggesting that such LPDs originate from a

mucosal T-cell precursor, although further characterisation would be required [164].

#### Comparison of feline low-grade alimentary lymphoma with human digestive T-cell lymphoma

The main characteristics of each subtype of human digestive T-cell lymphoma are presented in Table 6.

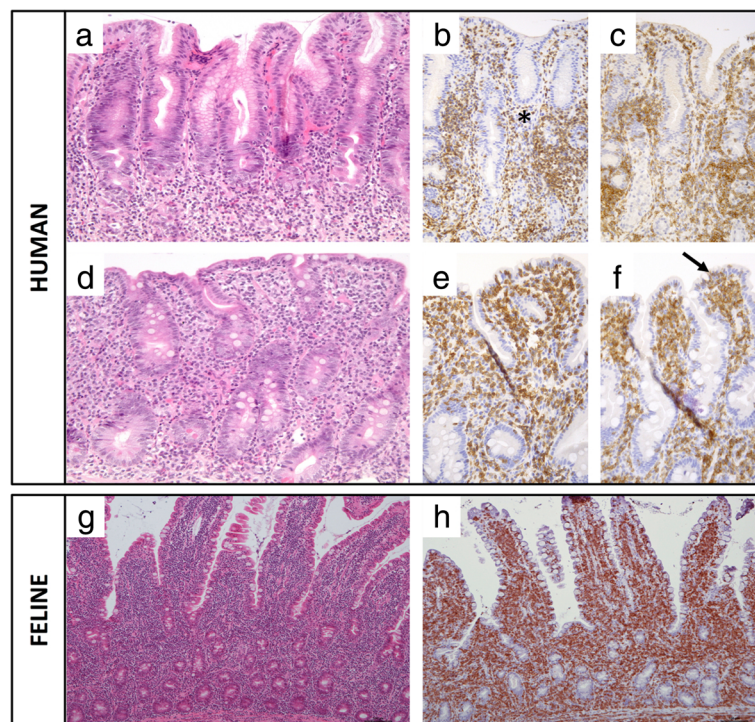
Although it has been suggested that the feline LGAL most closely resembles enteropathy-associated T-cell lymphoma (EATL; previously designated type I EATL) or monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma (MEITL; previously designated type II EATL) [6], the authors contend that it has more characteristics in common with indolent digestive T-cell LPDs in humans, according to the latest WHO classification [165]. Clinical, histological and phenotypic features of feline LGAL and human indolent digestive T-cell LPDs are compared in Table 7 and Fig. 5 [149, 153–156, 159].

As previously mentioned, the pathogenesis of human indolent digestive T-cell LPD is poorly understood and the rarity of the disease in humans is the major factor limiting the identification of putative oncogenic events. In contrast, the fact that feline LGAL is more common suggests that it might be a

suitable animal model for the human condition, to elucidate some of the pathogenic mechanisms underlying human indolent T-cell LPD of the gastrointestinal tract. Through domestication, humans, dogs and cats share a common environment and therefore display common signatures of coevolution, including epigenetic markers [166, 167]. This might explain why humans and pets are affected by closely-related diseases resulting from variations in genes expression altering conserved functional pathways [168]. The depth and quality of medical phenotyping in pets, associated with their facilitating haplotype structure and the development of genomics tools make them the most valuable mammalian models in medical genetics, including comparative oncology [169]. In the last two decades, dozens of disease-causing variants have been successfully identified in pets, most of them directly informative for humans [168]. Therefore, there is great potential for future research into feline LGAL not only to benefit cats, but also humans.

#### Conclusion

Feline low-grade alimentary lymphoma (LGAL) is the most frequent intestinal neoplasm and is characterised



**Fig. 5** Comparison of histological and immunohistochemical features of feline low-grade alimentary lymphoma (LGAL) and human indolent digestive T-cell lymphoproliferative disease (LPD). Top Panel: Human indolent CD4<sup>+</sup> T-cell lymphoproliferative disease of the gastrointestinal tract. Biopsies of the antrum (a, b, c) and duodenum (d, e, f) show important CD3<sup>+</sup> (b and e) and CD4<sup>+</sup> (c and f) lymphoid infiltrate into the lamina propria (asterisk), mostly composed by small lymphocytes. Epitheliotropism is mostly absent, with however focal exceptions such as small CD4<sup>+</sup> T-cells localized here in the duodenal epithelium (arrow). Bottom Panel: Feline T-cell low-grade alimentary lymphoma. Biopsies of the jejunum show epitheliotropic lymphocytic infiltrate involving the lamina propria (g), exhibiting a CD3<sup>+</sup> phenotype (h)



by diffuse infiltration of monomorphic neoplastic T-cells in the gastro-intestinal tract. However, diagnosis is still a major challenge, mainly the difficulty in differentiate the condition from inflammatory bowel disease. That said, developments in immunohistochemical analysis and clonality testing have improved the confidence of clinicians in obtaining a correct diagnosis. The pathophysiology of feline LGAL still needs to be elucidated, not least the putative roles of infectious agents, environmental factors as well as genetic events. The most common therapeutic strategy is combination treatment with prednisolone and chlorambucil, and prolonged remission can often be achieved. However, different variations of this therapeutic strategy exist, and standardisation is needed.

Importantly, feline LGAL could be considered to be a potential animal model for human indolent digestive T-cell lymphoproliferative disease. By exploring the pathogenetic mechanisms involved in feline LGAL, it should be possible to improve understanding of the human disease, identify diagnostic and prognostic markers and develop effective therapeutic regimens. More broadly, such an approach could provide insights into the host-pathogen interactions occurring in the gastro-intestinal tract and fundamental processes involved in physiological gut immunology.

#### Abbreviations

AL: Alimentary lymphoma; EATL: Enteropathy-associated T-cell lymphoma; EE: Eosinophilic enteritis; EIL: Epitheliotropic intestinal malignant lymphoma; FcaGHV1: *Felis catus* gammaherpesvirus 1; FCEAI: Feline chronic enteropathy activity index; FeLV: Feline leukaemia virus; FFPE: Formalin-fixed and paraffin-embedded; FIV: Feline immunodeficiency virus; HE: Haematoxylin and eosin; HGAL: High-grade alimentary lymphoma; Hhe: *Helicobacter heilmannii*; HIV: Human immunodeficiency virus; IBD: Inflammatory bowel disease; IHC: Immunohistochemistry; LGAL: Low-grade alimentary lymphoma; LGLL: Large granular lymphocytic lymphoma; LPD: Lymphoproliferative diseases; LPE: Lymphoplasmacytic enteritis; MALT: Mucosa-associated lymphoid tissue; MEITL: Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma; NA: Not available; NHL: Non-hodgkin lymphomas; NK: Natural killer; PARR: PCR for antigen receptor rearrangements; PCR: Polymerase chain reaction; PO: Per Os; SC: Subcutaneous; SIV: Simian immunodeficiency virus; WHO: World Health Organisation

#### Acknowledgments

The authors thank Dr. Pascaline Pey for providing the ultrasound pictures, and Céline Bleuart and Isabelle Pardo for laboratory processing of gastrointestinal biopsy specimens.

#### Authors' contributions

This review, initiated by VF, was a collective work and each author provided a substantial intellectual input to the entirety of the manuscript, from the initial foundations to the final submission of the review. All the authors designed the study under coordination of VF, AJG, LC and OH. All the authors conducted the veterinary or human literature review according to their specialisation: MVP, VF, LT, GB, JBe and AJG for veterinary internal medicine and oncology; SLP for virology; MD, MOS and JBr for histology; and LC, GM, CC, NCB and OH for human medicine. MVP, LT and VF supervised and analysed the veterinary literature review; LC and OH the human medicine literature review. All the authors drafted or revised the manuscript, especially in relation to their area of specialisation. All the authors read and approved the final version. Equal input was received from all authors.

#### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

AJG's academic post at the University of Liverpool is financially supported by Royal Canin. Otherwise, the authors declare that they had no conflicts of interests with respect to their authorship or the publication of this article.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Author details

<sup>1</sup>Université Paris-Est, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France. <sup>2</sup>Hematology Department, Hôpital Universitaire Necker – Enfants Malades, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (APHP), Paris, France. <sup>3</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. <sup>4</sup>INSERM UMR 1163, CNRS ERL 8254, Institut Imagine, Paris, France. <sup>5</sup>Internal Medicine Department, Université Paris-Est, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France. <sup>6</sup>UMR 1161 Virologie, INRA-ENVA-ANSES, Université Paris-Est, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France. <sup>7</sup>Anatomical Pathology Department, Université de Toulouse, École Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France. <sup>8</sup>Pathology Department, Hôpital Universitaire Necker – Enfants Malades, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (APHP), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. <sup>9</sup>INSERM 1163, Institut Imagine, Site Hôpital Universitaire Necker – Enfants Malades, Paris, France. <sup>10</sup>UMR 1163, Laboratory of Intestinal Immunity, INSERM, Paris, France. <sup>11</sup>Gastroenterology Department, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (APHP), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. <sup>12</sup>INSERM UMR 1163, Institut Imagine, Paris, France. <sup>13</sup>Inserm U955-E10 BNMS, IMRB, Université Paris-Est, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94000 Maisons-Alfort, France. <sup>14</sup>Institute of Ageing and Chronic Disease, University of Liverpool, Leahurst Campus, Chester High Road, Neston CH64 7TE, UK.

Received: 2 May 2018 Accepted: 28 September 2018

Published online: 11 October 2018

#### References

- Twomey LN, Compendium AA. Cytodiagnosis of feline lymphoma. *Compendium*. 2005;27:1.
- Richter KP. Feline gastrointestinal lymphoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2003;33:1083–98.
- Ettinger SN. Principles of treatment for feline lymphoma. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2003;18:98–102.
- Gabor LJ, Malik R, Canfield PJ. Clinical and anatomical features of lymphosarcoma in 118 cats. *Aust Vet J*. 1998;76:725–32.
- Vail DM, Moore AS, Ogilvie GK, Volk LM. Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats. *J Vet Intern Med*. 1998;12:349–54.
- Moore PF, Rodriguez-Bertos A, Kass PH. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality. *Vet Pathol*. 2011;49:658–68.
- Guillermo CC. What is new on feline lymphoma? *J Feline Med Surg*. 2001;3:171–6.
- Barrs V, Beatty J. Feline alimentary lymphoma: 1. Classification, risk factors, clinical signs and non-invasive diagnostics. *J Feline Med Surg*. 2012;14:182–90.
- Hadden AG, Cotter SM, Rand W, Moore AS, Davis RM, Morrissey P. Efficacy and toxicosis of VELCAP-C treatment of lymphoma in cats. *J Vet Intern Med*. 2008;22:153–7.
- Delverdier M, Bourges-Abella N, Raymond-Letron I, Trumel C, Degorce-Rubiales F, Poujade A, et al. Immunohistochemistry des lymphomes gastrointestinaux du chat. *Revue Méd Vét*. 2010;161:225–32.
- Wilson HM. Feline alimentary lymphoma: demystifying the enigma. *Top Companion Anim Med*. 2008;23:177–84.
- Pohlman LM, Higginbotham ML, Welles EG. Classification of feline gastrointestinal lymphoma. *Adv Small Ani Med and Surg*. 2010;23:5.

13. Sato H, Fujino Y, Chino J, Takahashi M, Fukushima K, Goto-Koshino Y, et al. Prognostic analyses on anatomical and morphological classification of feline lymphoma. *J Vet Med Sci*. 2014;76:807–11.
14. Willard MD. Alimentary neoplasia in geriatric dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2012;42:693–706.
15. Daniaux LA, Laurenson MP, Marks SL, Moore PF, Taylor SL, Chen RX, et al. Ultrasonographic thickening of the muscularis propria in feline small intestinal small cell T-cell lymphoma and inflammatory bowel disease. *J Feline Med Surg*. 2013;16:89–98.
16. Kristal O, Lana SE, Ogilvie GK, Rand WM, Cotter SM, Moore AS. Single agent chemotherapy with doxorubicin for feline lymphoma: a retrospective study of 19 cases (1994–1997). *J Vet Intern Med*. 2001;15:125–30.
17. Milner RJ, Peyton J, Cooke K, Fox LE, Gallagher A, Gordon P, et al. Response rates and survival times for cats with lymphoma treated with the University of Wisconsin-Madison chemotherapy protocol: 38 cases (1996/2003). *J Am Vet Med Assoc*. 2005;227:1118–22.
18. Chino J, Fujino Y, Kobayashi T, Kariya K, Goto-Koshino Y, Ohno K, et al. Cytomorphological and immunological classification of feline lymphomas: clinicopathological features of 76 cases. *J Vet Med Sci*. 2013;75:701–7.
19. Swanson CM, Smedley RC, Saavedra PV, Kiupel M, Kitchell BE. Expression of the Bcl-2 apoptotic marker in cats diagnosed with inflammatory bowel disease and gastrointestinal lymphoma. *J Feline Med Surg*. 2012;14:741–5.
20. Fondacaro JV, Richter KP, Carpenter JL, Hart JR, Hill SL, Fettman MJ. Feline gastrointestinal lymphoma: 67 cases (1988–1996). *Eur J Comp Gastroenterol*. 1999;4:5–11.
21. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group. *Blood*. 1994;84:1361–92.
22. Valli VE, Jacobs RM, Norris A, Couto CG, Morrison WB, McCaw D, et al. The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. *J Vet Diagn Investig*. 2000;12:295–306.
23. Wolfesberger B, Skor O, Hammer SE, Flickinger I, Kleiter M, Rütgen BC, et al. Does categorisation of lymphoma subtypes according to the World Health Organization classification predict clinical outcome in cats. *J Feline Med Surg*. 2017;19:897–906.
24. Delabie J, Holte H, Vose JM, Ullrich F, Jaffe ES, Savage KJ, et al. Enteropathy-associated T-cell lymphoma: clinical and histological findings from the international peripheral T-cell lymphoma project. *Blood*. 2011;118:148–55.
25. Ondrejka S, Jagadeesh D. Enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep*. 2016;11:504–13.
26. Sapierzyński R, Jankowska U, Jagielski D, Kliczkowska-Klarowicz K. Large granular lymphoma in six cats. *Pol J Vet Sci*. 2015;18:163–9.
27. Krick EL, Little L, Patel R, Shofer FS, Sorenmo K, Clifford CA, et al. Description of clinical and pathological findings, treatment and outcome of feline large granular lymphocyte lymphoma (1996–2004). *Vet Comp Oncol*. 2008;6:102–10.
28. Russell KJ, Beatty JA, Dhond N, Gunew M, Lingard AE, Baral RM, et al. Feline low-grade alimentary lymphoma: how common is it? *J Feline Med Surg*. 2012;14:910–2.
29. Louwerens M, London CA, Pedersen NC, Lyons LA. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *J Vet Intern Med*. 2005;19:329–35.
30. Fujino Y, Liao C-P, Zhao YS, Pan J, Mathes LE, Hayes KA, et al. Identification of a novel common proviral integration site, flit-1, in feline leukemia virus induced thymic lymphoma. *Virology*. 2009;386:16–22.
31. Nesina S, Katrin Helfer-Hungerbuehler A, Riond B, Boretta FS, Willi B, Meli ML, et al. Retroviral DNA—the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naive recipient cats. *Retrovirology*. 2015;12:105.
32. Tsatsanis C, Fulton R, Nishigaki K, Tsujimoto H, Levy L, Terry A, et al. Genetic determinants of feline leukemia virus-induced lymphoid tumors: patterns of proviral insertion and gene rearrangement. *J Virol*. 1994;68:8296–303.
33. Jackson ML, Wood SL, Misra V, Haines DM. Immunohistochemical identification of B and T lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded feline lymphomas: relation to feline leukemia virus status, tumor site, and patient age. *Can J Vet Res*. 1996;60:199–204.
34. Callanan JJ, Jones BA, Irvine J, Willett BJ, McCandlish IA, Jarrett O. Histologic classification and immunophenotype of lymphosarcomas in cats with naturally and experimentally acquired feline immunodeficiency virus infections. *Vet Pathol*. 1996;33:264–72.
35. Mikkers H, Berns A. Retroviral insertional mutagenesis: tagging cancer pathways. *Adv Cancer Res*. 2003;88:53–99.
36. Weiss ATA, Klopffleisch R, Gruber AD. Prevalence of feline leukaemia provirus DNA in feline lymphomas. *J Feline Med Surg*. 2010;12:929–35.
37. Stützer B, Simon K, Lutz H, Majzoub M, Hermanns W, Hirschberger J, et al. Incidence of persistent viraemia and latent feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma. *J Feline Med Surg*. 2011;13:81–7.
38. Mahony OM, Moore AS, Cotter SM, Engler SJ, Brown D, Penninck DG. Alimentary lymphoma in cats: 28 cases (1988–1993). *J Am Vet Med Assoc*. 1995;207:1593–8.
39. Pohlman LM, Higginbotham ML, Welles EG, Johnson CM. Immunophenotypic and histologic classification of 50 cases of feline gastrointestinal lymphoma. *Vet Pathol*. 2009;46:259–68.
40. Zwahlen CH, Lucroy MD, Kraegel SA, Madewell BR. Results of chemotherapy for cats with alimentary malignant lymphoma: 21 cases (1993–1997). *J Am Vet Med Assoc*. 1998;213:1144–9.
41. Feichtinger H, Putkonen P, Parravicini C, Li SL, Kaaya EE, Böttiger D, et al. Malignant lymphomas in cynomolgus monkeys infected with simian immunodeficiency virus. *Am J of Pathol*. 1990;137:1311–5.
42. Ramsay AD, Giddings J, Baskerville A, Cranage MP. Phenotypic analysis of malignant lymphoma in simian immunodeficiency virus infection using anti-human antibodies. *J Pathol*. 1991;164:321–8.
43. Levine AM. Acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma: clinical aspects. *Semin Oncol*. 2000;27:442–53.
44. Beatty JA, Lawrence CE, Callanan JJ, Grant CK, Gault EA, Neil JC, et al. Feline immunodeficiency virus (FIV)-associated lymphoma: a potential role for immune dysfunction in tumorigenesis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1998; 65:309–22.
45. Lutz H, Pedersen NC, Theilen GH. Course of feline leukemia virus infection and its detection by enzymelinked immunosorbent assay and monoclonal antibodies. *Am J Vet Res*. 1983;44:2054–9.
46. Court EA, Watson AD, Peaston AE. Retrospective study of 60 cases of feline lymphosarcoma. *Aust Vet J*. 1997;75:424–7.
47. Kaye S, Wang W, Miller C, McLuckie A, Beatty JA, Grant CK, et al. Role of feline immunodeficiency virus in lymphomagenesis—going alone or colluding? *ILAR J*. 2016;57:24–33.
48. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health*. 2016;4:609–16.
49. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006;118:3030–44.
50. McLuckie AJ, Barrs VR, Lindsay S, Aghazadeh M, Sangster C, Beatty JA. Molecular diagnosis of *Felis catus* Gammaherpesvirus 1 (FcaGHV1) infection in cats of known retrovirus status with and without lymphoma. *Viruses*. 2018;10:128.
51. Simpson KW, Strauss-Ayal D, Scanziani E, Straubinger RK, McDonough PL, Straubinger AF, et al. *Helicobacter felis* infection is associated with lymphoid follicular hyperplasia and mild gastritis but normal gastric secretory function in cats. *Infect Immun*. 2000;68:779–90.
52. Bridgeford EC, Marini RP, Feng Y, Parry NMA, Rickman B, Fox JG. Gastric *helicobacter* species as a cause of feline gastric lymphoma: a viable hypothesis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;123:106–13.
53. Farinha P, Gascoyne RD. *Helicobacter pylori* and MALT lymphoma. *Gastroenterology*. 2005;128:1579–605.
54. Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett*. 2014;345:196–202.
55. Rossi G, Rossi M, Vitali CG, Fortuna D, Burrioni D, Pancotto L, et al. A conventional beagle dog model for acute and chronic infection with *helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 1999;67:3112–20.
56. Hoehne SN, McDonough SP, Rishniw M, Simpson KW. Identification of mucosa-invading and intravascular bacteria in feline small intestinal lymphoma. *Vet Pathol*. 2017;54:234–41.
57. Moore PF, Woo JC, Vernau W, Kosten S, Graham PS. Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;106:167–78.
58. Briscoe KA, Krockenberger M, Beatty JA, Crowley A, Dennis MM, Canfield PJ, et al. Histopathological and immunohistochemical evaluation of 53 cases of feline lymphoplasmacytic enteritis and low-grade alimentary lymphoma. *J Comp Pathol*. 2011;145:187–98.
59. Lingard AE, Briscoe K, Beatty JA, Moore AS, Crowley AM, Krockenberger M, et al. Low-grade alimentary lymphoma: clinicopathological findings and response to treatment in 17 cases. *J Feline Med Surg*. 2009;11:692–700.

60. Carreras JK, Goldschmidt M, Lamb M, McLear RC, Drobatz KJ, Sorenmo KU. Feline epitheliotropic intestinal malignant lymphoma: 10 cases (1997-2000). *J Vet Intern Med.* 2003;17:326–31.
61. Kiupel M, Smedley RC, Pfent C, Xie Y, Xue Y, Wise AG, et al. Diagnostic algorithm to differentiate lymphoma from inflammation in feline small intestinal biopsy samples. *Vet Pathol.* 2011;48:212–22.
62. Waly NE, Gruffydd-Jones TJ, Stokes CR, Day MJ. Immunohistochemical diagnosis of alimentary lymphomas and severe intestinal inflammation in cats. *J Comp Pathol.* 2005;133:253–60.
63. Castro-López J, Teles M, Fierro C, Allenspach K, Planellas M, Pastor J. Pilot study: duodenal MDR1 and COX2 gene expression in cats with inflammatory bowel disease and low-grade alimentary lymphoma. *J Feline Med Surg.* 2017;207:214.
64. Hart JR, Shaker E, Patnaik AK, Garvey MS. Lymphocytic-plasmacytic enterocolitis in cats: 60 cases (1988/1990). *Am Anim Hosp Assoc.* 1994;30:505–14.
65. Krecic MR, Black SS. Epitheliotropic T-cell gastrointestinal tract lymphosarcoma with metastases to lung and skeletal muscle in a cat. *J Am Vet Med Assoc.* 2000;216:524–9.
66. French RA, Seitz SE, Valli VE. Primary epitheliotropic alimentary T-cell lymphoma with hepatic involvement in a dog. *Vet Pathol.* 1996;33:349–52.
67. Chott A, Dragosics B, Radaszkiewicz T. Peripheral T-cell lymphomas of the intestine. *Am J Pathol.* 1992;141:1361–71.
68. Dieter RS, Duque K. Enterotherapy associated T-cell lymphoma: a case report and literature review. *WJM.* 2000;99:28–31.
69. Ohsawa M, Fukushima H, Ikura Y, Inoue T, Shirai N, Sugama Y, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in Hodgkin's lymphoma: its role in cell proliferation and angiogenesis. *Leuk Lymphoma.* 2006;47:1863–71.
70. Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol.* 1998;161:5733–44.
71. Bertone ER, Snyder LA, Moore AS. Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. *Am J Epidemiol.* 2002;156:268–73.
72. Kiselow MA, Rassnick KM, McDonough SP, Goldstein RE, Simpson KW, Weinkle TK, et al. Outcome of cats with low-grade lymphocytic lymphoma: 41 cases (1995-2005). *J Am Vet Med Assoc.* 2008;232:405–10.
73. Risetto K, Villamil JA, Selting KA, Tyler J, Henry CJ. Recent trends in feline intestinal neoplasia: an epidemiologic study of 1,129 cases in the veterinary medical database from 1964 to 2004. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2011;47:28–36.
74. Bernardin F, Martinez Rivera L, Ragetly G, Gomes E, Hernandez J. Spontaneous gastrointestinal perforation in cats: a retrospective study of 13 cases. *J Feline Med Surg.* 2015;17:873–9.
75. Gieger T. Alimentary lymphoma in cats and dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2011;41:419–32.
76. Smith AL, Wilson AP, Hardie RJ, Krick EL, Schmiadt CW. Perioperative complications after full-thickness gastrointestinal surgery in cats with alimentary lymphoma. *Vet Surg.* 2011;40:849–52.
77. Evans SE, Bonczynski JJ, Broussard JD, Han E, Baer KE. Comparison of endoscopic and full-thickness biopsy specimens for diagnosis of inflammatory bowel disease and alimentary tract lymphoma in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2006;229:1447–50.
78. Jergens AE, Crandell JM, Evans R, Ackermann M, Miles KG, Wang C. A clinical index for disease activity in cats with chronic enteropathy. *J Vet Intern Med.* 2010;24:1027–33.
79. Jergens AE. Feline idiopathic inflammatory bowel disease: what we know and what remains to be unraveled. *J Feline Med Surg.* 2012;14:445–58.
80. Noland EL, Kiupel M. Coexpression of CD3 and CD20 in canine Enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Vet Pathol.* 2018;55:241–4.
81. Jackson ML, Haines DM, Meric SM, Misra V. Feline leukemia virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma. *Can J Vet Res.* 1993;57:269–76.
82. Gianella P, Pietra M, Crisi PE, Famigli Bergamini P, Fracassi F, Morini M, et al. Evaluation of clinicopathological features in cats with chronic gastrointestinal signs. *Pol J Vet Sci.* 2017;20:403–10.
83. Simpson KW, Fyfe J, Cornetta A, Sachs A, Strauss-Ayali D, Lamb SV, et al. Subnormal concentrations of serum cobalamin (vitamin B12) in cats with gastrointestinal disease. *J Vet Intern Med.* 2001;15:26–32.
84. Tucker S, Penninck DG, Keating JH, Webster CRL. Clinicopathological and ultrasonographic features of cats with eosinophilic enteritis. *J Feline Med Surg.* 2014;16:950–6.
85. Andrews C, Operacz M, Maes R, Kiupel M. Cross lineage rearrangement in feline Enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Vet Pathol.* 2016;53:559–62.
86. Ruaux CG, Steiner JM, Williams DA. Early biochemical and clinical responses to cobalamin supplementation in cats with signs of gastrointestinal disease and severe hypcobalaminemia. *J Vet Intern Med.* 2005;19:155–60.
87. Burke KF, Broussard JD, Ruaux CG, Suchodolski JS, Williams DA, Steiner JM. Evaluation of fecal  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor concentrations in cats with idiopathic inflammatory bowel disease and cats with gastrointestinal neoplasia. *Vet J.* 2013;196:189–96.
88. Soare T, Noble P-J, Hetzel U, Fonfara S, Kipar A. Paraneoplastic syndrome in haemophagocytic histiocytic sarcoma in a dog. *J Comp Pathol.* 2012; 146:168–74.
89. Declue AE, Delgado C, Chang C-H, Sharp CR. Clinical and immunologic assessment of sepsis and the systemic inflammatory response syndrome in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2011;238:890–7.
90. Maunder CL, Day MJ, Hibbert A, Steiner JM, Suchodolski JS, Hall EJ. Serum cobalamin concentrations in cats with gastrointestinal signs: correlation with histopathological findings and duration of clinical signs. *J Feline Med Surg.* 2012;14:686–93.
91. Ibarrola P, Blackwood L, Graham PA, Evans H, German AJ. Hypocobalaminemia is uncommon in cats in the United Kingdom. *J Feline Med Surg.* 2005;7:341–8.
92. Reed N, Gunn-Moore D, Simpson K. Cobalamin, folate and inorganic phosphate abnormalities in ill cats. *J Feline Med Surg.* 2007;9:278–88.
93. Barron PM, Mackie JT, Evans NA, Langer N. Serum cobalamin concentrations in healthy cats and cats with non-alimentary tract illness in Australia. *Aust Vet J.* 2009;87:280–3.
94. Puig J, Cattin I, Seth M. Concurrent diseases in hyperthyroid cats undergoing assessment prior to radioiodine treatment. *J Feline Med Surg.* 2015;17:537–42.
95. Zwingenberger AL, Marks SL, Baker TW, Moore PF. Ultrasonographic evaluation of the muscularis propria in cats with diffuse small intestinal lymphoma or inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med.* 2010;24:289–92.
96. Pope KV, Tun AE, McNeill CJ, Brown DC, Krick EL. Outcome and toxicity assessment of feline small cell lymphoma: 56 cases (2000–2010). *Vet Med Sci.* 2015;1:51–62.
97. Stein TJ, Pellin M, Steinberg H, Chun R. Treatment of feline gastrointestinal small-cell lymphoma with chlorambucil and glucocorticoids. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2010;46:413–7.
98. Ripollés T, Rausell N, Paredes JM, Grau E, Martínez MJ, Vizuete J. Effectiveness of contrast-enhanced ultrasound for characterisation of intestinal inflammation in Crohn's disease: a comparison with surgical histopathology analysis. *J Crohns Colitis.* 2013;7:120–8.
99. Penninck D, d'Anjou M-A. Gastrointestinal tract. In: Penninck D, d'Anjou M-A, editors. *Atlas of small animal ultrasonography*, second edition. Iowa: Wiley; 2015. p. 256–308.
100. Linton M, Nimmo JS, Norris JM, Churcher R, Haynes S, Zoltowska A, et al. Feline gastrointestinal eosinophilic sclerosing fibroplasia: 13 cases and review of an emerging clinical entity. *J Feline Med Surg.* 2015;17:392–404.
101. Gaschen L. Ultrasonography of small intestinal inflammatory and neoplastic diseases in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2011;41:329–44.
102. Diana A, Pietra M, Guglielmini C, Boari A, Bettini G, Cipone M. Ultrasonographic and pathologic features of intestinal smooth muscle hypertrophy in four cats. *Vet Radiol Ultrasound.* 2003;44:566–9.
103. Jergens AE, Willard MD, Allenspach K. Maximizing the diagnostic utility of endoscopic biopsy in dogs and cats with gastrointestinal disease. *Vet J.* 2016;214:50–60.
104. Washabau RJ, Day MJ, Willard MD, Hall EJ, Jergens AE, Mansell J, et al. Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. *J Vet Intern Med.* 2010;24:10–26.
105. Sum S, Ward CR. Flexible endoscopy in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2009;39:881–902.
106. Scott KD, Zoran DL, Mansell J, Norby B, Willard MD. Utility of endoscopic biopsies of the duodenum and ileum for diagnosis of inflammatory bowel disease and small cell lymphoma in cats. *J Vet Intern Med.* 2011;25:1253–7.
107. Barrs VR, Beatty JA. Feline alimentary lymphoma: 2. Further diagnostics, therapy and prognosis. *J Feline Med Surg.* 2012;14:191–201.
108. Norsworthy GD, Estep JS, Hollinger C, Steiner JM, Lavallee JO, Gassler LN, et al. Prevalence and underlying causes of histologic abnormalities in cats suspected to have chronic small bowel disease: 300 cases (2008-2013). *J Am Vet Med Assoc.* 2015;247:629–35.

109. Ku C-K, Kass PH, Christopher MM. Cytologic-histologic concordance in the diagnosis of neoplasia in canine and feline lymph nodes: a retrospective study of 367 cases. *Vet Comp Oncol*. 2017;15:1206–17.
110. Mangelsdorf S, Teske E, Bomhard von W, Stockhaus C. Cytology of endoscopically obtained biopsies for the diagnosis of chronic intestinal diseases in cats. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 2015;43:15–22.
111. Burkhard MJ, Bienzle D. Making sense of lymphoma diagnostics in small animal patients. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2013;43:1331–47.
112. Sabattini S, Bottero E, Turba ME, Vicchi F, Bo S, Bettini G. Differentiating feline inflammatory bowel disease from alimentary lymphoma in duodenal endoscopic biopsies. *J Small Anim Pract*. 2016;57:396–401.
113. Day MJ, Bilzer T, Mansell J, Wilcock B, Hall EJ, Jergens A, et al. Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the world small animal veterinary association gastrointestinal standardization group. *J Comp Pathol*. 2008;138:143.
114. Roccabianca P, Woo JC, Moore PF. Characterization of the diffuse mucosal associated lymphoid tissue of feline small intestine. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000;75:27–42.
115. Waly N, Gruffydd-Jones TJ, Stokes CR, Day MJ. The distribution of leucocyte subsets in the small intestine of healthy cats. *J Comp Pathol*. 2001;124:172–82.
116. Roccabianca P, Vernau W, Caniatti M, Moore PF. Feline large granular lymphocyte (LGL) lymphoma with secondary leukemia: primary intestinal origin with predominance of a CD3/CD8(alpha)(alpha) phenotype. *Vet Pathol*. 2006;43:15–28.
117. Willard MD, Jergens AE, Duncan RB, Leib MS, McCracken MD, DeNovo RC, et al. Interobserver variation among histopathologic evaluations of intestinal tissues from dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*. 2002;220:1177–82.
118. Renshaw AA. Measuring and reporting errors in surgical pathology. Lessons from gynecologic cytology. *Am J Clin Pathol*. 2001;115:338–41.
119. Kleinschmidt S, Harder J, Nolte I, Marsilio S, Hewicker-Trautwein M. Chronic inflammatory and noninflammatory diseases of the gastrointestinal tract in cats: diagnostic advantages of full-thickness intestinal and extraintestinal biopsies. *J Feline Med Surg*. 2010;12:97–103.
120. Patterson-Kane JC, Kugler BP, Francis K. The possible prognostic significance of immunophenotype in feline alimentary lymphoma: a pilot study. *J Comp Pathol*. 2004;130:220–2.
121. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133:1710–5.
122. Kim KH, Sederstrom JM. Assaying cell cycle status using flow cytometry. *Curr Protoc Mol Biol*. 2015;111:11–28.
123. Matnani RG, Stewart RL, Pulliam J, Jennings CD, Kesler M. Peripheral T-cell lymphoma with aberrant expression of CD19, CD20, and CD79a: case report and literature review. *Case Rep Hematol*. 2013;183134–5.
124. Raheemullah A, Longtine JA, Harris NL, Dorn M, Zembowicz A, Quintanilla-Fend L, et al. CD20+ T-cell lymphoma: clinicopathologic analysis of 9 cases and a review of the literature. *Am J Surg Pathol*. 2008;32:1593–607.
125. Misra DS, Bhardwaj M, Bahuguna G, Malhotra V. An unusual case of enteropathy-associated T-cell lymphoma with CD20 positivity. *Indian J Pathol Microbiol*. 2014;57:658–9.
126. Quintanilla-Martinez L, Preffer F, Rubin D, Ferry JA, Harris NL. CD20+ T-cell lymphoma, neoplastic transformation of a normal T-cell subset. *Am J Clin Pathol*. 1994;102:483–9.
127. Keller SM, Vernau W, Moore PF. Clonality testing in veterinary medicine: a review with diagnostic guidelines. *Vet Pathol*. 2016;53:711–25.
128. Hammer SE, Groiss S, Fuchs-Baumgartinger A, Nedorost N, Gress V, Luckschander-Zeller N, et al. Characterization of a PCR-based lymphocyte clonality assay as a complementary tool for the diagnosis of feline lymphoma. *Vet Comp Oncol*. 2017;15:1354–69.
129. Werner JA, Woo JC, Vernau W, Graham PS, Grah RA, Lyons LA, et al. Characterization of feline immunoglobulin heavy chain variable region genes for the molecular diagnosis of B-cell neoplasia. *Vet Pathol*. 2005;42:596–607.
130. Evans PAS, Pott C, Groenen PJTA, Salles G, Davi F, Berger F, et al. Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED2 concerted action BHM4-CT98-3936. *Leukemia*. 2007;21:207–14.
131. Pelicci PG, Knowles DM, Dalla FR. Lymphoid tumors displaying rearrangements of both immunoglobulin and T cell receptor genes. *J Exp Med*. 1985;162:1015–24.
132. Krejci O, Prouzova Z, Horvath O, Trka J, Hrusak O. Cutting edge: TCR delta gene is frequently rearranged in adult B lymphocytes. *J Immunol*. 2003;171:524–7.
133. Valli VE, Vernau W, de Lorimier L-P, Graham PS, Moore PF. Canine indolent nodular lymphoma. *Vet Pathol*. 2006;43:241–256.
134. van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. *Clin Chim Acta*. 1991;198:93–174.
135. Weiss ATA, Klopfeisch R, Gruber AD. T-cell receptor gamma chain variable and joining region genes of subgroup 1 are clonally rearranged in feline B- and T-cell lymphoma. *J Comp Pathol*. 2011;144:123–34.
136. Gress V, Wolfesberger B, Fuchs-Baumgartinger A, Nedorost N, Saalmüller A, Schwendenwein I, et al. Characterization of the T-cell receptor gamma chain gene rearrangements as an adjunct tool in the diagnosis of Tcell lymphomas in the gastrointestinal tract of cats. *Res Vet Sci*. 2016;107:261–6.
137. Doorenspleet ME, Westera L, Peters CP, Hakvoort TBM, Esveldt RE, Vogels E, et al. Profoundly expanded T-cell clones in the inflamed and uninfamed intestine of patients with Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2017;11:831–9.
138. Gouldin ED, Mullin C, Morges M, Mehler SJ, de Lorimier L-P, Oakley C, et al. Feline discrete high-grade gastrointestinal lymphoma treated with surgical resection and adjuvant CHOP-based chemotherapy: retrospective study of 20 cases. *Vet Comp Oncol*. 2017;15:328–35.
139. Almkadisi T, Massoud S, Makdissi G. Lymphomas and chylous ascites: review of the literature. *Oncologist*. 2005;10:632–5.
140. Wofford JA, Zollers B, Rhodes L, Bell M, Heinen E. Evaluation of the safety of daily administration of capromorelin in cats. *J Vet Pharmacol Ther*. 2018;41:324–33.
141. Zollers B, Rhodes L, Heinen E. Capromorelin oral solution (ENTYCE®) increases food consumption and body weight when administered for 4 consecutive days to healthy adult beagle dogs in a randomized, masked, placebo controlled study. *BMC Vet Res*. 2017;13:10.
142. White HK, Petrie CD, Landschulz W, MacLean D, Taylor A, Lyles K, et al. Effects of an oral growth hormone secretagogue in older adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:1198–206.
143. Gustafson TL, Villamil A, Taylor BE, Flory A. A retrospective study of feline gastric lymphoma in 16 chemotherapy-treated cats. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2014;50:46–52.
144. Malik R, Gabor LJ, Foster SF, McCorkell BE, Canfield PJ. Therapy for Australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J*. 2001;79:808–17.
145. Mooney SC, Hayes AA, MacEwen EG, Matus RE, Geary A, Shurgot BA. Treatment and prognostic factors in lymphoma in cats: 103 cases (1977–1981). *J Am Vet Med Assoc*. 1989;194:696–702.
146. Thomas R. Cytogenomics of feline cancers: advances and opportunities. *Vet Sci*. 2015;2:246–58.
147. Mwangi W, de Figueiredo P, Criscitiello MF. One health: addressing global challenges at the nexus of human, animal, and environmental health. *PLoS Pathog*. 2016;12:e1005731.
148. Yuhki N, Beck T, Stephens R, Neelam B, O'Brien SJ. Comparative genomic structure of human, dog, and cat MHC: HLA, DLA, and FLA. *J Hered*. 2007;98:390–9.
149. Foukas PG, de Leval L. Recent advances in intestinal lymphomas. *Histopathology*. 2015;66:112–36.
150. Koch P, del Valle F, Berdel WE, Willich NA, Reers B, Hiddemann W, et al. Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: I. anatomic and histologic distribution, clinical features, and survival data of 371 patients registered in the German multicenter study GIT NHL 01/92. *J Clin Oncol*. 2001;19:3861–73.
151. Andrews CN, John Gill M, Urbanski SJ, Stewart D, Perini R, Beck P. Changing epidemiology and risk factors for gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma in a north American population: population-based study. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:1762–9.
152. Howell JM, Auer-Gziesiak I, Zhang J, Andrews CN, Stewart D, Urbanski SJ. Increasing incidence rates, distribution and histological characteristics of primary gastrointestinal non-Hodgkin lymphoma in a north American population. *Can J Gastroenterol*. 2012;26:452–6.
153. Perry AM, Warnke RA, Hu Q, Gaulard P, Copie-Bergman C, Alkan S, et al. Indolent T-cell lymphoproliferative disease of the gastrointestinal tract. *Blood*. 2013;122:3599–606.
154. Margolskee E, Jobanputra V, Lewis SK, Aloheid 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:e68343.



155. Zivny J, Banner BF, Agrawal S, Pihan G, Barnard GF. CD4+ T-cell lymphoproliferative disorder of the gut clinically mimicking celiac sprue. *Dig Dis Sci.* 2004;49:551–5.
156. Malamut G, Meresse B, Kaltenbach S, Derriex C, Verkarre V, Macintyre E, et al. Small intestinal CD4+ Tcell lymphoma is a heterogenous entity with common pathology features. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014;12:599–608.
157. Carbonnel F, Lavergne A, Messing B, Tsapis A, Berger R, Galian A, et al. Extensive small intestinal T-cell lymphoma of low-grade malignancy associated with a new chromosomal translocation. *Cancer.* 1994;73:1286–91.
158. Svrcek M, Garderet L, Sebbagh V, Rosenzweig M, Parc Y, Lagrange M, et al. Small intestinal CD4+ T-cell lymphoma: a rare distinctive clinicopathological entity associated with prolonged survival. *Virchows Arch.* 2007;451:1091–3.
159. Hirakawa K, Fuchigami T, Nakamura S, Daimaru Y, Ohshima K, Sakai Y, et al. Primary gastrointestinal Tcell lymphoma resembling multiple lymphomatous polyposis. *Gastroenterology.* 1996;111:778–82.
160. Egawa N, Fukayama M, Kawaguchi K, Hishima T, Hayashi Y, Funata N, et al. Relapsing oral and colonic ulcers with monoclonal T-cell infiltration. A low grade mucosal T-lymphoproliferative disease of the digestive tract. *Cancer.* 1995;75:1728–33.
161. Ranheim EA, Jones C, Zehnder JL, Warnke R, Yuen A. Spontaneously relapsing clonal, mucosal cytotoxic T-cell lymphoproliferative disorder: case report and review of the literature. *Am J Surg Pathol.* 2000;24:296–301.
162. Carbonnel F, d'Almagne H, Lavergne A, Matuchansky C, Brouet JC, Sigaux F, et al. The clinicopathological features of extensive small intestinal CD4 T cell infiltration. *Gut.* 1999;45:662–7.
163. Leventaki V, Manning JT, Luthra R, Mehta P, Oki Y, Romaguera JE, et al. Indolent peripheral T-cell lymphoma involving the gastrointestinal tract. *Hum Pathol.* 2014;45:421–6.
164. Matnani R, Ganapathi KA, Lewis SK, Green PH, Alobeid B, Bhagat G. Indolent T- and NK-cell lymphoproliferative disorders of the gastrointestinal tract: a review and update. *Hematol Oncol.* 2017;35:3–16.
165. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127:2375–90.
166. Axelsson E, Ratnakumar A, Arendt M-L, Maqbool K, Webster MT, Perloski M, et al. The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature.* 2013;495:360–4.
167. Wang G-D, Zhai W, Yang H-C, Fan R-X, Cao X, Zhong L, et al. The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans. *Nat Commun.* 2013;4:1860.
168. Schoenebeck JJ, Ostrander EA. Insights into morphology and disease from the dog genome project. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:535–60.
169. LeBlanc AK, Breen M, Choyke P, Dewhirst M, Fan TM, Gustafson DL, et al. Perspectives from man's best friend: National Academy of Medicine's workshop on comparative oncology. *Sci Transl Med.* 2016;8:324–9.
170. Berghoff N, Steiner JM. Laboratory tests for the diagnosis and management of chronic canine and feline enteropathies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2011;41:311–28.
171. Guzmán-de la Garza FJ, Ibarra-Hernández JM, Cordero-Pérez P, Villegas-Quintero P, Villarreal-Ovalle CI, Torres-González L, et al. Temporal relationship of serum markers and tissue damage during acute intestinal ischemia/reperfusion. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68:1034–8.
172. Terragni R, Morselli-Labate AM, Vignoli M, Bottero E, Brunetti B, Saunders JH. Is serum total LDH evaluation able to differentiate between alimentary lymphoma and inflammatory bowel disease in a real world clinical setting? *PLoS One.* 2016;11(3):e0151641.
173. Xenoulis PG, Steiner JM. Current concepts in feline pancreatitis. *Top Companion Anim Med.* 2008;23:185–92.
174. Waly NE, Stokes CR, Gruffydd-Jones TJ, Day MJ. Immune cell populations in the duodenal mucosa of cats with inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med.* 2004;18:816–25.
175. Said J. T-cell LPD of the GIT: first do no harm. *Blood.* 2013;122:3548–50.
176. Nijeboer P, de Baaij LR, Visser O, Witte BI, Cillessen SAGM, Mulder CJ, et al. Treatment response in enteropathy associated T-cell lymphoma; survival in a large multicenter cohort. *Am J Hematol.* 2015;90:493–8.

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)







### Analyse comparative de l'oncogenèse des lymphoproliférations T de bas grade du chorion de l'homme et du chat

**Mots clés :** lymphome digestif de bas grade, modèle animal, oncologie comparée, histologie, immunohistochimie, clonalité

**Résumé :** Les lymphoproliférations à cellules T du tractus gastro-intestinal (GI-TLPD) sont des lymphomes digestifs T primitifs très rares de l'homme, de diagnostic complexe, pour lesquels aucun consensus thérapeutique n'a encore été établi. Par ailleurs, une lymphoprolifération digestive indolente à cellules T (T-LGIL) émergente est décrite dans l'espèce féline et représente actuellement la première tumeur digestive chez le chat. La physiopathologie de ces deux entités reste très mal définie.

Nous avons analysé de manière extensive les prélèvements de 22 chats présentant un T-LGIL sur les plans clinique, paraclinique, histopathologique et moléculaire. Nos données indiquent que les caractéristiques du T-LGIL sont très similaires à celles de la GI-TLPD humaine et valident que ce modèle animal est pertinent pour l'étude de la maladie chez l'homme. Nous avons en outre mis en évidence une dérégulation de la voie JAK/STAT lors de T-LGIL qui pourrait représenter une cible thérapeutique d'intérêt, commune aux deux espèces.

Dans la seconde partie du travail, notre objectif a été l'identification de biomarqueurs susceptibles de discriminer les lymphoproliférations indolentes félines de bas-grade des entérites lymphoplasmocytaires, ce diagnostic différentiel étant un défi dans l'espèce féline. Nous avons établi de nouveaux critères histologiques et immunohistochimiques. En revanche, les données du séquençage du microbiote n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les deux groupes.

La synthèse de ces données nous a permis de proposer un nouveau modèle de lymphomagenèse basé sur un *continuum* entre une entéropathie inflammatoire chronique et l'émergence de clones néoplasiques T au sein de la muqueuse intestinale. Dans la suite de ce travail, un séquençage du virome ainsi qu'une analyse pangénomique et pantranscriptomique par whole genome et RNA sequencing sont actuellement en cours afin d'identifier les altérations oncogéniques impliquées dans la pathogenèse des T-LGIL.

### Comparative analysis of oncogenesis of low grade T-cell intestinal lymphoproliferative disorders in cat and human

**Keywords:** low-grade digestive lymphoma, animal model, comparative oncology, histology, immunohistochemistry, clonality

**Abstract:** T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract (GI T-LPD) is a rare and often misdiagnosed human primary gastrointestinal T-cell lymphoma, for which there is currently no therapeutic consensus. Meanwhile, an emerging indolent GI lymphoma subtype affecting the ageing domestic cat, named feline T-cell low grade intestinal lymphoma (T-LGIL) has become the first digestive neoplasia in this species. Little is known about the pathogenesis of indolent T-LPD in both species.

We therefore analyzed digestive samples of 22 cats diagnosed with T-LGIL and therefore, we performed an extensive clinical, paraclinical, histopathological and molecular characterization. Our data indicate that T-LGIL displays similar features as human GI TLPD and hence, may be considered as a relevant animal model for the human disease. We also showed that JAK/STAT pathway was deregulated in T-LGIL and could represent a potential therapeutic target for both species.

In the second part of the work, we aimed to identify biomarkers that can discriminate T-LGIL from its main differential diagnosis, i.e. lymphocytic-plasmacytic enteritis. We detected specific histological and immunohistochemical features. However, microbiota profiles were similar between both groups.

Altogether, these results prompted us to propose a new lymphomagenesis model based on a continuum between inflammatory bowel disease and clonal emergence of small T-cell lymphocytes within the intestinal mucosa. Further studies including virome sequencing, whole genome sequencing and RNA-sequencing are ongoing to better define specific oncogenic somatic events involved in T-LGIL pathogenesis.