



HAL
open science

Rôle de la molécule Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen (CLA) dans le développement des lymphomes T cutanés primitifs

Sara Peru-Davutoglu

► **To cite this version:**

Sara Peru-Davutoglu. Rôle de la molécule Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen (CLA) dans le développement des lymphomes T cutanés primitifs. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0311 . tel-04328130

HAL Id: tel-04328130

<https://theses.hal.science/tel-04328130v1>

Submitted on 7 Dec 2023

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue par
Sara PERU-DAVUTOGLU

**Rôle de la molécule *Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen*
(CLA) dans le développement des lymphomes T cutanés primitifs**

Sous la direction du Dr. Sandrine POGGIO

Soutenue le 06 Décembre 2021

Membres du jury :

Mme BONIFACE Katia , PR, Université de Bordeaux, U1035 INSERM Bordeaux	Présidente & Examinatrice
Mme MEGGETTO-PRADELLE Fabienne , DR1/CNRS, CRCT UMR1037 INSERM Toulouse	Rapporteure
M. ORTONNE Nicolas , PU-PH APHP, IMRB, INSERM U955 Créteil	Rapporteur
M. LAGARRIGUE Frédéric , CR, CNRS, UMR5089 Toulouse	Examineur
M. MERLIO Jean-Philippe , PU-PH, Université de Bordeaux, CHU de Bordeaux, U1053 INSERM	Membre invité
Mme POGGIO Sandrine , MCF, Université de Bordeaux, U1053 INSERM Bordeaux	Directrice de thèse

Titre : Rôle de la molécule Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen (CLA) dans le développement des lymphomes T cutanés primitifs

Résumé : Les lymphomes T cutanés primitifs (LTCP) regroupent des entités évolutives différentes, tels que le syndrome de Sézary (SS) ou les Mycosis Fongoïdes (MF), dont le point commun est une infiltration anormale de lymphocytes T CD4+ au niveau de la peau. Malgré l'augmentation de leur incidence, la compréhension de ces pathologies reste incomplète. Des études ont montré une hétérogénéité génétique et phénotypique des cellules de LTCP. En effet, les cellules de LTCP expriment des récepteurs et des molécules d'adhésion caractéristiques des différents types de lymphocytes T mémoires. Ces cellules expriment notamment l'association de molécules, Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen (CLA) et CCR4, qui pourraient être responsables de leur adressage cutané. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont montré que, la lignée My-La issue d'un MF-transformé (MF-T) est la seule lignée exprimant le CLA et qu'elle présente la prise de greffe la plus rapide et invasive dans un modèle de xénogreffe en comparaison aux autres lignées de LTCP. CLA pourrait donc être impliquée dans l'agressivité de l'invasion cutanée et/ou la dissémination des cellules de LTCP.

Environ la moitié des échantillons de patients atteints de SS (16 sur 36) contiennent plus de 50% de cellules CLA+ au sein de la population clonale tumorale circulante. Nous avons montré que le pourcentage de cellules CLA+ circulantes est inversement corrélé à la survie globale. Malgré un meilleur pronostic, les patients avec une expression élevée de CLA décèdent en moyenne 13 ans après le diagnostic. Dans un modèle expérimental *in vitro*, l'inhibition du CLA à l'aide d'un anticorps monoclonal (mAb HECA-452) diminue significativement la migration trans-endothéliale et la survie cellulaire des cellules de LTCP issues de SS et de la lignée My-La. La diminution de l'expression du CLA induite par un knock-down de son enzyme de maturation, ST3Gal-4, altère également la migration, la prolifération et la survie des cellules LTCP.

Nous avons pu confirmer *in vivo* dans un modèle de xénogreffe intra-hépatique de cellules de la lignée My-La que le traitement par mAb anti-CLA diminue leur tumorigénicité ainsi que leur dissémination dans différents tissus par rapport aux cellules traitées avec l'isotype contrôle.

La démonstration, *in vitro* et *in vivo*, de l'implication de CLA dans la migration et la survie des cellules de LTCP permet d'envisager son utilisation ou celle de son enzyme de maturation, ST3Gal-4, en thérapie ciblée pour les formes avancées des LTCP.

Mots clés : Lymphome T cutané primitif, cutaneous lymphocyte-associated antigen, migration cellulaire, survie

Title: Role of the Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen (CLA) molecule in the development of primary cutaneous T cell lymphomas

Abstract: Primary cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) group together different progressive entities, such as Sézary syndrome (SS) or Mycosis Fongoïdes (MF), the common point of which is an abnormal infiltration of CD4 + T lymphocytes in the skin. Despite the increase in their incidence, the understanding of these pathologies remains incomplete. Studies have shown genetic and phenotypic heterogeneity of CTCL cells. Indeed, CTCL cells express receptors and adhesion molecules characteristic of different types of memory T lymphocytes. These cells express in particular the association of molecules, Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen (CLA) and CCR4, which could be responsible for their cutaneous addressing. Preliminary results obtained in the laboratory have shown that the My-La cell line derived from an MF-transformed (MF-T) is the only cell line expressing CLA and that it presents the most rapid and invasive engraftment in a xenograft model compared to other CTCL cell lines. CLA could therefore be involved in the aggressiveness of skin invasion and / or the dissemination of CTCL cells.

Approximately half of the SS patient-derived samples (16 of 36) contain more than 50% CLA+ cells within the circulating clonal tumor population. We have shown that the percentage of circulating CLA+ cells is inversely correlated with overall survival. Despite a better prognosis, patients with elevated CLA expression die approximately 13 years after diagnosis. In an experimental *in vitro* model, inhibition of CLA using a monoclonal antibody (mAb HECA-452) significantly decreases transendothelial migration and cell survival of CTCL cells from SS and My-La cell line. The decrease in CLA expression induced by knock-down of its maturation enzyme, ST3Gal-4, also impairs the migration, proliferation and survival of CTCL cells.

We were able to confirm *in vivo* in an intrahepatic xenograft model of cells of the My-La cell line that treatment with anti-CLA mAb decreases their tumorigenicity as well as their dissemination in different tissues compared to cells isolated with the control isotype.

The demonstration, *in vitro* and *in vivo*, of the involvement of CLA in the migration and survival of CTCL cells makes it possible to consider its use or that of its maturation enzyme, ST3Gal-4, in targeted therapy for advanced forms of LTCP.

Keywords : cutaneous T-cell lymphomas, cutaneous lymphocyte antigen, cell migration, cell survival

Unité de recherche

**INSERM U1053-BaRITOn-Equipe Oncogénèse des Lymphomes Cutanés
Bat 3B, 2ème étage
146 rue Léo Saignat 33076 BORDEAUX**

REMERCIEMENTS

La thèse étant loin d'être un travail personnel, je voudrais dans un premier temps remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce travail. En effet, ce travail n'aurait pas pu avancer et aboutir sans l'aide d'un grand nombre de personnes.

Aux membres du Jury, qui m'ont fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Au Pr Katia BONIFACE, je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury de thèse et de juger ce travail.

Au Dr Fabienne MEGGETTO-PRADELLE et au Pr Nicolas ORTONNE, je tiens à vous remercier d'avoir accepté de rapporter ce travail.

Au Dr Frédéric LAGARRIGUE, je vous remercie pour l'évaluation de ce projet.

Aux Pr Jean-Philippe MERLIO et Pr Marie BEYLOT-BARRY, je vous remercie d'avoir accepté de m'accueillir au sein de votre laboratoire.

Au Dr Sandrine POGGIO, je voudrais spécialement te remercier pour ton encadrement scientifique durant ces trois années de thèse. Je te remercie pour ta disponibilité, ta patience, tes conseils et chacune de nos discussions qui ont participé à améliorer mes compétences. Je te remercie également pour ton soutien précieux dans cette dernière ligne droite. Ce fut un honneur d'avoir pu travailler aux côtés d'une personne aussi passionnée scientifiquement et j'espère sincèrement avoir été à la hauteur de tes espérances. Je te souhaite une très bonne continuation.

A Martina CARLOTTI, je voulais particulièrement te remercier pour ton soutien si précieux. Merci énormément pour tout : je te remercie pour les heures passées devant le FACS à analyser les données, pour les nombreuses discussions que nous avons eu, pour tes conseils et tes critiques... qui ont participé au développement de mon esprit critique scientifique. Mais je te remercie également pour ton soutien humain et ta présence continue. Ce fut un réel privilège de travailler aux côtés d'une personne aussi passionnée et enthousiaste qui n'hésite pas à transmettre son savoir. Je te souhaite une très bonne continuation.

Au Pr Anne PHAM-LEDARD, je tenais à vous remercier pour votre implication dans le projet et votre aide pour l'obtention des précieux échantillons de patients sur lesquels nous avons travaillé.

A tous les membres de l'équipe, ce fut un honneur de travailler auprès de personnes comme vous : **Edith CHEVRET**, **Laurence BRESSON-BEPOLDIN**, **Audrey GROS**, **Lamia AZZI-MARTIN**, **Yamina IDRISSE**, **Floriane CHERRIER**, **Thibaut BLONDY**, **Jacky**. Les moments partagés avec vous, autour de pâtisseries et chocolat ☺, à discuter vont me manquer. J'espère pouvoir vous revoir au plus vite et vous souhaite à tous beaucoup de bonheur.

Je remercie particulièrement **Lamia**, et sa franchise sans faille, merci énormément de m'avoir soutenu lors des moments les plus difficiles, mais aussi **Edith**, ma partenaire de bureau, pour sa gentillesse, les discussions et les conseils partagés. Je remercie également **Laurence** et **Yamina**, pour les précieuses discussions et partages et **Floriane** pour ton aide lors de cette dernière ligne droite. Je remercie également **Elodie** pour son aide précieuse.

Aux thésards et stagiaires de l'équipe 3, je vous remercie d'avoir été présents au cours de mon parcours et pour les nombreuses pauses goûters/Cappuccino partagées : Au **Dr Joaninha** qui « n'en peux plou », au **Dr Alain Chebly** qui a partagé de délicieuses spécialités libanaises et qui nous conseille qu'« Il faut jamais dire jamais ! Parce qu'on ne sait jamais... » (21/05/19), au **Dr Sarah Menguy** et ces précieuses discussions de fin de thèse. Bon courage pour la suite. Mais également à **Julia** qui a été d'un soutien et d'une aide si précieuse aux cours de cette dernière ligne droite. Je te souhaite une très bonne continuation et j'espère te revoir bientôt en Allemagne.

A tous les personnes qui sont responsables de la gestion des plateformes, je vous remercie pour votre aide et votre disponibilité.

A mes amies et collègues, **Camille**, **Juliette**, **Lornella**, **Sara**, **Jihane**, **Inès**, **Assia**, **Sarra**, **Salima**, **Myriam**, **Jihane**, **Aziza**, **Fatiha**, **Jennifer**, **Maimouna**, **Ibtissem**, et tant d'autres... Merci pour votre soutien sans faille.

A tous les membres de ma famille, qui ont toujours cru en moi, m'ont encouragée et ont été d'un énorme support sans cesse et ceux même dans les moments difficiles. Je vous aime énormément...

A mes frères, mon grand frère Karim (mon acolyte) et Bilal (mon second) toujours présent quand j'ai besoin...

A ma petite sœur, ma jumelle. Je te remercie énormément ma très chère sœur. Tu n'as pas arrêté de me soutenir quand tu étais auprès de moi ou à des kilomètres. Je n'ai pas pu être disponible comme je l'aurais souhaité, j'espère pouvoir me rattraper un jour. Merci pour tout.

A mes parents, je vous remercie pour votre soutien et votre grande patience pendant ces longues années d'étude. Je suis sincèrement reconnaissante pour tous les sacrifices que vous avez faits afin que je parvienne à mes objectifs. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous aviez fondés en moi.

A mon mari, merci à ma moitié. Je ne saurais exprimer toute ma gratitude pour ton soutien quotidien indéfectible, ta patience, tes sacrifices et ton encouragement à l'égard de mes travaux mais également dans la vie en général.

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer, je vous remercie...

Et je tiens également à faire une petite dédicace au **COVID-19** sans « *qui* » cette thèse n'aurait pas été la même. En effet, lors de cette thèse, il y a eu deux périodes un « *AVANT* » et « *APRES* » COVID avec toutes les contraintes et les difficultés associées.

SOMMAIRE

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	1
ABREVIATIONS	7
TABLE DES FIGURES.....	9
TABLE DES TABLEAUX	9
PREAMBULE.....	10
INTRODUCTION.....	12
I) Lymphopoïèse T.....	12
A) Développement des lymphocytes T.....	12
1) Dans la moelle osseuse	12
2) Dans le thymus : Maturation des lymphocytes T.....	14
3) Activation : Dans les organes lymphoïdes secondaires ou périphériques.....	20
B) L'immunité cutanée.....	25
1) Généralités : la peau	25
2) Les acteurs de l'immunité cutané innée	27
3) Les acteurs de l'immunité cutané adaptative : l'activation lymphocytaire.....	28
II) Les lymphomes T cutanés	32
A) Généralités.....	32
1) Définitions et classification de l'Organisation Mondiale de la Santé et l'European Organization for Research and Treatment of Cancer (OMS-EORTC).....	32
2) Classification TNMB.....	35
B) Caractéristiques cliniques	37
1) Mycosis Fongoïde (MF)	37
2) Le Syndrome de Sézary (SS)	38
C) Diagnostic	39
D) Evolution.....	42
E) Traitements actuels pour les lymphomes T cutanés primitifs (LTCP)	43
F) Caractéristiques génétiques et phénotypiques	46
1) Caractéristiques génétiques.....	46
a. Altérations cytogénétiques et génétiques des cellules de Sézary	46
b. Profils d'expression génique des cellules de Sézary et de Mycosis Fongoïde	47

2) Immunophénotypage des cellules de Sézary et de Mycosis Fongoïde	49
G) Caractéristiques des cellules tumorales de MF et de SS et de leur microenvironnement ..	51
1) Evolution du phénotype des cellules tumorales	51
2) Evolution du microenvironnement tumoral.....	52
H) Modèles d'étude <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	55
1) Les modèles utilisant des cellules murines ou murins transgéniques.....	55
2) Les modèles utilisant des cellules humaines	55
III) Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen (CLA).....	57
A) Molécules de la famille des P-selectin glycoprotein ligand-1	57
1) <i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i> (PSGL-1).....	57
2) Modifications post-traductionnelles	61
3) Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen (CLA).....	63
4) Rolling des lymphocytes T : rôle de l'interaction CLA/E-sélectine	64
B) Rôle de CLA dans les pathologies cutanées	65
1) Dans les pathologies inflammatoires cutanées.....	65
a. Psoriasis.....	66
b. Dermatite atopique	67
2) Dans le microenvironnement tumoral cutané	67
a. Mélanome cutané primitif.....	67
b. Lymphomes cutanés primitifs	68
IV) Problématique et Objectifs	69
RESULTATS.....	71
I) Publication: <i>Cutaneous Lymphocyte Antigen (CLA) is a potential therapeutic target in Cutaneous T Cell Lymphoma</i> (soumis à Journal of Investigative Dermatology).....	71
II) Caractérisation de l'expression du CLA à la surface des LT tumoraux dans les échantillons de sang de patients et corrélation aux données cliniques	114
A) Le pourcentage de LT mémoires CLA+ dans les échantillons de sang est un facteur pronostique.....	114
B) Le pourcentage séquentiel de LT mémoires CLA+ dans le sang de patient évolue différemment au cours de la maladie	116
III) Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet de CLA sur la survie et la prolifération des cellules de lymphomes T cutanés primitifs.....	118
IV) Développement d'un modèle pré-clinique afin de valider l'effet de l'anticorps anti-CLA <i>in vivo</i>	123
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	131

BIBLIOGRAPHIE	136
ANNEXES	159
I) Matériel et Méthodes	159
A) Cellules de Sézary de patients	159
B) Préparation des cellules de patients	159
C) Culture	159
1) Des cellules de patients.....	159
2) Des lignées de lymphomes T cutanés primitifs	160
3) Des cellules endothéliales	160
D) Caractérisation du clone TCRV β (cytométrie en flux)	160
E) Quantification de l'expression de CLA	161
F) Tri des cellules de patients et des My-La	161
G) Transduction des cellules My-La	161
H) Migration trans-endothéliale	162
1) Des cellules triées de patients et de la lignée cellulaire My-La	162
2) Évaluation du pourcentage de cellules migrantes	162
I) Evaluation de la prolifération.....	162
J) Evaluation de la mort cellulaire	163
K) RTqPCR.....	163
1) RTqPCR assay	163
2) RTqPCR ST3Gal-4.....	164
L) Modèles murins	164
M) Immunohistochimie (IHC)	164
N) Immunofluorescence (IF).....	165
O) Analyses statistiques.....	165
II) Publications annexes.....	166
A) Publication en préparation issue d'un projet en parallèle du projet de thèse (Co-premier AUTEUR) : <i>Involvement of CXCR4 chemoreceptor in Sézary cell homing and dissemination in preclinical model of Sézary Syndrome</i>	166
B) Publication issue du Projet de Master 2 (Co-premier AUTEUR) : <i>APRIL-producing eosinophils are involved in gastric MALT lymphomagenesis induced by Helicobacter sp infection</i>	196
C) Publication (participation lors d'un Projet de Master 1) : <i>TAZ controls Helicobacter pylori-induced Epithelial Mesenchymal Transition and cancer stem cell-like invasive and tumorigenic properties</i>	207

ABREVIATIONS

-A-

ADCC: *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*
Ag: Antigène
AICD : Mort cellulaire induite par activation
AMP : Peptides antimicrobiens

-C-

CAF: *Cancer-Associated-Fibroblasts*
CD: Cellules Dendritiques
CLA: Cutaneous Lymphocyte associated-Antigen
CLP: *Common Lymphoid Progenitor*
CMH: Complexe Majeur d'Hiscompatibilité
CMP : *Common Myeloid Progenitor*
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène
CSH : cellule souche hématopoïétique

-D-

DAMPs: *Danger Associated Molecular Patterns*
DD : *Death Domain*
DDC: Cellules Dendritiques Dermiques
DN: Double Négatif
DP: Double Positif

-E-

EGF: *epidermal growth factor* (EGF)
EORTC: *European Organization for Research and Treatment of Cancer*

-F-

FDA: *Food and Drug Administration*

-G-

GFLEC: Groupe Français d'Etude des Lymphomes Cutanés (GFLEC)
GMPS : *Granulocytic Myelomonocytic Progenitor*

-H-

HES: Hématoxyline Eosine Safran
HEV: *High Endothelial Venules*

-I-

ICAM-1: *InterCellular Adhesion Molecule-1*
IFN α : Interféron α
Ig: Immunoglobuline
ISCL: *International Society For Cutaneous Lymphomas*
ISP: Immature Simple Positif

-K-

KIRs: *Killer Immunoglobulin-like Receptors*

-L-

LFA-1: *Lymphocyte Function-associated Antigen 1*
LNH: Lymphomes Non Hodgkiniens
LT: Lymphocytes T
LCP: Lymphomes Cutanés Primitifs
LTCP: Lymphomes T Cutanés Primitifs
LT-CSH : *Long-term-CSH*
LT_{CM} : LT centraux mémoires
LT_{EM} : LT effecteurs mémoires
LT_{MM} : LT migratoires mémoires
LT_{RM} : LT résidents mémoires
LT_{SCM} : LT stem cell like mémoires

-M-

MDSC: *Myeloid-Derived Suppressor Cells*
MEC : Matrice extracellulaire
MEP : *Megakaryocyte Erythroid Progenitor*
MF: Mycosis Fongoïdes
MF-T: Mycosis Fongoïdes transformé
MMP: Métalloprotéases
MO: Moelle Osseuse
MPP : *Multipotent Progenitor*

-N-

NK: *Natural Killer*

-O-

OLS: *Organes Lymphoïdes Secondaires*

OMS: *Organisation Mondiale de la Santé*

-P-

PAMPs: *Pathogens Associated Molecular Patterns*

PCEC: *PhotoChimiothérapie ExtraCorporelle*

PRR: *Récepteurs de Reconnaissance des Pathogènes*

PSGL-1: *P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*

-S-

SALT: *Skin-Associated Lymphoid Tissues*

SASP: *Senescence-Associated Secretory Phenotype*

SDF-1: *Stroma cell-Derived Factor 1 (SDF-1)*

sLe^x: *sialyl Lewis*

SP: *Simple Négatif*

SS: *Syndrome de Sézary*

ST3Gal4: *CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase*

ST-CSH : *Short Term-CSH*

-T-

TCR: *T Cell Receptor*

Tfh: *T folliculaires helper*

Th: *Lymphocytes T helper*

TILs : *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*

TNMB: *Tumor Node Metastasis Blood*

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse : les progéniteurs hématopoïétiques et les différents lignages cellulaires.....	13
Figure 2 : Schéma simplifié de la lymphopoïèse	14
Figure 3 : Représentation schématique de la structure du récepteur des lymphocytes T.....	15
Figure 4 : Organisation des gènes des chaînes α , β , δ et γ	16
Figure 5 : Description des états de maturation et des réarrangements génétiques au cours des étapes de la différenciation thymique des LT humains.....	17
Figure 6 : Réarrangement des chaînes α et β du TCR au cours du développement du lymphocyte T dans le thymus	18
Figure 7 : Migration des lymphocytes T.	20
Figure 8 : Organisation d'un ganglion lymphatique	21
Figure 9 : L'activation et la différenciation des LT.....	23
Figure 10 : Schéma de l'architecture générale de la peau	26
Figure 11 : Contributions de T_{EM} et T_{CM} aux réponses immunitaires primaires de la peau.....	30
Figure 12 : Le rôle de T_{EM} et T_{CM} dans les réponses immunitaires secondaires	31
Figure 13 : Coupe de LTCP épidermotropes (MF et SS) et non épidermotropes (Lymphome cutané primitif à grandes cellules T CD30+)	34
Figure 14 : Les trois stades cliniques du MF.....	37
Figure 15 : Erythrodermie d'un syndrome de Sézary.....	38
Figure 16 : Cellule de Sézary	39
Figure 17 : Immunohistochimie anti-CD3.....	40
Figure 18 : Aspect pathologique et phénotypique du MF et du SS.....	49
Figure 19 : Etat du microenvironnement cutané au cours de la progression du MF/SS.....	52
Figure 20 : PSGL-1 est un checkpoint inhibiteur qui facilite l'exhaustion des LT	59
Figure 21 : Voie extrinsèque et intrinsèque menant à l'apoptose	60
Figure 22 : Structure de PSGL-1	61
Figure 23 : CLA est un glycovariant de la glycoprotéine P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)...	62
Figure 24 : Biosynthèse des sLe ^x	63
Figure 25 : L'adressage cutané des LT CLA+	65

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des Lymphomes T Cutanés primitifs selon la classification OMS-EORTC 2018	33
Tableau 2 : Classification TNMB révisée et simplifiée du MF et du SS par l'ISCL (International Society For Cutaneous Lymphomas) et l'EORTC	36
Tableau 3 : Stadification des lymphomes T cutanés de type MF/SS par l'ISCL/EORTC et correspondance avec le pronostic.....	38
Tableau 4 : Tableau récapitulatif non exhaustif des principaux traitements actuels pour les LTCP. .	44

PREAMBULE

Les lymphomes T cutanés primitifs (LTCP) appartiennent aux lymphomes non hodgkiniens et correspondent à une infiltration anormale de lymphocytes T au niveau de la peau. Ils regroupent des entités évolutives différentes telles que le Mycosis Fongoïdes (MF) qui est le plus fréquent. Il est caractérisé par l'apparition de patchs et plaques à la surface de la peau dû à une accumulation dermo-épidermique chronique et indolente de lymphocytes T CD4+ avec absence de cellules tumorales circulantes. Dans les stades avancés, un MF peut évoluer en MF-transformé (MF-T), une forme plus agressive associée à une transformation des lymphocytes T en grandes cellules. Parmi les LTCP, on retrouve une forme plus rare mais plus agressive que le MF, le Syndrome de Sézary (SS), qui est caractérisée par une érythrodermie associée à un prurit. Il s'agit d'une forme leucémisée car des cellules T CD4+ tumorales clonales sont détectées dans le sang qui sont, en général, identiques à la peau (Olsen et al. 2007 ; Scarisbrick et al. 2018). Dans les stades avancés, les patients ont un mauvais pronostic en raison de l'agressivité de la pathologie et d'un manque de traitement curatif. En effet, parmi les nombreux traitements (photochimiothérapie extracorporelle, anticorps monoclonaux...), le seul traitement curatif disponible actuellement est la transplantation de moelle osseuse pour les patients jeunes et bon répondeurs (de Masson et al. 2014). L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est donc nécessaire afin de proposer de nouveaux traitements de ces lymphomes.

Dans le cadre de mon projet de thèse, nous nous sommes focalisés sur le SS et le MF-T, des formes avancées des LTCP, qui nous permettent d'obtenir des quantités suffisantes de cellules tumorales pour nos expériences fonctionnelles. Malgré l'augmentation de leur incidence, la compréhension de ces pathologies reste incomplète. De nombreuses études ont tenté de caractériser les cellules de LTCP et ont montré une hétérogénéité d'un point de vue génétique, rendant ainsi plus difficile l'identification de drivers moléculaires et de cibles thérapeutiques communs au plus grand nombre de patients (Chevret E et al. 2016). L'origine de ces lymphomes cutanés n'est pas claire. En effet, l'immunophénotype des cellules T CD4+ est différent selon les patients, et même hétérogène au sein d'un même échantillon. En effet, on retrouve des cellules à différents stades d'activation (lymphocytes T résidents effecteurs mémoires, effecteurs mémoires, centraux mémoire ou naïves) mais associé en général à une polarisation Th2 (Roelens et al. 2017 ; Kim EJ et al. 2005). Ainsi, on ne connaît pas la cellule à l'origine de la maladie (cellule naïve et/ou mémoire) ni son origine tissulaire, notamment dans le cas du SS. En effet, l'expression des molécules d'adressage tissulaire est également hétérogène. Les cellules de LTCP expriment des chimiorécepteurs et des molécules

d'adhésion impliquées dans l'adressage au sein des ganglions lymphatiques (CCR7 et L-sélectine), dans la moelle osseuse (CXCR4) et dans la peau telles que le CCR4 et Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen (CLA) (Narducci et al. 2006 ; Campbell et al. 2010 ; Roelens et al. 2017).

Des résultats préliminaires ont montré que, dans un modèle de xénogreffe intra-hépatique développé au laboratoire, la lignée My-La issue d'un MF-T est la seule lignée exprimant le CLA et qui présente la prise de greffe la plus rapide et invasive par comparaison aux autres lignées de LTCP (Andrique et al. 2016). Nous avons donc émis l'hypothèse que CLA pourrait être impliqué dans l'agressivité de l'invasion cutanée et/ou la dissémination de ces cellules.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'expression de CLA dans la population clonale tumorale chez les patients atteints de SS au sein de la cohorte du Service d'Oncodermatologie du CHU de Bordeaux (Partie Résultats I. Publication) et corrélié cette expression aux données cliniques (Partie Résultats II.). CLA semble être une cible intéressante car environ la moitié des échantillons (16 sur 36) contiennent plus de 50% de cellules CLA+ au sein de la population clonale tumorale circulante. Dans un second temps, nous avons étudié le rôle fonctionnel de CLA dans la migration trans-endothéliale et la survie des cellules de LTCP *in vitro* ainsi que dans leur dissémination *in vivo* dans un modèle de xénogreffe (Partie Résultats I. Publication). Nous nous sommes ensuite focalisés sur la compréhension des mécanismes moléculaires qui pourraient expliquer l'effet de CLA sur la leucémogénèse T cutanée (Partie Résultats III.). Enfin, nous avons axé le projet sur le développement d'un modèle pré-clinique afin de valider l'effet de l'anticorps anti-CLA sur des tumeurs pré-établies dans un modèle de xénogreffe (Partie Résultats IV).

INTRODUCTION

Les lymphomes T cutanés primitifs que nous étudions sont caractérisés par une accumulation de lymphocytes $Ta\beta$ $CD4+$ tumoraux au niveau de la peau. Afin de mieux comprendre ces pathologies, je commencerai mon introduction par quelques notions sur la lymphopoïèse T et plus particulièrement, la maturation et l'activation de ces lymphocytes T.

I) Lymphopoïèse T

Les défenses de l'organisme sont assurées par des réactions du système immunitaire. Deux grands types de réponses sont impliqués : l'immunité innée dont la réponse est large et immédiate et l'immunité adaptative dont la réponse plus tardive a une spécificité restreinte à un antigène (Janeway et al. 2009).

Les lymphocytes sont les cellules majeures de la réponse immunitaire adaptative. Elles sont de petite taille (7-15 μ m) avec un rapport nucléo/cytoplasmique élevé et une chromatine dense. On retrouve les lymphocytes B qui ont un rôle dans l'immunité humorale en produisant les anticorps spécifiques de l'agent pathogène et les lymphocytes T (LT) qui eux ont un rôle dans l'immunité cellulaire en détruisant directement ou indirectement les cellules infectées, les cellules cancéreuses... Ces cellules ont différentes localisations en fonction de leur stade de maturation et possèdent une haute spécificité de reconnaissance des antigènes au stade mature (Janeway et al. 2009 ; Netea MG et al. 2019). Nous nous intéressons ici tout particulièrement aux LT au cours de leur développement et leur activation dans les organes lymphoïdes secondaires et enfin au sein du microenvironnement cutané.

A) Développement des lymphocytes T

1) Dans la moelle osseuse :

L'hématopoïèse est le processus qui permet de maintenir une production régulée et continue de l'ensemble des cellules hématopoïétiques d'un individu à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) qui a des capacités telles que l'auto-renouvellement et la multipotence (Figure 1). L'auto-renouvellement permet de maintenir un pool de CSH car elles sont capables, lorsqu'elles se divisent, de donner au moins une cellule fille identique. La multipotence correspond à la capacité à générer les différents types de cellules hématopoïétiques matures. Au fur et à mesure de la différenciation les cellules vont perdre ces propriétés. Les CSH expriment chez l'Homme des marqueurs tels que le CD34. En fonction des signaux auxquels elles sont soumises, elles peuvent se

différencier en *Multipotent Progenitor* (MPP) et s'engager pour se différencier en progéniteurs myéloïdes (*Common Myeloid Progenitor* (CMP)) ou lymphoïdes (*Common Lymphoid Progenitor* (CLP)) par des étapes de maturation fonctionnellement irréversibles. Les CMP peuvent donner des *Granulocytic-Myelomonocytic Progenitor* (GMPs), qui se différencient ensuite en monocytes/macrophages et granulocytes, et des *Megakaryocyte Erythroid Progenitor* (MEP), qui produisent des mégacaryocytes/plaquettes et des érythrocytes. Les CLP, quant à eux, sont à l'origine de la production des LT, des lymphocytes B et des *Natural Killer* (NK). L'ensemble des cellules sanguines vont terminer leur maturation dans la moelle osseuse, sauf les LT dont la maturation s'achève dans le thymus (Yin and Li, 2006 ; Janeway et al. 2009 ; Scharf P et al. 2020).

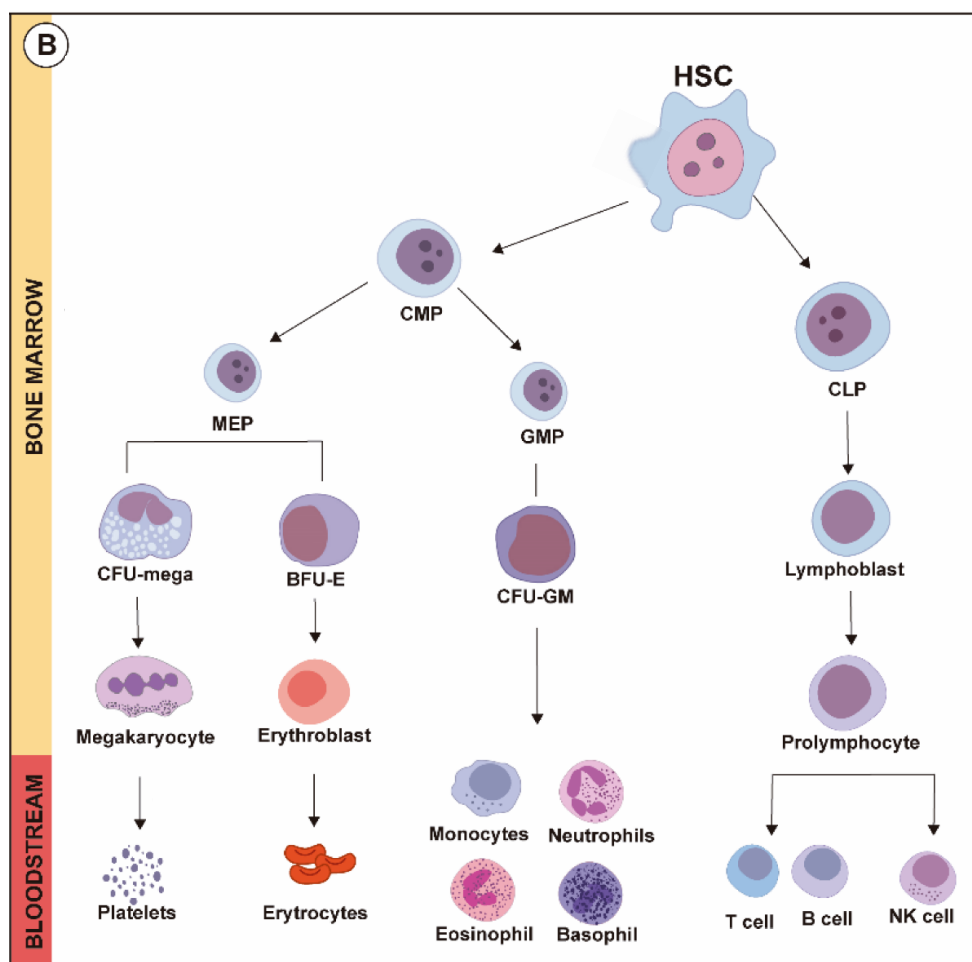


Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse : les progéniteurs hématopoïétiques et les différents lignages cellulaires

HSC: Hematopoietic Stem Cell; CMP: Common Myeloid Progenitor ; CLP: Common Lymphoid Progenitor ; MEP: Megakaryocyte Erythroid Progenitor ; GMP: Granulocytic-Myelomonocytic Progenitor ; BFU-E : burst-forming unit erythroid ; CFU : colony-forming unit (Scharf P et al. 2020)

2) Dans le thymus : Maturation des lymphocytes T

Certains CLP migrent ensuite dans le thymus pour poursuivre leur différenciation en LT grâce à l'expression de chimiorécepteurs (Figure 2). En effet, il a été montré dans un modèle murin que ce mécanisme de migration serait médié par les chimiorécepteurs CCR7 et CCR9 présents à la surface des CLP (Scimone et al. 2006).

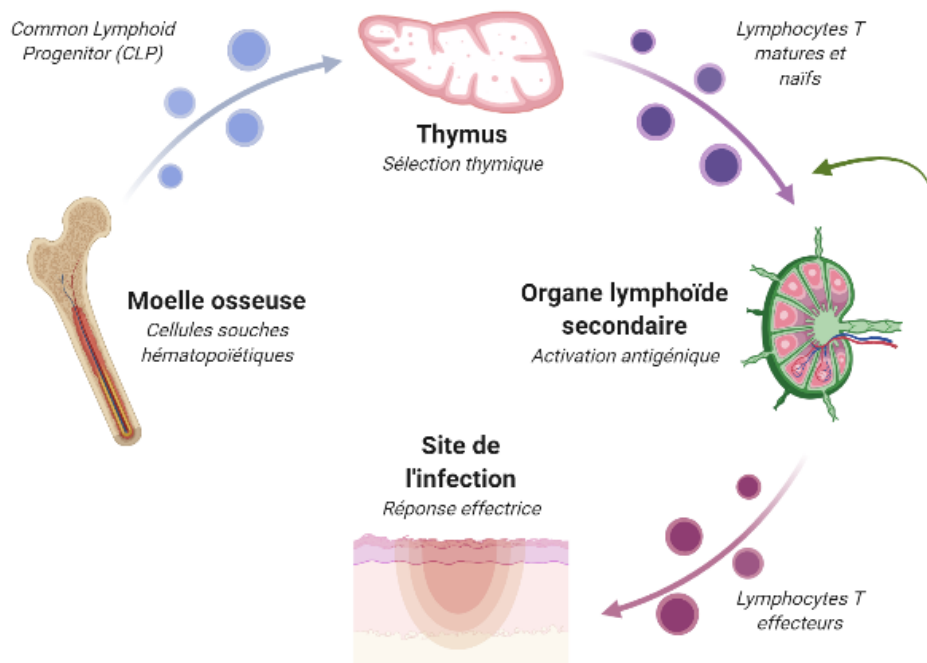


Figure 2 : Schéma simplifié de la lymphopoïèse.

Les progéniteurs lymphoïdes provenant de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse migrent vers le thymus afin de terminer leur maturation et subir la sélection thymique (positive et négative). A la fin de ce processus, les cellules T sont naïves et matures puis migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS) pour rencontrer l'antigène du non-soi dont elles sont spécifiques. Lors de la rencontre avec l'antigène, les lymphocytes T s'activent, prolifèrent, se différencient et acquièrent des propriétés effectrices. Ces cellules peuvent alors migrer vers le site d'infection pour accomplir leurs fonctions. Les lymphocytes T naïfs non activés peuvent recirculer entre les différents OLS (Réalisé sur BioRender.com).

A l'inverse des cellules de l'immunité innée qui expriment à leur surface de nombreux récepteurs différents dédiés à la reconnaissance de l'antigène, le LT n'en possède qu'un seul type : le T cell antigen receptor (TCR). Le TCR est capable de reconnaître spécifiquement un épitope donné de l'antigène. Lors de la maturation dans le thymus, des milliers de lymphocytes ayant un récepteur spécifique sont produits grâce à un système de recombinaisons génétiques. Ceci permet de générer un répertoire diversifié et unique pour chaque individu (Raulet et al. 1985). Les réarrangements des gènes codant pour les chaînes du TCR sont conservés dans les cellules clonales issues de la cellule T activée à l'origine (Law H et al. 2020 ; Janeway et al. 2009).

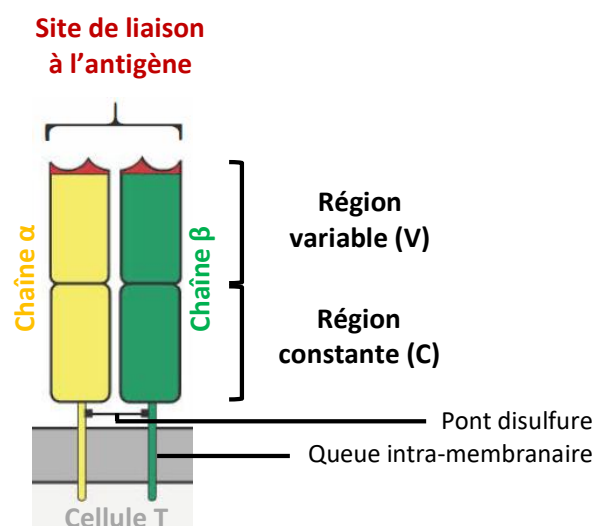


Figure 3 : Représentation schématique de la structure du récepteur des lymphocytes T (d'après Janeway et al. 2009)

Il existe deux principaux types de LT, un majoritaire $\alpha:\beta$ (CD3+CD4+ ou CD3+CD8+) et un minoritaire $\gamma:\delta$ (CD3+CD4-CD8-). Le TCR est composé de deux chaînes, α et β ou γ et δ reliées par un pont disulfure. Chaque chaîne est constituée de deux régions (Figure 3) : une partie constante avec une queue intra-membranaire et une partie variable. Le site de reconnaissance de l'antigène se situe au niveau de la région variable qui contient une séquence que l'on appelle séquence hypervariable (CDR pour régions déterminantes complémentaires). Les gènes codant pour la partie variable sont composés de segments de gènes et chaque gène code pour une petite portion de la partie variable. La combinaison entre les différents segments de gènes permet d'avoir une multitude de recombinaisons génétiques différentes et donc de protéines différentes (Figure 4) (Piepenbrink et al. 2013 ; Law H et al. 2020 ; Janeway et al. 2009).

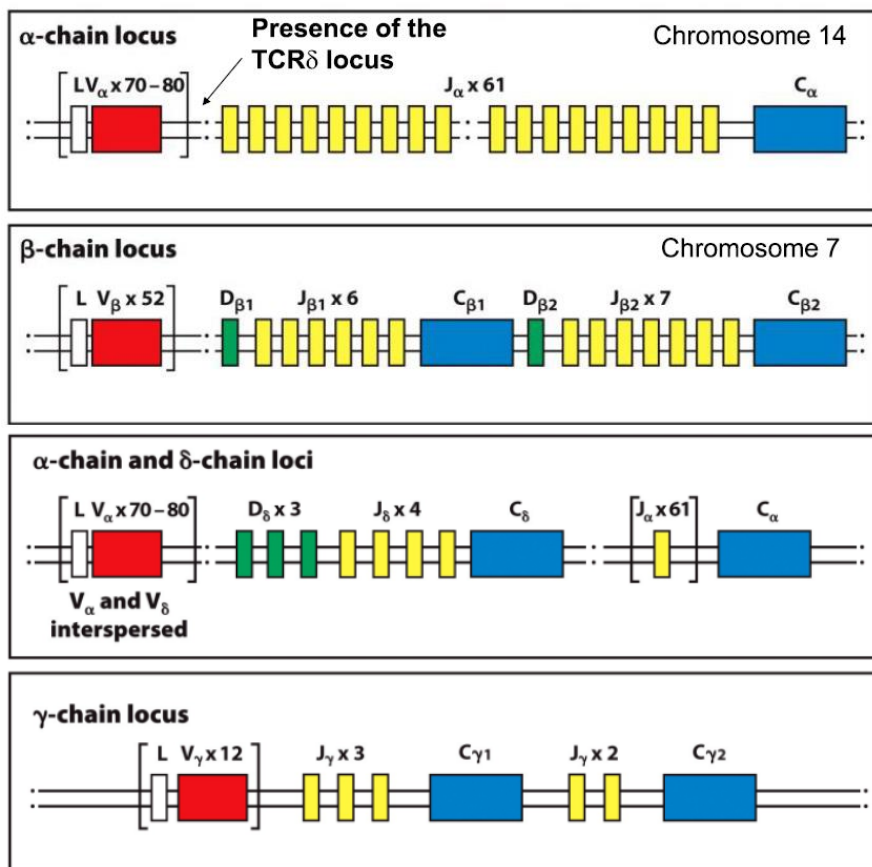


Figure 4 : Organisation des gènes des chaîne α , β , δ et γ .

Chaque chaîne est constituée d'une région constante (C, en bleu). Le locus de la chaîne α (chromosome 14) contient, en plus, 70-80 segments géniques de variabilité (V, en rouge) et un ensemble de 61 segments géniques de jonction (J, en jaune). Le locus de la chaîne β (chromosome 7) contient 52 segments géniques V (rouge) et deux ensembles séparés contenant chacun un segment génique C (bleu), 6 ou 7 segments J (jaune) et un seul segment de diversité (D, en vert). En comparaison avec la chaîne α , la chaîne β possède en plus des segments D (vert). Le locus de la chaîne δ se situe dans le locus de la chaîne α entre les segments géniques V_{α} (rouge) et J_{α} (jaune), il est également constitué de segments géniques V (rouge), de 3 segments géniques D (vert) et de 4 segments géniques J (jaune). Le locus de la chaîne γ (chromosome 7) contient 12 segments géniques V (rouge), 2 gènes C (bleu) précédés de 3 et 2 segments géniques J (jaune) (Janeway et al. 2009).

Au cours de la maturation des LT dans le thymus, les gènes β , γ ou δ sont réarrangés presque simultanément. L'orientation $\alpha:\beta$ ou $\gamma:\delta$ dépend du type de TCR fonctionnel exprimé en premier et la probabilité de former des TCR $\alpha:\beta$ est plus importante car il ne nécessite que le réarrangement fonctionnel de la chaîne β et son appariement à une chaîne substitutive de la chaîne α (Figure 5). Les LT $\gamma:\delta$ matures peuvent contenir des gènes de chaînes β réarrangées mais la plupart ne sont pas productifs. A l'inverse, les LT $\alpha:\beta$ peuvent contenir des gènes de chaînes γ réarrangés mais la plupart sont en décalage de phase (Janeway et al. 2009 ; van der Burg M et al. 2014). Les LT $\gamma:\delta$ sont peu présents au niveau des tissus mais ils reconnaissent plus de ligands et ne sont pas restreints par la reconnaissance des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ils peuvent reconnaître des antigènes dans un contexte non classique et peuvent se lier à des antigènes natifs. Ils sont donc à la frontière entre l'immunité innée et adaptative (Sciammas et al. 1994 ; Ciofani et al. 2006 ; Beetz et al. 2007 ; Janeway et al. 2009). Nous nous intéressons ici uniquement aux LT $\alpha:\beta$ que nous appellerons LT dans la suite du manuscrit.

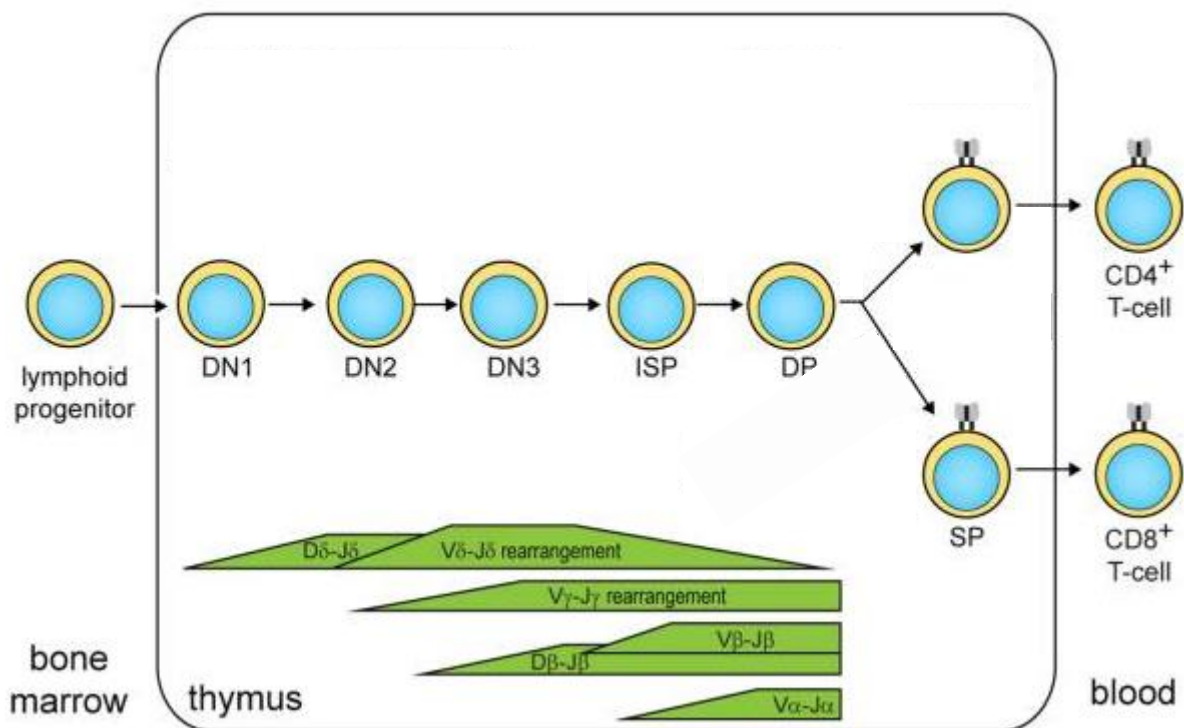


Figure 5 : Description des états de maturation et des réarrangements génétiques au cours des étapes de la différenciation thymique des LT humains (d'après van der Burg M et al. 2014)

DN : Double Négatif ; ISP : Immature Simple Positif, DP : Double Positif, SP : Simple Positif

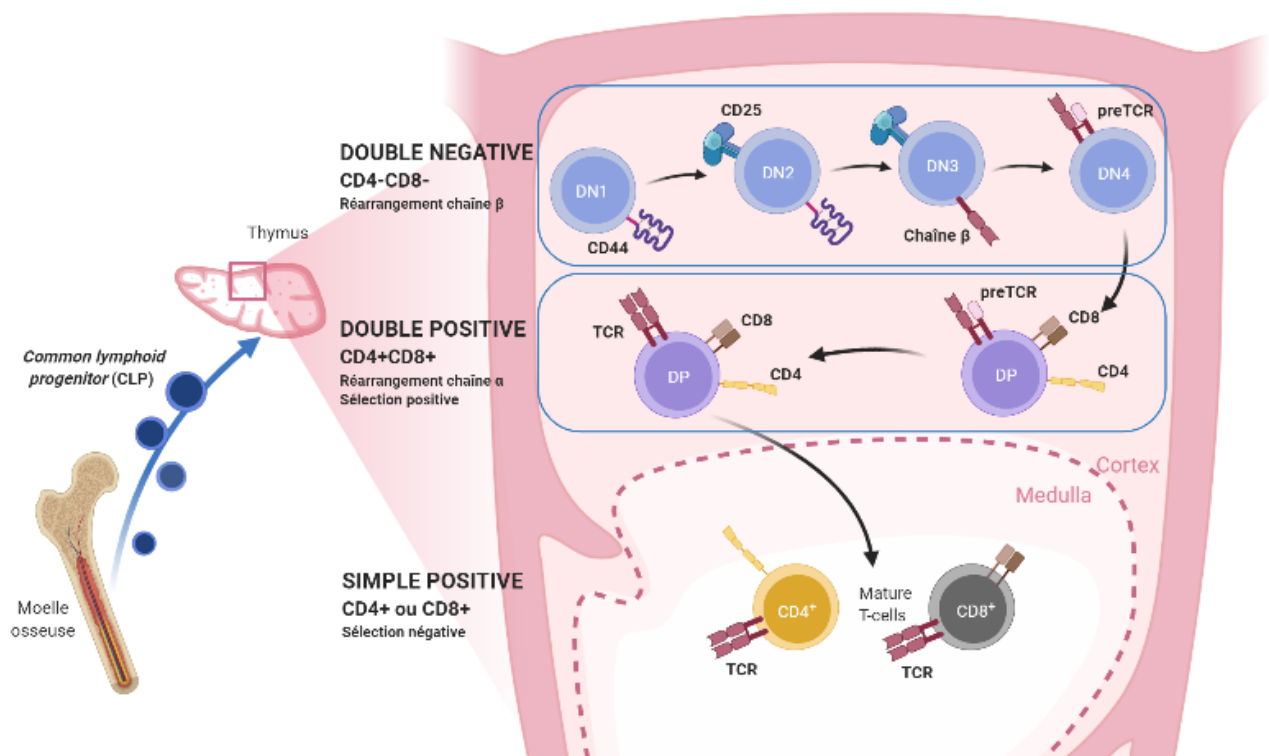


Figure 6 : Réarrangement des chaînes α et β du TCR au cours du développement du lymphocyte T dans le thymus

Le thymus est un organe lymphatique central constitué de nombreux lobules. Chaque lobule contient une région corticale (externe) et médullaire (centrale). Le cortex est constitué de thymocytes immatures, de cellules épithéliales corticales interconnectées auxquelles les thymocytes corticaux immatures sont étroitement associés, et de macrophages dispersées impliqués dans l'élimination des thymocytes. Les thymocytes dans la couche cellulaire corticale externe sont des cellules immatures qui prolifèrent, tandis que les thymocytes de la corticale profonde sont principalement des cellules T immatures subissant une sélection thymique. La médullaire est formée de thymocytes matures, de cellules épithéliales médullaires avec des macrophages et des cellules dendritiques. (Réalisé sur BioRender.com d'après Hosokawa et al. 2021 ; Law et al. 2020 ; Janeway et al. 2009).

Comme illustré sur la Figure 6, dans la corticale thymique, les thymocytes provenant de progéniteurs lymphoïdes communs sont lors des premiers stades de la différenciation des cellules immatures CD4-CD8- dites doubles négatives (DN). Ce stade DN est constitué de 4 phases que l'on identifie par l'expression de molécules à la surface des cellules telles que le CD44, le CD25 (sous-unité α du récepteur à l'IL2) et de facteurs de transcriptions que je ne détaillerai volontairement pas ici. Le réarrangement de la chaîne β du TCR a lieu au cours des stades DN2 et DN3. En effet, 3 segments géniques sont réarrangés, le segment génique D se réarrange avec un segment génique J (DN2) puis le segment V au segment DJ pour former la chaîne β . Cette chaîne va s'apparier à une chaîne

substitutive de la chaîne α et constitué ainsi le pré-TCR. Ce récepteur s'assemble au complexe CD3 pour permettre la transduction du signal responsable de la prolifération. Au cours de la prolifération, les cellules passent par des changements phénotypiques immunitaires, des cellules immatures simples positives (ISP) apparaissent lorsque les thymocytes expriment le co-récepteur CD4 en l'absence de niveaux élevés de CD3. Par la suite, il y a une co-expression de CD4 et CD8 (Saint-Ruf et al. 1994; von Boehmer, 2005 ; Staal FJ et al. 2016). Les cellules sont alors doubles positives (DP) (Figure 6). A ce stade, au niveau de la chaîne α , un segment génique V se réarrange avec un segment génique J formant un exon fonctionnel qui code la région variable de la chaîne α du TCR. Après la transcription et l'épissage de l'exon VJ et C, l'ARNm généré va être traduit pour produire la chaîne α (Alam et al. 1996). Les chaînes α et β peuvent alors s'apparier pour former l'hétérodimère $\alpha:\beta$ (Turner SJ et al. 2006).

Au stade DP, au sein de la corticale thymique, a lieu une sélection positive qui permet de conserver seulement les cellules ayant une affinité pour les CMH du soi (Benoist and Mathis, 1989). Cette sélection permet la différenciation des LT soit en cellules simples positives (SP) CD8+ ou SP CD4+ (Figure 6). Les LT dont le TCR a une affinité pour les CMH de classe I exprimés par la plupart des cellules deviendront CD8+ alors que ceux qui ont une affinité pour le CMH II exprimés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) se différencieront en LT CD4+ (Goldrath and Bevan, 1999; Scollay et al. 1980; Germain, 2002; Singer et al. 2008; Singer and Bosselut, 2004). Les LT SP CD4+ ou CD8+ vont migrer vers la médullaire thymique pour subir une sélection négative afin d'éliminer les LT auto-réactifs qui seraient capables de reconnaître trop fortement les antigènes du soi (Campbell et al. 1999 ; Kim et al. 1998 ; Witt et al. 2005) (Figure 6).

A la fin de cette étape, les LT CD8+ et CD4+ sont naïfs car ils n'ont pas encore rencontré l'antigène du non-soi dont ils sont spécifiques. Les LT CD8+, appelés cytotoxiques, ont pour fonction principale de tuer directement les cellules infectées alors que les LT CD4+ (*helper* ou auxiliaires) régulent la réponse immunitaire en favorisant par exemple la réponse des CPA ou l'activation primaire des lymphocytes B. Nous allons nous focaliser maintenant sur l'activation des LT CD4+ qui sont les cellules à l'origine des lymphomes T cutanés que nous étudions.

3) Activation : Dans les organes lymphoïdes secondaires ou périphériques

Les LT CD4+ expriment des combinaisons de récepteurs à des cytokines, chimiokines et des molécules d'adhésion qui leur sont propres constituant ainsi *un pass* d'entrée dans différents tissus (Figure 7).

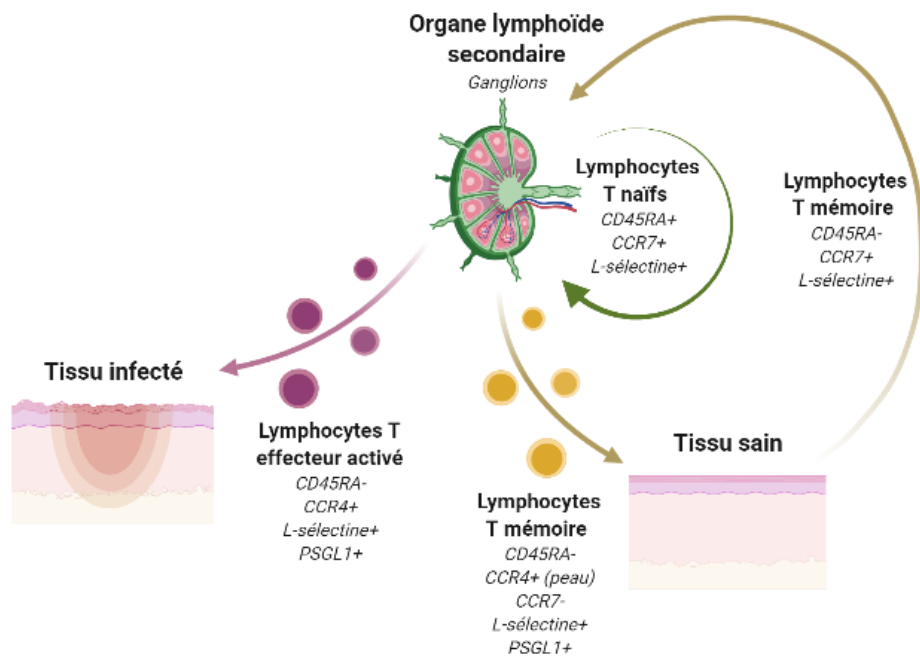


Figure 7 : Migration des lymphocytes T.

La migration des lymphocytes T dans les différents tissus est possible grâce à l'expression combinée de molécule d'adhésion, de récepteur aux chimiokines (Réalisé sur BioRender.com).

Les LT CD4+ naïfs sont identifiés comme étant CD45RA+CCR7+L-sélectine+ et peuvent ainsi circuler et migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS) (Figure 7) (Butcher and Picker, 1996 ; Foster et al. 1999 ; Jenkins MK et al. 2001 ; Sallusto F et al. 2004). Les OLS sont des tissus où se concentrent les lymphocytes et au niveau desquels s'effectue l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Parmi les OLS, on retrouve les ganglions lymphatiques (Figure 8), la rate et les tissus associés aux muqueuses.

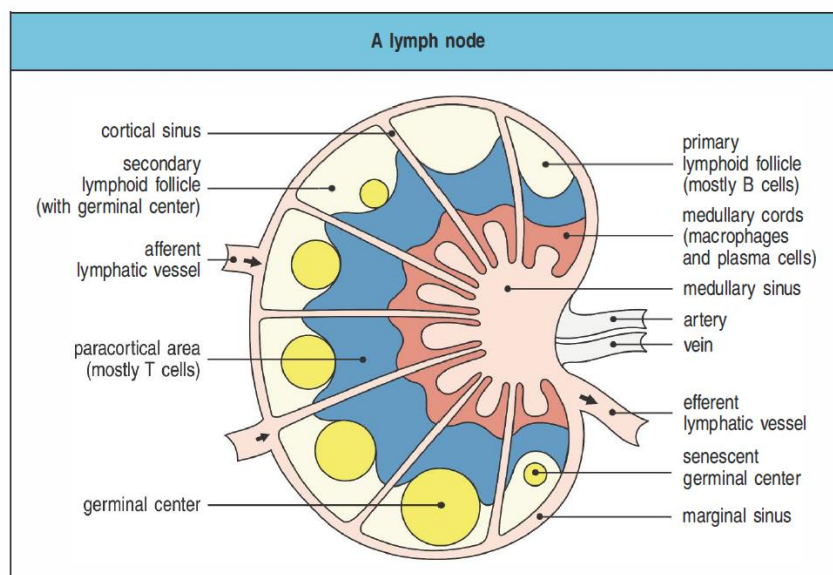


Figure 8 : Organisation d'un ganglion lymphatique (Janeway et al. 2009).

Le ganglion lymphatique, en coupe longitudinale, est composé d'un cortex et d'une zone médullaire. On trouve en périphérie, une zone corticale externe qui contient notamment les follicules qui correspondent au foyer de prolifération des lymphocytes B. La partie interne du cortex, en contact direct de ses follicules, est la paracorticale. Elle contient essentiellement des LT. Dans la zone centrale dite médullaire, on retrouve des cordons contenant des cellules dendritiques (CD) et des plasmocytes.

Dans le cas du ganglion lymphatique, les lymphocytes naïfs migrent et se localisent au niveau de la zone paracorticale afin d'être activés suite à la rencontre de leur antigène spécifique. L'activation des LT sollicite la présence des cellules dendritiques (CD) qui sont des cellules phagocytaires mais aussi des CPA (Roche PA et al. 2015). Les CD sont générées dans la MO et migrent en tant que cellules précurseurs vers des sites d'entrée potentielle d'agents pathogènes. Les CD classiques CD11c^{high} résident sous forme de cellules immatures dans l'épithélium des tissus cutanés et muqueux. Les agents pathogènes et/ou facteurs produits par les cellules voisines en réponse à des agents pathogènes vont initier l'immunité adaptative en activant les CD qui seront alors des cellules effectrices matures immunostimulatrices (Kapsenberg ML, 2003). Les CD qui ont rencontré, phagocyté et présenté un antigène du non-soi sur une molécule du CMH, migrent vers le ganglion et entrent par les vaisseaux lymphatiques afférents. Si elles sont immatures non activées, elles entrent par la circulation afin de rencontrer des antigènes solubles qui pénètrent par les vaisseaux lymphatiques afférents (Sixt et al. 2005). Les CD se retrouvent alors dans la zone médullaire afin de présenter aux LT le complexe CMH-antigène exposé à leur surface. Les CD vont fournir les signaux

nécessaires afin d'activer les LT suite à l'induction de 3 signaux détaillés ci-dessous (Kapsenberg ML, 2003).

Le TCR a un rôle de reconnaissance mais également de signalisation. En effet, le TCR seul n'a pas la capacité de transmettre un signal intracellulaire. Les chaînes α et β sont liées à des molécules de signalisation telles que le complexe CD3 qui permet de transduire le signal intracellulaire du TCR. Mais cette signalisation par le TCR n'est pas suffisante pour activer le LT. En effet, les corécepteurs, les molécules de co-stimulation et les signaux liés aux cytokines sont essentiels pour aboutir à cette activation. L'activation des LT nécessite différents signaux (Figure 9) : (Okazaki T et al. 2013)

- **1^{er} signal** : Il s'agit de la reconnaissance par le TCR de l'antigène du non-soi sous forme de petites séquences peptidiques associées à une molécule de CMH II. Le changement de conformation du TCR, induit le recrutement du corécepteur CD4 qui induit le premier événement dans la cascade de signalisation intracellulaire (Chakraborty AK et al. 2014).
- **2^{ème} signal** : Le signal de co-stimulation positif ou négatif qui est crucial pour le devenir de la réponse immunitaire. Par exemple, le plus courant est l'interaction médiée par CD28 ou CD40L, présent à la surface du LT, se liant respectivement au CD80/CD86 ou CD40, présents à la surface des CD qui induit un signal de survie contrairement à celle médié par CTLA-4, présent à la surface des LT, qui aboutit à l'inactivation du LT afin de contrôler leur expansion clonale. De même que PD-1 capable de se lier à PD-L1 ou PD-L2 et qui induit une perte de fonctionnalité et un état d'anergie ou épuisement (exhaustion) (Sansom DM, 2000 ; Okazaki T, 2013 ; Chen L, 2013).
- **3^{ème} signal** : Le signal soluble de différenciation qui permet d'orienter et polariser la réponse effectrice du LT en fonction du microenvironnement cytokinique (Gasper DJ et al. 2014).

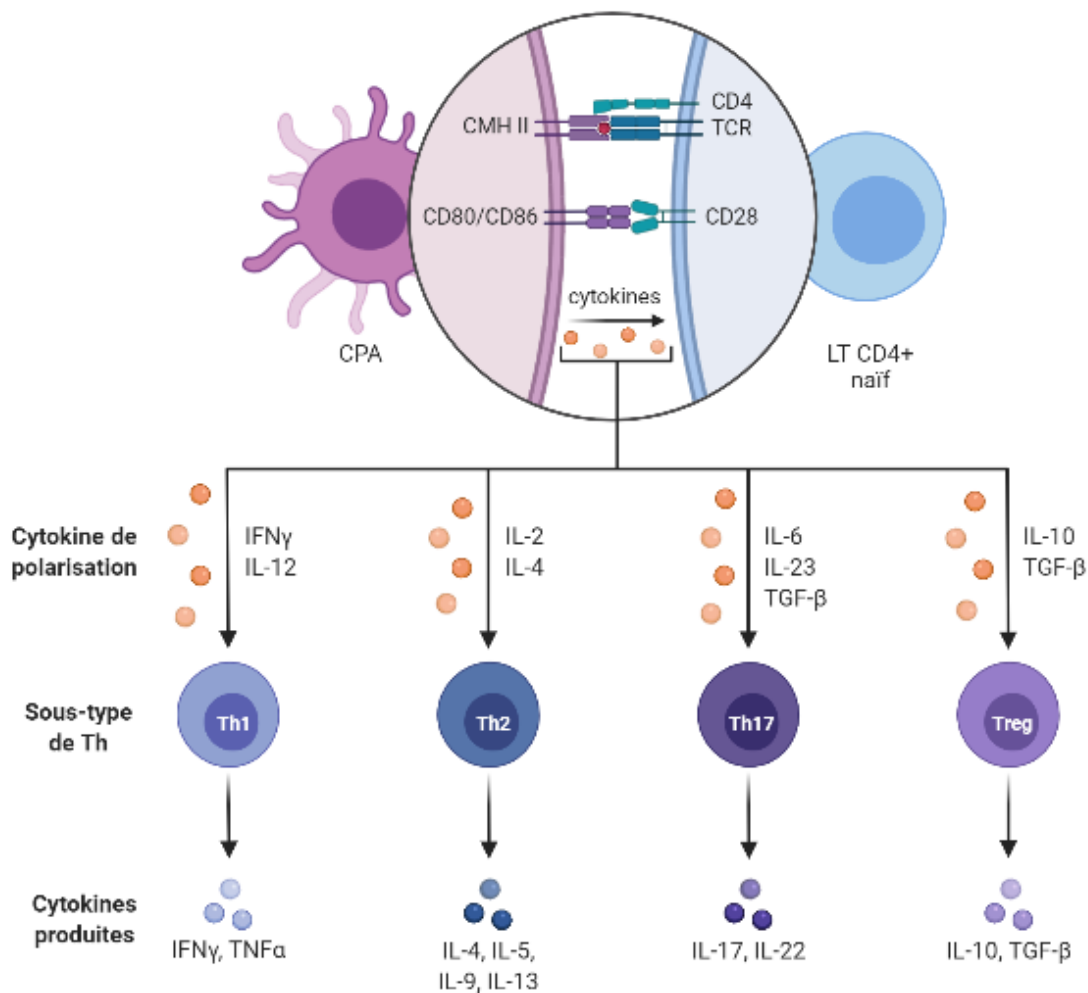


Figure 9 : L'activation et la différenciation des LT (Réalisé sur BioRender.com d'après Kapsenberg ML 2003 ; Hall BM, 2015).

Suite à cette activation, le LT CD4+ va subir une expansion clonale, afin de produire un clone de cellules identiques, puis se polariser (Figure 9) (Swain SL et al. 2012). Il existe différents types de LT *helper* (Th) avec des fonctions différentes : Th1 (production interféron- γ (IFN- γ), TNF α et caractérisé par l'expression de *Tbet*), Th2 (production IL-4, IL-5 et IL-10 et caractérisé par l'expression de *GATA3*), Th17 (production IL-17, IL-22 et caractérisé par l'expression de *ROR γ T*) mais également, *T folliculaires helper* (Tfh) (production IL-4 et IL-21 et exprime CXCR5 et CD40L) et d'autres entités récemment identifiées et moins bien caractérisées comme les Th9 (production IL-9 et expression de *PU.1*) et qui sembleraient avoir un effet pléiotrope en ayant, entre autres, une fonction anti-parasitaire contre les infections helminthiques mais également une fonction anti-tumorale en inhibant la croissance des

cellules de mélanome. On trouve également les cellules LT régulateurs caractérisées par l'expression de *FOXP3* et qui eux ont un rôle immunosuppresseur et de contrôle de la réponse immunitaire (Trinchieri G et al. 2003 ; Luckheeram RV et al. 2012 ; Keene and Forman, 1982 ; Sun and Bevan, 2003 ; Breitfeld et al. 2000 ; Schaerli et al. 2000 ; Infante-Duarte et al. 2000 ; Hall BM, 2015 ; Ivanov et al. 2006 ; Purwar et al. 2012).

Les LT CD4+ activés expriment des récepteurs aux chimiokines et molécules d'adhésion spécifiques qui vont permettre leur migration des ganglions *via* les vaisseaux lymphatiques efférents et leur adressage au site d'infection au niveau des tissus *via* la circulation sanguine, c'est le cas des Th2 mais plus particulièrement du Th1 qui supporte l'activation des LT CD8+, des CD et des macrophages (Figure 7). Les cellules T CD4+ activées spécifiques des antigènes du non-soi peuvent également rester dans les OLS pour soutenir la réponse B, c'est le cas des Th2 et des lymphocytes Tfh (Keene and Forman, 1982 ; Sun and Bevan, 2003 ; Breitfeld et al. 2000 ; Schaerli et al. 2000).

A la fin de cette expansion et différenciation, les cellules T activées effectrices vont mourir après avoir médié leur action. En parallèle, des cellules vont se différencier en cellules mémoires. Il y a alors un pool de cellules mémoires qui se forme et qui va pouvoir persister et/ou re-circuler dans l'organisme afin de conférer une immunité à long terme et une activation plus rapide (Figure 7) (Gasper DJ et al. 2014).

B) L'immunité cutanée

1) Généralités : la peau

Un des premiers remparts auquel les pathogènes font face est la barrière physique de la peau. Elle permet d'arrêter la plupart des pathogènes et molécules extérieures. Cette fonction est notamment possible grâce aux différents composants de la peau et la présence des cellules immunitaires cutanées qui constituent le SALT (skin-associated lymphoid tissues) (Streilein 1983 ; Tay et al. 2014).

La peau est constituée de 3 couches de l'extérieur vers l'intérieur : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 10).

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié, dit malpighien kératinisé, non vascularisé dans lequel les cellules épithéliales très cohésives grâce à des jonctions de type desmosome empêchent la pénétration physique de certains microbes. Cet épithélium est composé de 4 types de cellules : les kératinocytes (cellules épithéliales), les mélanocytes, les cellules de Merkel (cellules sensorielles) et les cellules de Langerhans (CD). Les kératinocytes constituent la population majoritaire et jouent donc un rôle important dans la fonction barrière de la peau mais ont également un rôle de senseur. En effet, ils sont capables de détecter les agents pathogènes et de médier les réponses immunitaires (Nestle et al. 2009).

Le derme est une couche intermédiaire, c'est un tissu de soutien conjonctif vascularisé et innervé contenant les annexes cutanées (follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares). Les fibroblastes et les cellules immunitaires qui le constituent sont dispersés dans une matrice extracellulaire (MEC) composée de substance fondamentale et de fibres de collagène et d'élastine. On peut trouver dans le derme des cellules dendritiques dermiques (DDC), des macrophages, des mastocytes, des LT CD4+ et quelques LT $\gamma:\delta$ et lymphocytes NK (Figure 10). La composition cellulaire du derme est dynamique et peut être modifiée au cours d'une inflammation et du vieillissement par exemple.

L'hypoderme est la couche la plus profonde, c'est un tissu de soutien conjonctivo-adipeux qui permet de relier la peau aux organes sous-jacents. Il a des fonctions métaboliques, mécaniques et thermorégulatrices.

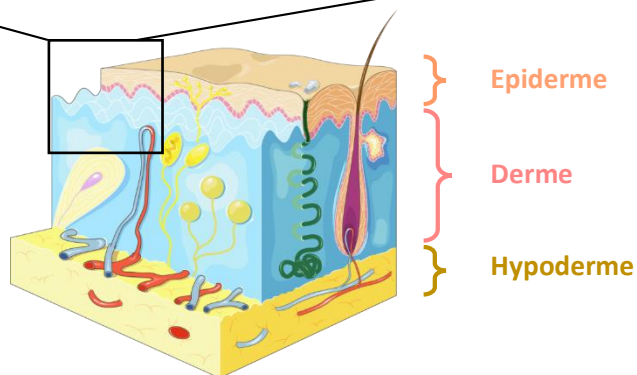
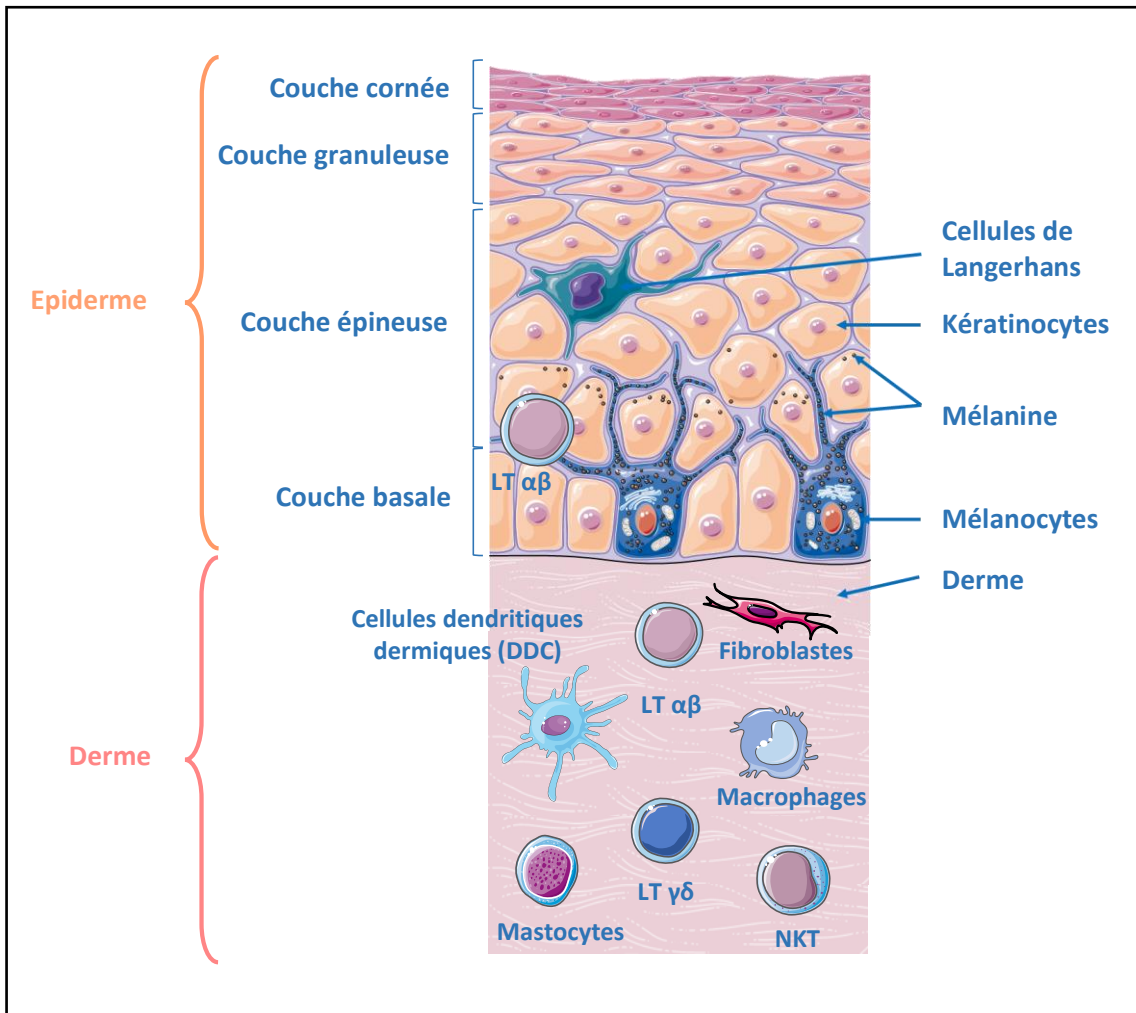


Figure 10 : Schéma de l'architecture générale de la peau.

Les deux couches principales de la peau sont, de l'extérieur vers l'intérieur, l'épiderme qui est épithélium de revêtement non vascularisé et le derme qui est une couche intermédiaire de tissu de soutien conjonctif vascularisé contenant les annexes cutanées. On retrouve en dessous du derme, l'hypoderme qui est aussi un tissu de soutien conjonctivo-adipeux qui permet de relier la peau aux organes sous-jacents (D'après Nestle et al. 2009)

2) Les acteurs de l'immunité cutané innée

Les kératinocytes jouent un rôle dans l'immunité innée. En effet, ces cellules possèdent à leur surface des récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR). La capacité de reconnaître les signaux de dangers (PAMPs = Pathogens Associated Molecular Patterns et DAMPs = Danger Associated Molecular Patterns) sous des formes différentes (lipides, protéines...) *via* ces récepteurs permet d'induire une réponse inflammatoire. Les kératinocytes sont alors capables de produire des peptides antimicrobiens (AMP) qui ont un rôle dans la mort locale des pathogènes grâce à une action antibiotique et dans le recrutement des cellules inflammatoires (Gallo and Nakatsuji, 2011). Les kératinocytes peuvent également produire des cytokines (IL-1, IL-6, IL-10, IL-18 et TNF α) et des chimiokines. La production de CXCL1 et CXCL8 par les kératinocytes permet le recrutement des polynucléaires neutrophiles alors que CCL20, CXCL9, CCL10, CCL11 attirent les LT. Les polynucléaires neutrophiles recrutés lors de l'inflammation vont phagocyter ou lyser directement les pathogènes ou les cellules les ayant internalisés et sécréter des cytokines inflammatoires (Albanesi et al. 2005 ; Nestle et al. 2009).

Au niveau de la peau, des macrophages, des mastocytes, des LT γ : δ et NK sont également retrouvés. Les macrophages sont des cellules phagocytaires qui possèdent également des PRR et peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines afin d'attirer spécifiquement les cellules immunitaires au niveau du site d'infection. Ils peuvent être résidents au niveau du derme ou dérivés de progéniteurs circulants dans le sang (Pasparakis et al. 2014). Les mastocytes ont un rôle dans la réponse Th2 et plus particulièrement lors des réponses inflammatoires allergiques. Les NK, quant à eux, jouent un rôle dans l'immunité antivirale et la surveillance tumorale (Nestle et al. 2009).

La liaison entre l'immunité innée et adaptative est assurée par les CD. On retrouve les cellules de Langerhans résidentes au niveau de l'épiderme et les DDC au niveau du derme. Les CD jouent un rôle de surveillance immunitaire et une fois activées suite à la reconnaissance de l'antigène *via* leur PRR et leur récepteur phagocytaire, elles migrent vers les OLS pour induire l'immunité adaptative à partir des LT naïfs comme vu précédemment. Mais les CD ont plus de chance de rencontrer et de présenter l'antigène non-soi aux LT mémoires présents dans la peau afin de les activer (Clark RA, 2010).

3) Les acteurs de l'immunité cutané adaptative : l'activation lymphocytaire

Les LT résidents de la peau sont à 95% des cellules dont le phénotype est mémoire contre 5% de naïfs (Clark RA, 2010). En fonction de leur localisation principale, on retrouve plusieurs types de cellules LT CD4+ mémoires (Ratajczak W et al. 2018 ; Masopust D et al. 2001 ; Moser B et al. 2001 ; Sallusto F et al. 1999 ; Weninger W et al. 2001) :

- **Les LT stem cell like mémoires (LT_{SCM})** (CCR7+L-sélectine+CD45RA+) : ce sont des cellules qui ont des caractéristiques similaires aux cellules naïves et aux cellules souches telles que la capacité d'auto-régénération qui semblerait être dû à l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Gattinoni et al. 2011). Comme vu précédemment, les cellules naïves expriment également CCR7+L-sélectine+ CD45RA+, l'expression de certaines molécules telles que le CD95 par les LT_{SCM} permettra de les distinguer (Gattinoni L et al. 2017).
- **Les LT centraux mémoires (LT_{CM})** (CCR7+L-sélectine+CD45RO+) : ils sont capables de circuler entre les OLS et le sang et n'ont pas de fonction inflammatoire ou cytotoxique (Rivino L et al. 2004).
- **Les LT migratoires mémoires (LT_{MM})** (CCR7+L-sélectine-) : ce sont des cellules qui ne sont pas capables de migrer dans les ganglions lymphatiques non cutanés à partir du sang comme les LT naïfs et les LT_{CM}. Ils circulent dans la peau, le sang et les ganglions lymphatiques drainant la peau seulement. Cette population semble être un état transitoire entre les LT_{CM} et les LT_{EM} (Watanabe et al. 2015).
- **Les LT effecteurs mémoires (LT_{EM})** (CCR7-L-sélectine-) : La majorité des LT_{EM} expriment CD45RO et peuvent migrer entre la rate et les tissus périphériques (non-lymphoïdes) et recirculer entre le sang et les tissus. Ils ont des propriétés effectrices et expriment des chimiorécepteurs qui leur permettent d'être attirés dans les tissus périphériques lors d'une inflammation tels que le CXCR3 et CCR5 (Abdel-Hakeem MS et al. 2017).
- **Les LT résidents mémoires (LT_{RM})** (CD69+CCR7-L-sélectine-) : ils résident dans les tissus périphériques (ex. peau) sans re-circuler afin d'induire une réponse immunitaire rapide.

Comme vu précédemment, les LT naïfs et LT_{CM} expriment la L-sélectine qui est capable de se lier à GlyCAM-1, un ligand exprimé par les *high endothelial venules* (HEV) des OLS. La liaison de la L-sélectine à GlyCAM-1 permet de garder les LT au niveau des OLS. En revanche, les LT_{EM} n'expriment

pas la L-sélectine et restent donc à la périphérie (Maverakis E et al. 2015). Les LT_{CM} et LT_{EM} vont participer à la réponse immunitaire de la peau (Figure 11 et 12).

Afin d'être adressé à la peau, les LT_{EM} expriment à leur surface des molécules spécifiques telles que CLA (Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen) et perdent l'expression de L-sélectine et CCR7. En effet, même en condition non inflammatoire, une grande majorité des LT exprimant CLA sont dans la peau. Le CLA interagit avec la E-sélectine exprimée par les veinules post-capillaires dans la peau et dont l'expression augmente en condition inflammatoire. Cette interaction permet l'adressage cutané de ces cellules. Les cellules adressées à la peau expriment CCR4 (Th2), CCR8 (Th2) et CCR10 (Th2), CXCR3 (Th1) (Homey et al. 2002 ; Singh et al. 2008 ; Egawa and Kabashima, 2011 ; Islam et al. 2011). CCR4 et CCR10 sont des chimiorécepteurs permettant l'adressage à la peau *via* leur interaction avec les chimiokines CCL17/CCL22 et CCL27 respectivement (Campbell JJ et al. 2010 ; Xiong N et al. 2012). Les LT_{RM} peuvent aussi exprimer CD69 et/ou CD103 afin de les maintenir au niveau cutané. Les LT_{RM} vont donc proliférer localement et dans le cas d'une exposition à un pathogène par les CD produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ et l'IL-4. L'inflammation va notamment induire l'augmentation des molécules d'adhésion telles que les sélectines, comme la E-sélectine, et les protéines de la superfamille des immunoglobulines, comme *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), sur l'endothélium des vaisseaux sanguins près du site d'infection. L'inflammation induit également la modification conformationnelle d'intégrines, comme *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1), présent à la surface des leucocytes et donc le recrutement de cellules immunitaires dont des LT mémoires non spécifiques afin qu'ils produisent des cytokines inflammatoires de manière non dépendante à l'exposition d'un pathogène (Clark RA, 2010 ; Watanabe et al. 2015). En revanche, lorsque l'accumulation des LT dans la peau est anormale, cela devient pathologique. C'est le cas des lymphomes T cutanés primitifs.

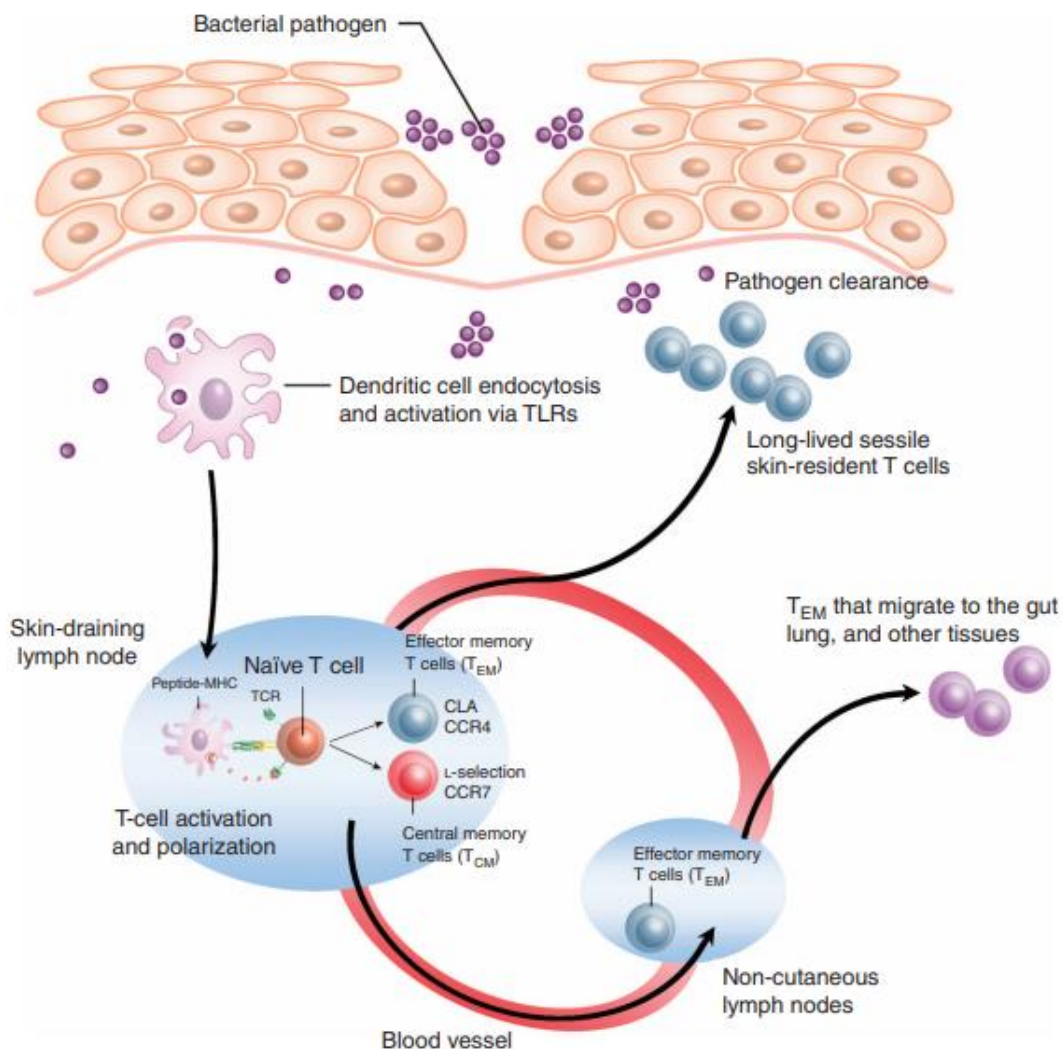


Figure 11 : Contributions de T_{EM} et T_{CM} aux réponses immunitaires primaires de la peau.

Après l'exposition à un agent pathogène, les CD internalisent l'antigène, migrent vers les ganglions lymphatiques drainants de la peau et le présentent aux lymphocytes T naïfs. Les lymphocytes T naïfs qui reconnaissent leur antigène spécifique subissent une différenciation et une polarisation en lymphocytes T effecteurs mémoires de la peau (T_{EM}) et en lymphocytes T centraux mémoires (T_{CM}). Les T_{EM} quittent les ganglions lymphatiques, pénètrent dans la circulation et migrent dans la peau pour éliminer l'agent pathogène. Les T_{EM} colonisent toutes les zones de la peau, mais se trouvent en plus grand nombre sur les sites d'exposition aux agents pathogènes. Au cours des premiers stades de la réponse immunitaire, les lymphocytes T proliférants sont également libérés des ganglions lymphatiques drainant de la peau et migrent vers les ganglions lymphatiques. Les lymphocytes T continuent de proliférer dans ces ganglions lymphatiques, donnant naissance à de nouvelles populations de T_{EM} dans l'intestin, les poumons et d'autres tissus périphériques. De cette façon, l'immunisation par la peau donne naissance à une population diversifiée de lymphocytes T résidents tissulaires qui permettent une protection immunitaire systémique (Clark RA, 2010).

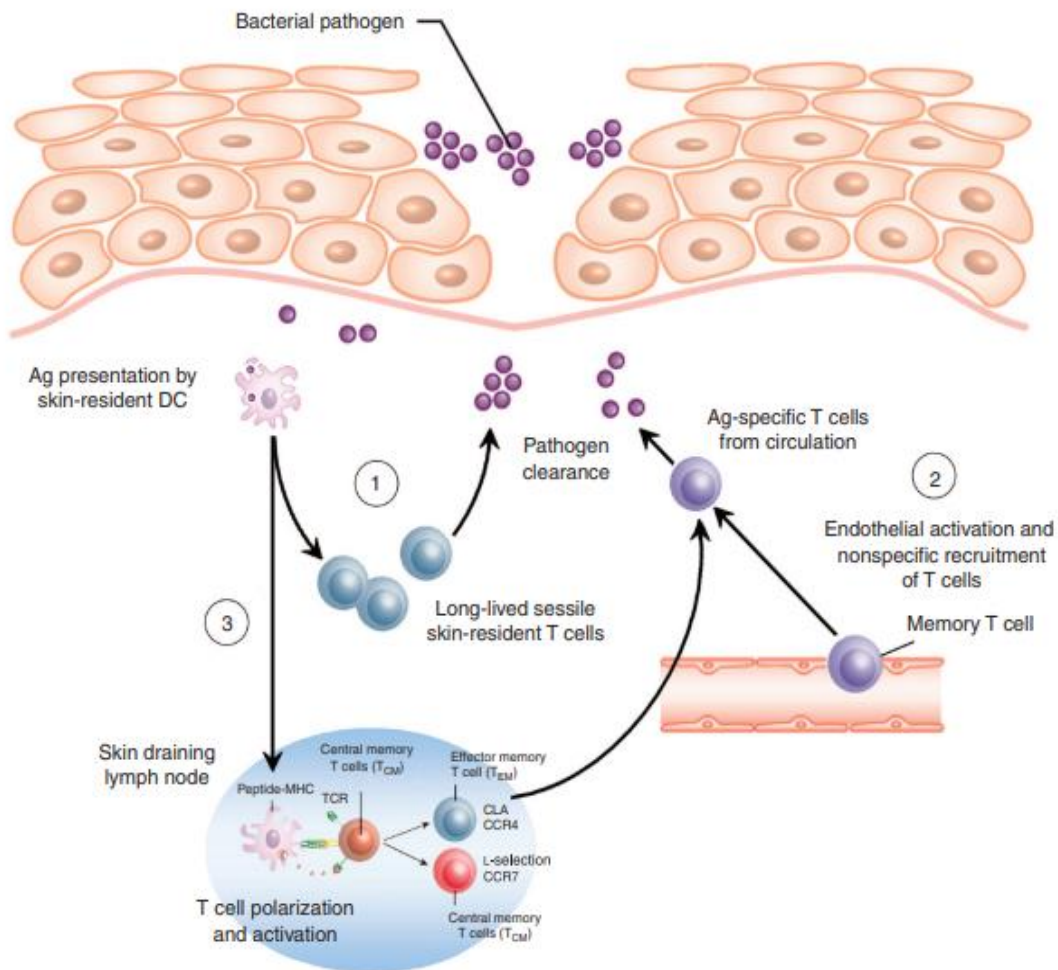


Figure 12 : Le rôle des LT_{EM} et LT_{CM} dans les réponses immunitaires secondaires.

Les réponses immunitaires mémoires peuvent être divisées en trois étapes. Tout d'abord, les CD internalisent l'antigène après une réexposition à l'agent pathogène et le présentent aux T_{EM} qui résident localement dans la peau. Ces cellules prolifèrent et éliminent l'agent pathogène. Deuxièmement, l'inflammation entraîne une activation endothéliale et un recrutement non spécifique des lymphocytes T provenant du sang. Le petit nombre de lymphocytes T spécifiques de l'antigène recrutés dans la peau peut également participer à l'élimination de l'agent pathogène. Troisièmement, les CD transportent l'antigène endocyté vers les ganglions lymphatiques drainant de la peau et le présente aux T_{CM}. Ces T_{CM} peuvent donner naissance à de nouvelles populations de T_{EM} cutanés qui migrent vers la peau et éliminent l'infection (Clark RA, 2010).

II) Les lymphomes T cutanés

A) Généralités

1) Définitions et classification de l'Organisation Mondiale de la Santé et l'European Organization for Research and Treatment of Cancer (OMS-EORTC)

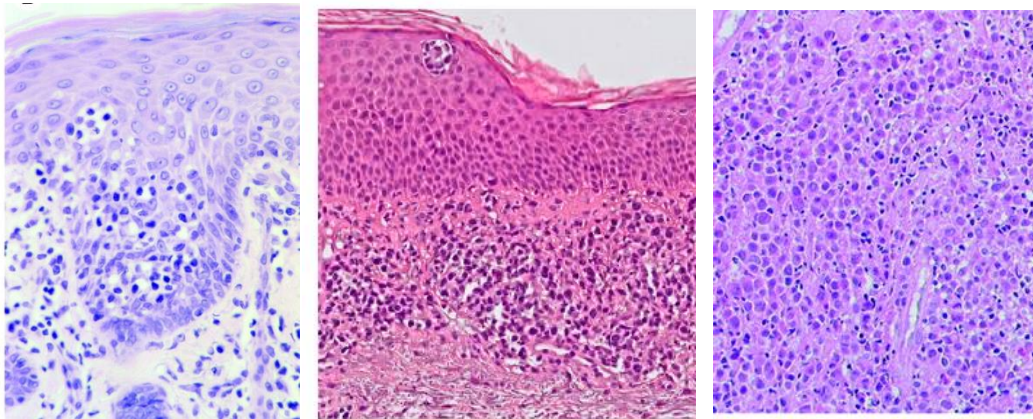
Les lymphomes cutanés primitifs (LCP) représentent la deuxième localisation la plus fréquente des lymphomes non hodgkiniens (LNH) extra-ganglionnaires après les lymphomes digestifs. Un lymphome est une pathologie cancéreuse du système lymphatique qui se développe à partir de lymphocytes. Les LCP regroupent un ensemble hétérogène de lymphomes B et T liés à une accumulation clonale anormale de lymphocytes B ou T au niveau de la peau et dans la plupart des cas sans atteinte extra-cutanée au moment du diagnostic. On peut retrouver des entités spécifiquement cutanées et/ou des entités systémiques avec une atteinte cutanée. Il est important de les distinguer des localisations secondaires cutanées, de lymphomes d'autres origines, qui présentent des caractéristiques cliniques et des pronostics différents et qui nécessitent également des traitements différents. C'est l'une des raisons pour laquelle les LCP ont intégrés, depuis 2005, la classification consensus commune entre l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) : OMS-EORTC. Cette classification repose sur des caractéristiques anatomo-cliniques, morphologiques, phénotypiques et moléculaires et évolue en permanence (Bagot M. 2013 ; Willemze R et al. 2005 ; Willemze R et al. 2019).

Les lymphomes T cutanés primitifs (LTCP) représentent 75 à 80% des LCP (Bagot M. 2013 ; Willemze R et al. 2005 ; Willemze R et al. 2019) et sont dus à une accumulation en premier lieu de LT néoplasiques dans la peau. Les patients ont un âge médian au diagnostic de 55-60 ans et l'incidence augmente avec l'âge puisqu'elle est quadruplée pour les patients de plus de 70 ans (Burns MK et al. 1992 ; Pope E et al. 2010 ; Agar NS et al. 2010 ; Criscione VD et al. 2007 ; Willemze R et al. 2019 ; Hristov AC et al. 2019 ; Bradford PT et al. 2009). La classification des LTCP selon la classification OMS-EORTC révisée de 2018 est présentée dans le Tableau 1.

Classification des Lymphomes T cutanés primitifs selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) 2018		
Lymphomes T cutanés (LTCP)	Fréquence (%)	Survie à 5 ans (%)
Mycosis Fongoïde (MF)	39	88
MF, variants et sous-types :		
MF folliculotrope	5	75
Lymphome pagétoïde	<1	100
Lymphome chalazadermique	<1	100
SS	2	36
Leucémie/Lymphome T de l'adulte	<1	
Lymphoproliférations CD30+ :		
Lymphome cutané à grandes cellules anaplasiques (C-ALCL)	8	95
Papulose lymphomatoïde (LyP)	12	99
Lymphome sous-cutané à type panniculite	1	87
Lymphome T cutané à cellules NK de type nasal	<1	16
Infection active et chronique EBV	<1	
Lymphome T cutané périphérique, sous-types rares		
Lymphome T cutané à cellules $\gamma\delta$ +	<1	11
Lymphome T épidermotrope agressif CD8+ (entité provisoire)	<1	31
Lymphome T pléiomorphe à petites et moyennes cellules CD4+ (entité provisoire)	6	100
Lymphome T cutané de type acral à cellules CD8+	<1	100
Lymphome cutané périphérique (sans autre indication)	2	15

Tableau 1 : Classification des Lymphomes T Cutanés primitifs selon la classification OMS-EORTC 2018 (Beylot-Barry M et al. 2010 ; Willemze R et al. 2019)

Selon les LTCP, l'accumulation clonale de LT est retrouvée soit au niveau du derme et de l'épiderme (Figure 13), on parle alors de LTCP épidermotropes.



A. Mycosis fongöides

B. Syndrome de Sézary

C. Lymphome cutané primitif à grandes cellules T CD30+

Figure 13 : Coupe de LTCP épidermotropes (MF et SS) et non épidermotropes (Lymphome cutané primitif à grandes cellules T CD30+)

A. Infiltration de cellules T atypiques dans l'épiderme (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) ; grossissement d'origine, $\times 200$). B. Infiltrat en bande de cellules lymphoïdes atypiques dans le derme superficiel et l'épiderme (coloration HE ; grossissement d'origine $\times 40$). C. Infiltrat dermique diffus de grandes cellules atypiques mélangées à de petits lymphocytes (coloration HE ; grossissement d'origine, $\times 300$) (Willemze R et al. 2005. ; Willemze R et al. 2019)

Les lymphomes T non épidermotropes, constituent un groupe varié dans lequel on peut retrouver le lymphome cutané primitif à grandes cellules T CD30+. Il représente 25% des LTCP et est le deuxième plus fréquent après le MF (Willemze et al. 2019). Ce type de lymphome comprend le lymphome anaplasique à grande cellules primitif cutané et les papuloses lymphomatoïdes (Beylot-Barry M et al. 2010 ; Willemze R et al. 2019). Les patients atteints ont un pronostic très favorable et un âge moyen au diagnostic qui varie de 49 à 60 ans avec un sexe ratio homme/femme de 1,3-3 :1 (Bekkenk M. et al 2000 ; Di Raimondo C et al. 2020).

Les formes épidermotropes représentent plus de la moitié des LCP et la grande majorité des LTCP. Il existe différentes formes avec des caractéristiques cliniques, histologiques, immuno-histologiques et moléculaires très hétérogènes. Néanmoins, dans la majorité des cas, on retrouve essentiellement : le Mycosis Fongöide (MF) et le Syndrome de Sézary (SS). Le MF représente 60% des LTCP et a une incidence annuelle de 1/350.000 avec un ratio de 2 hommes pour une femme. Le MF est caractérisé par une évolution indolente et atteint plus particulièrement les adultes au-delà de 50 ans avec un

âge médian au diagnostic de 55-60 ans (Grop JJ. 2005 ; Criscione VD et al. 2007 ; Bradford PT et al. 2009 ; Willemze et al. 2019 ; Hristov AC et al. 2019). A contrario, le SS est plus agressif et plus rare. Il représente 2% des LTCP selon les données incluses dans les registres néerlandais et autrichiens des lymphomes cutanés entre 2002 et 2017 (Willemze et al. 2019). En France, le SS, entre 2005-2019, représente 5,9 %-7,5 % des LTCP soit environ 30 nouveaux cas par an selon le registre Français des lymphomes cutanés (GFLEC) (Dobos G et al. 2021). Les patients atteints de SS sont principalement des hommes de plus de 60 ans qui ont une survie moyenne de 36 mois. En effet, la survie à 5 ans est de 24 à 40% due à l'agressivité de la maladie et l'absence de traitements curatifs (Fink-Puches R et al. 2002 ; Willemze et al. 2019 ; Hristov AC et al. 2019).

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes focalisés sur des stades avancés de LTCP épidermotropes tels que le MF-transformé (MF-T) et le SS (Larocca et al. 2019).

2) Classification TNMB

Contrairement au grade qui détermine la vitesse d'évolution d'une pathologie, indolente ou agressive, le stade est lui utilisé pour déterminer le degré d'extension corporelle. De manière simplifiée, le stade I correspond à la présence d'une tumeur unique de petite taille, le stade II à celle d'une tumeur plus volumineuse mais localisée, le stade III correspond à un envahissement des ganglions lymphatiques ou autres tissus et enfin le stade IV à la présence de métastases dans d'autres organes. Pour les LNH extra-ganglionnaires, et plus particulièrement le MF et le SS, la classification TNMB est utilisée. Le stade de la maladie est déterminé selon le type et la surface des lésions cutanées (T), la présence ou non d'une adénopathie périphérique, c'est-à-dire d'une atteinte ganglionnaire (N) et/ou d'une atteinte extra-cutanée (M) et/ou sanguine (B) (Tableau 2). Ce stade permet d'évaluer le risque de progression de la maladie ainsi que la stratégie thérapeutique à adopter. En effet, le pronostic dépend du stade de la maladie, des possibilités thérapeutiques et également des facteurs de comorbidités (Olsen EA et al. 2011).

Dans le cas du SS ou du MF, d'autres analyses diagnostiques sont effectuées afin de caractériser les cellules T tumorales cutanées et sanguines notamment par la détermination de leur clonalité par PCR et leur caractérisation par immunophénotypage que je développerai plus tard (Olsen E et al. 2007).

Classification TNMB révisée et simplifiée du MF et du SS par l'ISCL/EORTC (d'après Olsen et al.)	
Peau (T)	
T1	Plaques infiltrées ou non (« patches ») < 10% surface corporelle <i>T1a : Patches seulement</i> <i>T1b : Plaques ± plaques</i>
T2	Plaques infiltrées ou non (« patches ») ≥ 10% surface corporelle <i>T2a : Patches seulement</i> <i>T2b : Plaques ± plaques</i>
T3	Tumeur(s) unique ou multiples (≥1cm diamètre)
T4	Erythrodermie ≥ 80% de la surface corporelle
Ganglions (N)	
N0	Absence d'adénopathie clinique (ganglion anormal)
N1	Adénopathie périphérique clinique – Histologie : ne présente pas de lymphocyte atypiques dans la biopsie <i>N1a : Sans clone dominant</i> <i>N1b : Avec clone dominant</i>
N2	Adénopathie périphérique clinique – Histologie : infiltration par cellules de MF mais architecture globale du ganglion préservée <i>N2a : Sans clone dominant</i> <i>N2b : Avec clone dominant</i>
N3	Adénopathie périphérique clinique – Histologie : modification de l'architecture du ganglion présentant des lymphocytes atypiques, sans ou avec clone dominant
Nx	Adénopathie périphérique clinique mais sans confirmation histologique
Atteintes viscérales (M)	
M0	Absence d'atteinte viscérale
M1	Atteinte viscérale (preuve histologique et organe précisé)
Atteinte sanguine (B)	
B0	Absence atteinte sanguine spécifique ≤ 5% de cellules atypiques dans le sang (cellules de Sézary) <i>B0a : Sans clone dominant</i> <i>B0b : Avec clone dominant</i>
B1	Atteinte sanguine modérée > 5% de cellules atypiques dans le sang (cellules de Sézary) <i>B1a : Sans clone dominant</i> <i>B1b : Avec clone dominant</i>
B2	Atteinte sanguine importante > 1000 cellules de Sézary/mL et clone dominant

Tableau 2 : Classification TNMB révisée et simplifiée du MF et du SS par l'ISCL (International Society For Cutaneous Lymphomas) et l'EORTC (d'après Olsen E et al. 2007 ; Bagot M. 2013)

B) Caractéristiques cliniques

1) Mycosis Fongoïde (MF)

Le MF a été décrit pour la première fois dès 1806 par Jean-Louis Alibert. Ce LTCP de bas grade de malignité est caractérisé par une croissance chronique lente sur plusieurs années. Il est apparenté à une maladie chronique avec un pronostic vital non engagé (Willemze et al. 2019 ; Hristov AC et al. 2019). Il existe trois stades cliniques dans le MF : le stade de plaques non infiltrées ou « patches » ; le stade de plaque infiltrées et le stade tumoral (Figure 14) (Larocca et al. 2019).

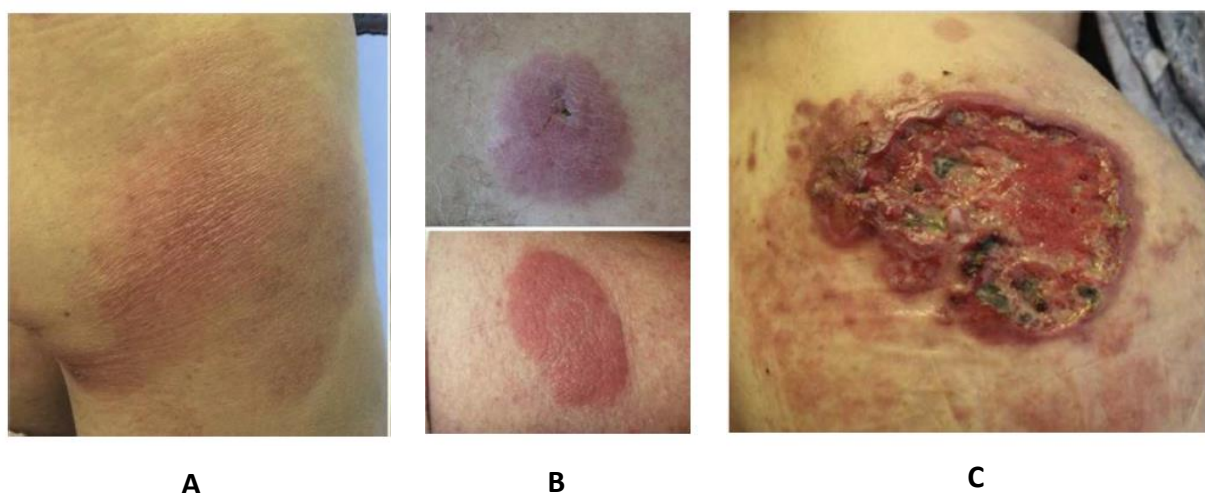


Figure 14 : Les trois stades cliniques du MF.

A. MF au stade de plaques non infiltrées. B. MF au stade de plaques infiltrées. C. MF au stade tumoral (D'après Larocca et al. 2019)

Dans les stades initiaux, stade IA à IIA (Tableau 3), des lésions cutanées érythémateuses, non infiltrées, sous la forme de plaques sont présentes. Dans certains cas, le MF peut être précédé de lésions chroniques telles que le parapsoriasis qui peut être considéré comme précurseur de MF (Bagot M. 2013).

Un épaissement progressif des lésions peut aboutir à des plaques plus ou moins infiltrées. Elles sont caractérisées par la présence d'une accumulation clonale de LT CD4+ à tropisme cutané (Grange F. 2009). Au fur et à mesure des années, les plaques s'épaississent et deviennent plus infiltrées ou tumorales (Willemze et al. 2019).

Stadification révisée des lymphomes T cutanés de type MF/SS par l'ISCL/EORTC (d'après Olsen et al. 2007) et correspondance avec le pronostic (Agar et al.)					
	T	N	M	B	Survie à 5 ans (%)
IA	1	0	0	0-1	98
IB	2	0	0	0-1	89
IIA	1-2	1-2	0	0-1	89
IIB	3	0-2	0	0-1	56
IIIA	4	0-2	0	0	54
IIIB	4	0-2	0	1	48
IVA1	1-4	0-2	0	2	41
IVA2	1-4	3	0	0-2	23
IVB	1-4	0-3	1	0-2	18

Tableau 3 : Stadification des lymphomes T cutanés de type MF/SS par l'ISCL/EORTC (d'après Olsen E et al. 2007) et correspondance avec le pronostic (d'après Agar NS et al. 2010)

2) Le Syndrome de Sézary (SS)

Le SS a été décrit pour la première fois en 1938 par Albert Sézary et Yves Bouvrain comme étant une érythrodermie associée à une adénopathie superficielle avec la présence de cellules « monstrueuses » dans le sang (Figure 15) (Shakeri A. 2018). Taswell et Winkelmann apporte des précisions sur les caractéristiques de ces cellules et notamment l'aspect de leur noyau cérébriforme (Taswell HF et al. 1961). En 1973, il est prouvé que les cellules de Sézary sont des LT par Brouet (Brouet JC et al. 1973).



Figure 15 : Erythrodermie d'un syndrome de Sézary (Bagot M. 2013)

Le SS est une forme agressive systémique de LTCP caractérisée par la présence d'une érythrodermie chronique associée à un prurit (Willemze et al. 2019). C'est-à-dire une lésion dermatologique caractérisée par une rougeur congestive de la peau qui s'efface à l'appui. Elle occupe plus de 90% de la surface corporelle. Néanmoins, cette érythrodermie seule ne suffit pas pour confirmer le diagnostic de SS. En effet, elle peut être associée à d'autres pathologies telles que les dermatoses non lymphomateuses qui sont bénignes (Larocca et al. 2019).

L'érythrodermie est souvent associée à deux autres éléments. Le premier est l'adénopathie superficielle qui est caractérisée par une hypertrophie des ganglions lymphatiques. Le deuxième est la présence dans le sang de cellules atypiques, les cellules de Sézary, qui sont des LT volumineux de phénotype CD4+ dont le noyau, aux contours sinueux et cérébriformes, est très caractéristique (Figure 16). En effet, le SS est la forme leucémique des LTCP épidermotropes qui est caractérisé par une infiltration (accumulation) clonale de cellules T néoplasiques, dites de Sézary. Dans les stades plus avancés, une dissémination peut avoir lieu dans différents organes (Bagot M. 2013).

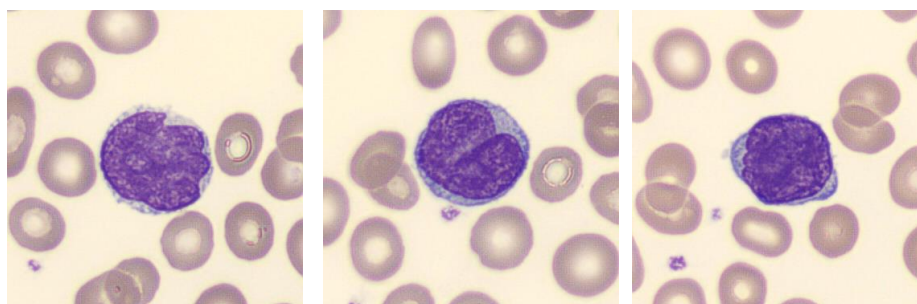


Figure 16 : Cellule de Sézary

Clichés transmis par Dr. Jean-Philippe VIAL (Service d'hématologie biologique, CHU de Bordeaux)

C) Diagnostic

Afin de compléter le diagnostic clinique, un diagnostic histologique peut être réalisé à partir d'une biopsie cutanée fixée au formol puis incluses en paraffine. Ce diagnostic repose d'abord sur une analyse morphologique qui permet de déterminer l'architecture et l'aspect cytologique de l'infiltrat lymphocytaire suite à une coloration à l'Hématoxyline Eosine Safran (HES). La plupart du temps, le phénomène d'épidermotropisme est observé suite à la migration de lymphocytes atypiques dans l'épiderme et la formation d'infiltrats (Wilcox RA. 2014 ; Willemze R et al. 2005 ; Klemke CD et al. 2015 ; Delfau-Larue MH et al. 2000).

Le diagnostic du MF peut être compliqué dans les stades précoces. En effet, les lésions érythémateuses présentes sont peu spécifiques et peuvent être confondues avec des maladies inflammatoires telles que les dermatoses inflammatoires. L'infiltrat MF contient des lymphocytes de type Th CD3+CD4+CD5+CD7-CD8- de nature atypique (Bagot M. 2013). Des marqueurs cellulaires peuvent donc être recherchés en Immuno-Histo-Chimie (IHC) (Figure 17). Comme évoqué précédemment, ces aspects peuvent être absents dans les stades initiaux du MF.

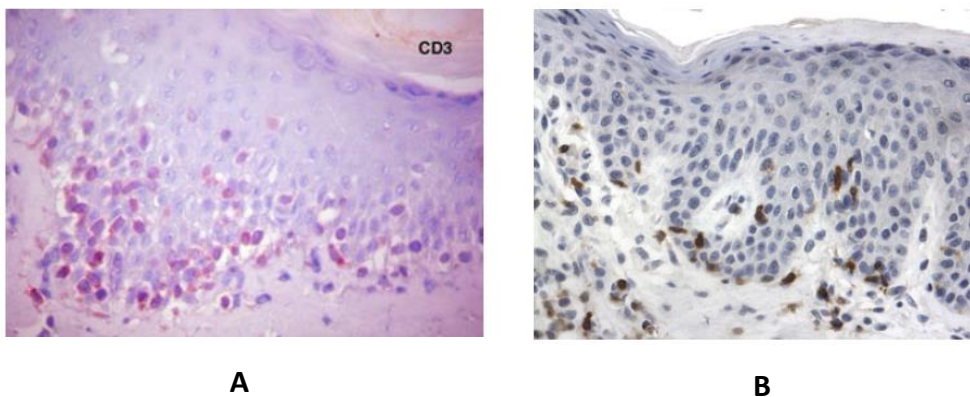


Figure 17 : Immunohistochimie anti-CD3.

A. Lymphocytes atypiques épidermotropes CD3+ d'une coupe de MF. B. Lymphocytes T CD3+ dans le derme superficiel et l'épiderme d'une coupe de SS. (Bagot M. 2013)

La caractérisation de l'infiltrat lymphoïde peut également se faire sur les cellules sanguines circulantes périphériques. Dans le cas du MF, l'étude sur les cellules périphériques ne montre pas forcément la présence de cellules circulantes, dans les stades précoces, mais elle peut permettre de mettre en évidence un rapport CD4+/CD8+ normal et sur les LT CD4+ une diminution de l'expression CD95/Fas qui est inférieur à 30% dans le MF (Dereure O et al. 2000). En revanche pour le SS, il y a une évaluation de la présence de cellules de Sézary circulantes et une estimation en termes de valeur absolue.

L'ISCL et l'EORTC ont établis des critères pour diagnostiquer le SS :

- ✓ Un nombre absolu de cellules de Sézary \geq à 1000 cellules/mm³ ou plus de 10% de cellules de Sézary (Willemze et al. 2019)
- ✓ **Ou** une augmentation des lymphocytes CD3+ ou CD4+ avec un ratio LT CD4/CD8 supérieur ou égal à 10 contre inférieur à 5% en condition normale
- ✓ **Avec** un clone lymphocytaire T majoritaire sanguin circulant mise en évidence *via* un diagnostic moléculaire.

Le diagnostic moléculaire par PCR, fait sur une biopsie cutanée ou sur les cellules du sang périphérique permettra de déterminer la présence d'une population de LT exprimant le même TCR dans la lésion cutanée et dans le sang périphérique. En effet, l'analyse de clonalité permet de déterminer si toutes les cellules portent le même réarrangement du gène γ (V, D, J) du TCR. La présence d'un infiltrat clonal avec le même réarrangement génique permet de renforcer la nature tumorale des cellules qui prolifèrent et qui dérivent d'une seule et même cellule.

Contrairement aux stades précoces de MF où la détermination de la clonalité n'est pas forcément à considérer (Kirsch IR et al. 2015). La preuve du diagnostic SS est d'autant plus forte, si le clone majoritaire est identique dans le sang et la peau (Scarlsbrick JJ et al. 2018 ; van Dongen et al. 2003). Néanmoins, dans certaines conditions, il peut y avoir des profils poly-clonaux. La recherche de cette clonalité dans le sang peut également se faire en cytométrie en flux grâce à la détermination du variant du TCRV β dont la variabilité est générée suite au réarrangement des gène V β , D β et J β (cf partie I.A.2.).

De plus, des examens biologiques et biochimiques (NFS, plaquettes, ionogramme sanguin pour évaluer le déséquilibre hydroélectrique et le retentissement rénal, LDH...) sont également réalisés (Beylot-Barry M et al. 2010). Un diagnostic différentiel peut également avoir lieu, dans l'intérêt d'écarter les érythrodermies liées à d'autres pathologies (Mistry N et al. 2015 ; Nagler AR et al. 2012) ou bien les dermatoses non lymphomateuses telles que les dermatites atopiques érythrodermiques, le psoriasis érythrodermique, les allergies systémiques, etc. (Larocca et al. 2019 ; Saulite I et al. 2016). Mais également dans l'intérêt de ne pas confondre le SS avec les pathologies dans lesquelles des cellules circulantes sont aussi retrouvées telles que les dermatoses chroniques, la dermatite atopique, le psoriasis, le lupus érythémateux discoïde, etc. (Duncan SC et al. 1978).

D) Evolution

Un MF peut évoluer en Mycosis Fongoïdes transformé (MF-T) dans les stades avancés de la maladie. Le MF-T est une forme agressive de la maladie associée à une transformation des LT en grandes cellules. La transformation de MF en MF-T induit une réduction de la survie dont la médiane de survie est de 1 à 2 ans (Vergier B et al. 2000 ; Cerroni L et al. 1992). Cette transformation est caractérisée par une perte de l'épidermotropisme et la présence de plus de 25% de grandes cellules dont la taille est 4 fois plus grande qu'un lymphocyte normal (Cerroni L et al. 1992). L'expression de l'antigène d'activation CD30 est présente dans 50% des MF-T, contrairement au MF classique qui exprime rarement le CD30 (Wood GS et al. 1993). Le mécanisme moléculaire à l'origine de la transformation du MF en MF-T est inconnu, malgré des études des réarrangements des gènes du TCR qui montrent que les cellules de MF-T proviennent du clone tumoral à l'origine du MF (Wood GS et al. 1993).

Dans les stades avancés, bien que le SS et le MF soient classés comme des entités distinctes, dans certains cas de MF, les lésions cutanées peuvent devenir confluentes et une érythrodermie peut se développer avec ou sans atteinte sanguine. La présence d'une atteinte sanguine signifie une évolution en SS tandis que l'absence de ce type d'atteinte conduit au diagnostic d'un MF érythrodermique (MF-E) (Kim EJ et al. 2005 ; Kamijo H et al. 2019). Le patient peut être diagnostiqué comme étant atteint d'un SS d'emblée mais le SS peut être précédé d'un MF et/ou MF-E et/ou MF-T qui évoluent. Dans de rares cas, le SS peut également évoluer en une forme transformée, SS-T, avec l'apparition de très grandes cellules (Diamandidou E et al. 1998).

Dans ces cas, on observe une altération du pronostic et de la qualité de vie du patient et les traitements deviennent plus contraignants et moins efficaces (Willemze et al. 2019 ; Agar NS et al. 2010). Le pronostic va dépendre de l'âge, du stade, de la dissémination extra-cutanée et du bilan clinique. Le bilan clinique et paraclinique va permettre de déterminer le stade TNMB et orienter le médecin pour le traitement à administrer. Les précisions sur le traitement sont apportées dans la partie suivante II.E.

En effet, les patients atteints de MF sous la forme de plaques infiltrées ou non ont une espérance de vie similaire à la population générale de même âge et sexe. En revanche, la présence d'une atteinte extra-cutanée ganglionnaire ou viscérale aggrave le pronostic (Hwang ST et al. 2008 ; Wood et al. 2003). Concernant le SS, le pronostic est, par exemple, moins favorable dans les stades avancés s'il y a une atteinte ganglionnaire (N1 à N3) et si l'atteinte sanguine est importante (B1 à B2) (Vergier B et al. 2000).

D'autres facteurs sont également de mauvais pronostic, on retrouve l'élévation du taux de LDH, la modification des taux de lymphocytes circulants et la présence d'un clone dominant dans la peau qui est identique dans le sang (Evans KG et al. 2011 ; Scraisbrick JJ et al. 2015 ; Agar NS et al. 2010).

E) Traitements actuels pour les lymphomes T cutanés primitifs (LTCP)

Le traitement administré au patient dépend du stade de la maladie, de l'âge du patient et la réaction au traitement ainsi que son efficacité. Il existe différents traitements et des recommandations pour leur prise en charge ont été élaborées par un consensus d'experts du GFLEC (Beylot-Barry M et al. 2010) mais également par l'EORTC, l'ISCL et la British Association of Dermatologists (Wilcox RA. 2017 ; Prince HM et al. 2018 ; Trautinger F et al. 2017 ; Willemze R et al. 2009 ; Olsen EA et al. 2011).

Il existe divers traitements dont je fais un récapitulatif non exhaustif dans le Tableau 4 suivant.

Des traitements locaux	<ul style="list-style-type: none">✓ Corticoïdes topiques<ul style="list-style-type: none">○ Ils permettent l'induction de l'apoptose et jouent sur l'adhésion des lymphocytes à l'endothélium (Pitzalis C et al. 2002).✓ Rétinoïdes topiques<ul style="list-style-type: none">○ Le bexarotène, par exemple, va induire l'apoptose des cellules tumorales (Richardson SK et al. 2007).✓ Photothérapie UV : PUVAthérapie<ul style="list-style-type: none">○ L'ingestion de 8-méthoxypsoralène puis l'irradiation par les UV va induire l'apoptose des cellules tumorales, des dommages ADN et l'arrêt de la production de cytokines par les kératinocytes et la réduction des cellules de Langerhans (Arulogun S et al. 2008).✓ Radiothérapie locale✓ Electronthérapie corporelle totale
-------------------------------	---

Des traitements systémiques	<ul style="list-style-type: none"> ✓ La photochimiothérapie extracorporelle (PCEC) <ul style="list-style-type: none"> ○ L'extraction des cellules mononuclées périphériques puis l'ajout de 8-méthoxypsoralène et l'irradiation par les UV de ces cellules qui sont réintroduites chez le patient va activer la réponse immunitaire systémique anti-tumorale (Arulogun S et al. 2008). ✓ Interféron alpha (IFNα) <ul style="list-style-type: none"> ○ Il permet d'augmenter la réponse immunitaire Th1 contre les lymphocytes tumoraux (Dugas-Breit S et al. 2014). ✓ Les rétinoïdes <ul style="list-style-type: none"> ○ Ils interagissent spécifiquement avec le récepteur RXR et induisent l'apoptose des cellules de Sézary de la peau (Richardson SK et al. 2007). ✓ Les inhibiteurs des histones déacétylases (iHDAC) : Vorinostat, Romidepsin <ul style="list-style-type: none"> ○ Dans les cellules cancéreuses, il existe en général une surexpression et un recrutement des HDAC (Caudron A et al. 2012). Les iHDAC, comme le Vorinostat, vont entraîner l'arrêt du cycle cellulaire et induire l'apoptose dans les cellules de LTCP. (Zhang C et al. 2005 ; Olsen E et al. 2007). ✓ Chimiothérapie <ul style="list-style-type: none"> ○ Antifolique (ex. méthotrexate qui permet l'inhibition des mitoses et de la synthèse d'ADN (Zackheim HS et al. 2003 ; Dugas-Breit S et al. 2014). ○ Gemcitabine (qui permet l'inhibition de la synthèse d'ADN (Hui YF et al. 1997 ; Jidar K et al. 2009)). ○ Doxorubicine liposomale (qui permet l'inhibition des topoisomérases et induit des lésions de l'ADN (Dugas-Breit S et al. 2014)).
Des essais cliniques avec des thérapies ciblées utilisant des anticorps monoclonaux	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alemtuzumab (anti-CD52) <ul style="list-style-type: none"> ○ C'est un anticorps monoclonal (IgG1) humanisé dirigé contre le CD52 exprimé par 95% des lymphocytes T, B, NK et des monocytes. Il a une efficacité relative sur les LT sanguins mais pas sur des lésions de la peau comme rapporté sur certains patients. Il entraîne une toxicité hématologique dans 23 à 79%. (Bernengo MG et al. 2007 ; Clark RA et al. 2012). Malgré cette efficacité relative, l'indication de l'administration pour le traitement des LTCP a été retirée par la société productrice mais est approuvée pour le traitement sclérose en plaque uniquement (Ramelyte E et al. 2019). ✓ Mogamulizumab (anti-CCR4) <ul style="list-style-type: none"> ○ En se basant sur les caractérisations immunophénotypiques, un anticorps anti-CCR4 (Mogamulizumab) a été développé et est actuellement en phase d'étude clinique. C'est un anticorps monoclonal dirigé contre le chimiorécepteur CCR4 exprimé par les Th2, les Tregs et certains LT tumoraux. Cet anticorps est humanisé et défucosylé afin de permettre l'induction d'une réaction ADCC sur les LT CCR4+ (Yamamoto K et al. 2010 ; Ishida T et al. 2004). Après avoir été testé en phase clinique II et III, il est <i>Food and Drug Administration</i> (FDA) approuvé depuis 2018 pour le traitement des MF/SS des patients adultes récidivants ou réfractaires (Chang DK et al. 2012 ; Kim YH et al. 2018, Ramelyte E et al. 2019).

Tableau 4 : Tableau récapitulatif non exhaustif des principaux traitements actuels pour les LTCP.

Après l'établissement du diagnostic et du stade selon la classification actuelle, le choix de la stratégie thérapeutique de 1^{ère} ou 2^{ème} ligne va se faire en fonction du stade TNMB, de la stadification, des traitements déjà effectués (Olsen E et al. 2007).

Aux stade précoces, stade Ia à IIa (T1-2/N0-1/M0/B0) (Tableau 2), la thérapie conseillée sont les corticoïdes locaux qui permettent de diminuer l'inflammation. En 2^{ème} ligne l'administration de traitement systémique est recommandée tels que le méthotrexate à faible dose ou IFN α ou bexarotène.

Aux stades tumoraux, stade IIb (T3/N0-3/M0/B0) (Tableau 2), le traitement de 1^{ère} ligne est systémique (IFN α , Méthotrexate ou Bexarotène) avec une association à un traitement local. En 2^{ème} ligne, le recours à une monochimiothérapie (Doxorubicine liposomale) ou l'administration d'inhibiteurs des histones déacétylases (Vorinostat) est recommandée. La polychimiothérapie est réalisée seulement en dernier recours (Scarlsbrick JJ et al. 2015 ; Trautinger F et al. 2017).

Dans les stades érythrodermiques avec ou sans cellules circulantes, le traitement systémique est toujours proposé et notamment la PCEC surtout s'il y a un envahissement sanguin (Scarlsbrick JJ et al. 2008 ; Knobler R et al. 2009). Elle est proposée seule ou en association avec un traitement systémique. Dans le cas où le traitement est un échec, dans les stades avancés, il y a possibilité d'inclure le patient dans un essai thérapeutique avec des thérapies ciblées utilisant notamment des anticorps monoclonaux.

Malgré la présence de ces nombreux traitements, ils restent pour la plupart non curatifs, à l'exception de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (de Masson A et al. 2014). Ils permettent seulement de réduire les symptômes de la maladie et d'améliorer la qualité de vie des patients d'où la présence d'un protocole avec des traitements successifs seuls ou associés. En effet, seule, la greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques permet d'obtenir une rémission complète dans 58% des cas. Néanmoins, elle n'est possible que chez les patients bons répondeurs et jeunes qui sont dans un stade avancé de la maladie (de Masson A et al. 2014).

Les études se sont donc concentrées sur la caractérisation des cellules de LTCP afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous allons nous intéresser maintenant à ces caractérisations au sein du SS et du MF.

F) Caractéristiques génétiques et phénotypiques

1) Caractéristiques génétiques des cellules

a. Altérations cytogénétiques et génétiques des cellules de Sézary

Comme le montre plusieurs études utilisant des techniques de cytogénétique conventionnelle ou moléculaire et de séquençage haut débit *whole genome sequencing*, il y a une absence d'anomalies cytogénétiques et génétiques spécifiques et récurrentes dans les cellules de Sézary de patients. La diversité des anomalies génétiques en fonction des patients confirme l'hétérogénéité de la maladie (Chevret E et al. 2016 ; Laharanne E et al. 2010 ; Mao X et al. 2011 ; Prochazkova M et al. 2007 ; van Doorn R et al. 2009 ; Vermeer MH et al. 2008).

Seules des mutations récurrentes sont présentes sur des gènes suppresseurs de tumeurs tels que la perte de *TP53* présent sur le chromosome 17p dans 50% des cas de SS et des mutations de *TP53* dans 20-50% des cas (da Silva Almeida AC et al. 2015 ; Choi J et al. 2015 ; Gros A et al. 2017 ; Prasad A et al. 2016). Ce gène suppresseur de tumeur code pour la protéine p53 qui a un rôle important dans l'oncogenèse et le maintien de l'intégrité cellulaire. Cette protéine est mutée dans de nombreux cancers. Une perte chromosomique dans le gène *CDKN2A* est également observée dans 40-50% des cas. Ces deux pertes peuvent permettre un échappement à la mort cellulaire ainsi qu'une augmentation de la prolifération cellulaire (Choi J et al. 2015 ; Iqbal J et al. 2019).

De manière moins récurrentes, et non exhaustive, on trouve des anomalies impliquées dans la survie des cellules de LTCP, telles que la mutation de *FAS*, l'anomalie de gain sur le chromosome 8q et sur lequel se trouve le proto-oncogène *MYC* et les délétions sur le gène suppresseur de tumeurs *PTEN* (Mao X et al. 2002 ; Fischer TC et al. 2004 ; Prochazkova M et al. 2007 ; Lamprecht B et al. 2012 ; da Silva Almeida AC et al. 2015 ; Prasad A et al. 2016 ; Kiel MJ et al. 2015 ; Gros A et al. 2017). La perte de *NFkB2* qui code pour la sous-unité inhibitrice de NFkB est retrouvée dans 10% des cas et elle induirait une activation constitutive de la voie non canonique du NF-κB (Kiel MJ et al. 2015 ; Choi J et al. 2015).

Des mutations sur des gènes impliqués dans polarisation des LT peuvent être également détectées. C'est le cas des anomalies pertes de fonctions du facteur de transcription ZEB1, qui contribue à la polarisation Th2 des cellules T *via* la surexpression de *GATA3*, dans 21 % des cas (Choi J et al. 2015 ; Kiel MJ et al. 2015 ; Mishra A et al. 2016).

Comme vu précédemment, la présence d'un clone majoritaire par la détermination du réarrangement du TCR favorise le diagnostic SS (Scarlsbrick JJ et al. 2018 ; van Dongen et al. 2003). Néanmoins, il peut y avoir des profils bi- et poly-clonaux. Wang L et al. ont montré avec une étude de *RNAseq* un réarrangement du TCRV β mono-, bi- et polyclonal chez 56%, 22% et 22% des patients respectivement, et du TCRV α mono-, bi-, polyclonal chez 66%, 22% et 12% des patients, respectivement. L'analyse de l'expression des récepteurs V β et V α des lymphocytes T a révélé un réarrangement continu des récepteurs après l'expansion d'un clone malin chez un tiers des sujets (Wang L et al. 2015). Des mutations modulant la signalisation du TCR peuvent également être retrouvées. C'est le cas des mutations du gène *PLCG1* qui sont retrouvées dans 9% des SS (Wang L et al. 2015 ; Vaqué JP et al. 2014 ; Prasad A et al. 2016) et la mutation de *CARD11* a également été rapportée dans 6% des cas (da Silva Almeida AC et al. 2015 ; Wang L et al. 2015 ; Kiel MJ et al. 2015 ; Prasad A et al. 2016). *PLCG1*, code pour la protéine phospholipase C γ 1 impliquée dans la signalisation en aval du TCR et *CARD11* code pour une protéine appartenant à la famille des guanylates cyclases impliquée dans la signalisation du TCR également. Des mutations peuvent être observées sur le gène codant *CD28* et parfois une fusion de *CTLA4-CD28* est détectée, elle serait responsable d'une prolifération des cellules malignes (Sekulic A et al. 2015).

D'autres mutations touchent des gènes impliqués dans l'expression des gènes et plus particulièrement la régulation épigénétique. C'est le cas de *DNMT3A* et de la mutation sur le gène *TET2* retrouvée dans certains cas de SS. Ces deux gènes jouent un rôle dans la méthylation de l'ADN (da Silva Almeida AC et al. 2015 ; Choi J et al. 2015).

Dans le cas du SS, les anomalies cytogénétiques et génétiques sont complexes et peuvent être hétérogènes entre les différents patients, mais également les différents sous-clones cellulaires d'un même patient.

b. Profils d'expression génique des cellules de Sézary et de Mycosis Fongoïde

Les techniques de séquençage nouvelle génération ont permis d'étudier les profils d'expression génique des cellules de LTCP en les comparant à ceux des lymphocytes normaux. Ces études ont mis en évidence, dans les cellules de Sézary de patients, l'augmentation d'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire avec notamment l'augmentation de l'expression de *TOX* codant pour la protéine TOX, un facteur de transcription qui induit une diminution de l'expression des protéines inhibitrices du cycle cellulaire (Huang Y et al. 2015 ; Haider A et al. 2016 ; Dulmage BO et al. 2019 ; Litvinov IV et al 2017).

L'augmentation de gènes impliqués dans la signalisation du TCR, des cytokines et des chimiokines, a été rapportée. C'est le cas de *RAC2*, *PRKCQ*, *HRAS* ou bien des récepteurs aux chimiokines comme *CCR4* et *CCR8* ou *IL2RG* qui code pour la chaîne γ du récepteur à l'IL2 (Huang Y et al. 2015 ; Haider A et al. 2016 ; Dulmage BO et al. 2019).

L'expression de certains gènes non-exprimés dans les LT non tumoraux peut également être mise en évidence, on retrouve par exemple *KIR3DL2* (marqueur de cellules NK), *TWIST* et *PLS3* (Michel L et al. 2013 ; Boonk SE et al. 2016).

D'autres études utilisant des méthodes de *RNAseq* et *single cell RNAseq* ont confirmé l'hétérogénéité des cellules de Sézary en montrant des profils transcriptomiques différents entre les patients (intertumorale) mais également au sein d'un même patient (intratumorale) et en fonction du compartiment tissulaire dont proviennent les cellules (Borcherding N et al. 2019 ; Rassek et al., 2020 ; Herrera A et al., 2021). En effet, une étude de *single cell* a montré que les cellules T malignes de la peau présentent une expression plus élevée des gènes liés à l'état d'activation des cellules T et à la progression du cycle cellulaire par rapport aux cellules qui proviennent du sang (Herrera A et al., 2021). Ces données sont confirmées par des données de PCR digitale et de variations de copies de gènes qui ont révélé un indice de prolifération plus élevé dans les cellules de Sézary dérivées de la peau par rapport au sang. Ce phénomène serait expliqué par une activation plus élevée de la voie mTOR dans les cellules de Sézary dérivés de la peau *via* le microenvironnement cutané tumoral (Cristofolletti C et al. 2019).

Les microARN sont des ARN non codants impliqués dans des mécanismes épigénétiques essentiels au processus cellulaires (Phyo ZH et al. 2020). Le profil d'expression des microARN a été étudié dans différentes populations de LTCP. Il a été suggéré qu'une expression accrue de miR-213, miR-486 et miR-21 pourrait promouvoir la résistance apoptotique dans les lignées cellulaires LTCP (Narducci MG et al. 2011). Concernant le MF, plusieurs groupes ont identifié le miR-155 pour son rôle dans cette pathogenèse. Un lien de causalité a été établi par la suite entre la signalisation JAK/STAT et l'expression de miR-155 et son gène hôte BIC (*B cell integration cluster*), ce qui implique que STAT5/BIC/miR-155 pourrait être une cible thérapeutique. L'inhibition du miR-155 par le Cobomarsen (MRG-106), un oligonucléotide inhibiteur de miR-155, induit une diminution de l'expression de multiples voies géniques associées à la survie cellulaire, une diminution de la prolifération cellulaire et une activation de l'apoptose. Les inhibiteurs du miR-155 ont été évalués dans des essais cliniques de phase I (Seto AG et al. 2018 ; Phyo ZH et al. 2020).

2) Immunophénotypage des cellules de Sézary et de Mycosis Fongoïde

Les études récentes de cytométrie en flux et d'immunohistochimie se sont focalisées sur la caractérisation immuno-phénotypique des cellules à l'origine de la maladie (Figure 18) afin de mieux comprendre les LTCP et de déterminer de nouveaux biomarqueurs et nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, il n'existe pas de biomarqueurs spécifiques des cellules tumorales de MF et de SS (Cristofolletti C et al. 2019). Les cellules de Sézary sont des LT CD4+ qui sont caractérisées par la perte ou l'apparition de certains marqueurs lymphocytaires (Roelens M et al. 2017).

Les cellules de Sézary peuvent perdre l'expression de certains marqueurs tels que CD7, CD26, CD52 et du CD95 (Fas) (Olsen E et al. 2007 ; Kelemen K et al. 2008 ; Dereure O et al. 2000). Le CD7 est une glycoprotéine membranaire exprimée sur 85 à 90% des LT sanguins chez l'adulte sain, ainsi que sur les NK et les thymocytes. Elle serait impliquée dans l'initiation d'une cascade de signalisation de l'apoptose des cellules CD7+. Les cellules de Sézary pourraient ainsi échapper à cette mort cellulaire suite à la perte de ce marqueur (Rappl G et al. 2002). Concernant le CD26, c'est est une protéase membranaire présente sur les LT périphériques, les cellules endothéliales et épithéliales qui est impliquée dans la régulation immunitaire et la transduction du signal. Cette peptidase joue un rôle important dans la régulation de la migration des lymphocytes. Des recommandations sont également faites pour mesurer l'envahissement sanguin par les cellules de Sézary grâce à l'estimation des LT CD4+CD7- qui serait supérieur à 40% dans le SS. Ou bien l'estimation des LT CD4+CD26- qui serait supérieur à 30%. (Scarlsbrick JJ et al. 2018).

Les cellules de Sézary expriment également CXCR4, un chimiorécepteur à 7 domaines transmembranaires qui s'associe aux protéines G hétérodimères. L'expression de CXCR4 a été reportée dans 23 cancers épithéliaux, mésenchymateux et hématopoïétiques différents (Balkwill F. 2004 ; Aronovich A et al. 2020 ; Andrique L et al. 2016 ; Passaro D et al. 2015 ; Ishida T et al. 2004 ; Kashyap MK et al. 2016 ; Sison EAR et al. 2015) et semble également être impliqué dans la migration et la survie des cellules cancéreuses. CXCR4 est fortement exprimé dans la peau des patients atteints de SS (Narducci MG et al. 2006).

Les cellules de Sézary surexpriment le CD158k (KIR3DL2) (Bagot M et al. 2001 ; Ortonne N et al. 2006), contrairement aux cellules de MF à un stade précoce (Klemke CD et al. 2008 ; Poszepczynska-Guigne E et al. 2004 ; Bahler DW et al. 2008). Ce marqueur a été identifié comme étant le marqueur le plus

spécifique des cellules de SS. CD158k appartient à la famille des récepteurs KIRs, normalement exprimés par les lymphocytes NK. Il est retrouvé à la surface des cellules de Sézary et il permet notamment de distinguer une érythrodermie inflammatoire d'un SS (Ortonne N et al. 2008 ; Weschler J et al. 2003). Une étude a montré que la valeur absolue du nombre de cellules CD3+CD158k+ était plus sensible que la valeur absolue du nombre de cellules de Sézary détectée pour évaluer le nombre de cellules tumorales sanguines dans le SS (Bouaziz JD et al. 2010 ; Roelens M *et al.* 2017).

Dans un premier temps (Figure 18), il a été suggéré grâce à des études de cytométrie en flux que les cellules de Sézary de patients avaient un phénotype LT_{CM} avec un profil phénotypique CCR7+L-sélectine+CCR4-CLA+/- . Ce phénotype permettrait aux LT de circuler dans le sang afin d'atteindre les ganglions lymphatiques tout en gardant la capacité d'un adressage cutané. Au contraire, les cellules de MF auraient un phénotype de LT_{RM} avec un profil phénotypique CCR7-L-sélectine-CCR4+CLA+ (Campbell JJ et al. 2010 ; Clark RA et al. 2012 ; Hristov AC et al. 2019). Ces deux populations seraient donc différentes phénotypiquement grâce à l'expression d'une combinaison différente de chimiorécepteurs et de molécules d'adhésion exprimées à leur surface leur conférant des propriétés d'adressage distinctes (Willemze R et al. 2019 ; Scarisbrick JJ et al. 2018).

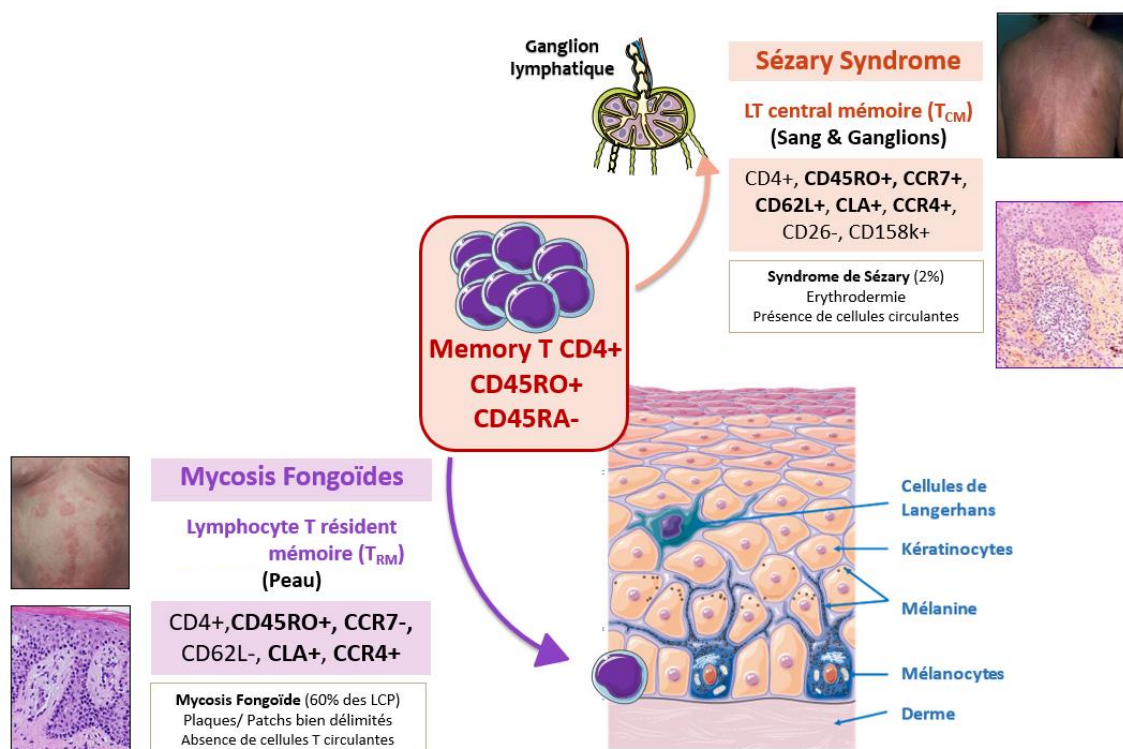


Figure 18 : Aspect pathologique et phénotypique du MF et du SS (d'après Campbell JJ et al. 2010 ; Clark RA et al. 2012 ; Hristov AC et al. 2019 ; Moins-Teisserenc H et al. 2015, Islam SA et al. 2012)

Les mécanismes moléculaires responsables du tropisme cutané des cellules tumorales de LTCP semblent être similaires aux mécanismes utilisés par les LT normaux, en situation inflammatoire. Les études descriptives ont montré que les LT cutanés expriment à leur surface une combinaison de molécules, dont les chimiorécepteurs tels que le CLA, CCR4 et CCR10 qui permettrait un adressage cutané (Campbell JJ et al. 2010 ; Kamarashev et al. 1998). L'expression du chimiorécepteur CCR7 et de la molécule d'adhésion L-sélectine permet un adressage ganglionnaire, ainsi leur perte dans les cellules de MF ayant un profil LT_{RM} induirait une localisation cutanée. A contrario, l'expression de CCR7, L-sélectine et la perte de CCR4 induirait un phénotype de cellules circulantes.

Cependant cette caractérisation a été remise en cause par des études de cytométrie plus récentes qui ont montré que le phénotype des cellules de Sézary est hétérogène entre les patients et au sein même d'un échantillon. En effet, les cellules au sein d'un même échantillon ont des caractéristiques de différentes populations LT_{RM}, LT_{EM}, LT_{CM} ou cellules naïves (Roelens M et al. 2017 ; Horna P et al. 2019, 2020). Dernièrement des études utilisant des techniques plus sophistiquées avec des panels d'anticorps allant jusqu'à 27 marqueurs, ont montré une hétérogénéité inter- et intra-individuelle des cellules de Sézary (Borcherding N et al. 2019 ; Najidh S et al. 2021). La diversité du phénotype des cellules de Sézary peut refléter soit la plasticité ou soit l'hétérogénéité. Les modèles de SS récemment développés dans l'équipe ont permis de confirmer cette hétérogénéité inter-individuelle des patients SS et de mettre en évidence une hétérogénéité intra-individuelle restreinte. Ils ont également permis de mettre en évidence que des sous-clones possédant le même réarrangement du gène du TCR peuvent évoluer indépendamment selon les conditions de culture et/ou après xénogreffes. Cette sélection clonale est donc associée à une plasticité immunophénotypique et à une évolution génomique limitées *in vitro* et *in vivo* (Poglio S et al. 2021).

G) Caractéristiques des cellules tumorales de SS et de MF et de leur microenvironnement

1) Evolution du phénotype des cellules tumorales

Dans les stades de patch du MF, les cellules de LTCP ont un phénotype de LT CD4⁺ Th1 et sont caractérisées par la surexpression d'un activateur de la transcription, *STAT4*, alors que le facteur de transcription *GATA3*, impliqué dans la réponse Th2, est sous-exprimé. Dans les stades plus tardifs, la balance s'inverse avec une augmentation des marqueurs Th2 accompagnée d'un excès de production de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-10). Il y a également une diminution de l'épidermotropisme

dans les biopsies cutanées de formes avancées de MF-E et SS (Figure 19) (Chong BF et al. 2008 ; Kim EJ et al. 2005).

2) Evolution du microenvironnement tumoral

Au cours de l'évolution de la maladie, une accumulation de cellules T CD4+ atypiques est observée. Ce phénomène pourrait notamment être expliqué par la perte de CD26. En effet, en sachant que le Stroma cell-Derived Factor 1 (SDF-1), aussi connu sous le nom de CXCL12, est capable de se lier à CXCR4 et CXCR7 et est impliqué dans la migration des cellules de Sézary. La perte de CD26, une protéase capable de rendre inactif par clivage SDF-1 renforce l'adressage cutané (Spender LC et al. 2016 ; Narducci MG et al. 2006). La signalisation de l'axe CXCR4/SDF-1 joue également un rôle dans l'adhésion des cellules T et l'expression des gènes impliqués dans la régulation de la progression du cycle cellulaire et de l'apoptose (Suzuki Y et al. 2001 ; Kremer KN et al. 2003). Dans le MF, il a été montré que les *cancer-associated-fibroblasts* (CAF) expriment plus fortement le CXCL12 par comparaison aux fibroblastes de sujets sains. Dans ce contexte, l'axe CXCL12/CXCR4 joue un rôle dans l'adressage cutané des cellules tumorales mais également dans l'établissement d'une niche chimioprotectrice pour les cellules qui surexpriment CXCR4 (Aronovich A et al. 2020).

Dans les lésions cutanées au début de la maladie, la présence de LT CD8 sécrétant de l'IFN- γ est détectée. En revanche, dans les stades avancés, l'expansion des cellules tumorales induit une diminution des populations lymphocytaires normales et en particulier des LT CD8+ activés et des lymphocytes NK CD56+ (Lee BN et al. 1999 ; Bouaziz JD et al. 2005), mais également des CD (Wysocka M et al. 2002) dans la peau des patients. Ce phénomène serait dû à la production chronique de cytokines de type Th2 par les cellules tumorales. En effet, l'IL-4 va induire une diminution de la réponse Th1, l'IL-5 va induire une éosinophilie alors que la production d'IL-10 va être responsable de la diminution de la réponse Th1 également mais aussi des CD. Cette production de cytokines Th2 semble être le mécanisme par lequel les cellules tumorales échappent à la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces changements peuvent être à l'origine d'une immunodéficience chez le patient qui sont souvent la cause d'infections opportunistes (Echchakir H et al. 2000) mais également de la baisse de la production de certaines cytokines : IFN- α , IFN- γ et IL-12. La diminution de macrophages et des CD entraîne une diminution de la sécrétion d'IL-12, une cytokine impliquée dans l'activation des cellules T cytotoxiques. L'IL-12 joue également un rôle dans la production d'IL-15 et IL-18 qui eux stimulent la production d'IFN- γ et donc la réponse Th1 (Vowels BR et al. 1992). Il y a donc une diminution de l'apoptose et une accumulation dans la peau des LT atypiques clonaux (Figure 19) (Kim EJ et al. 2005).

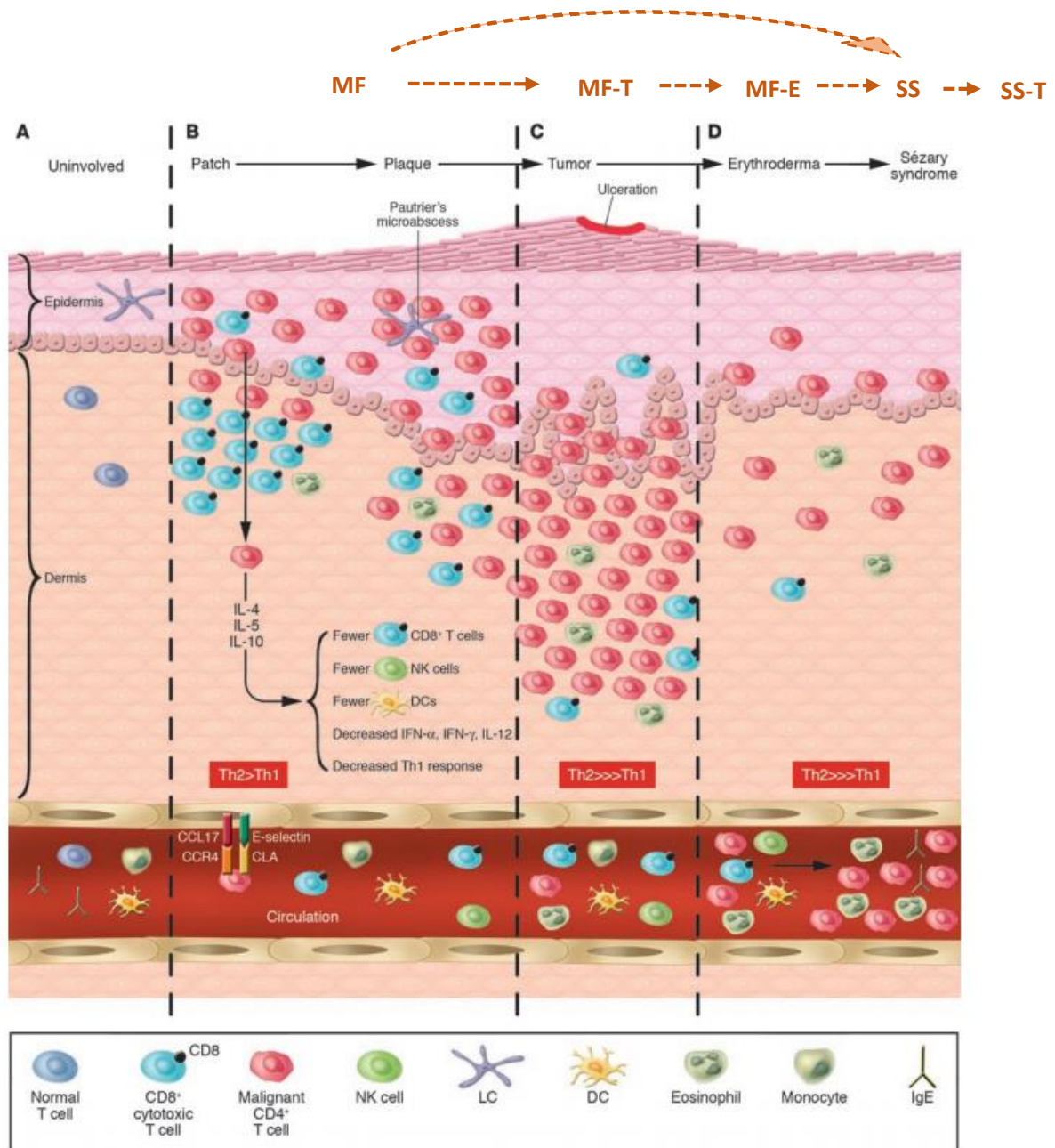


Figure 19 : Etat du microenvironnement cutané au cours de la progression du MF/SS.

(A) Peau normale montrant les cellules résidentes de l'épiderme et l'adressage cutané des cellules T dans le derme et la circulation. (B) MF en patches et plaques : les cellules T CD4⁺ malignes migrent vers l'épiderme et se positionnent autour des cellules de Langerhans. (C) MF en stade de tumeur : la tumeur se situe dans le derme et les tissus sous-cutanés et est constituée de cellules T malignes et avec une diminution de la présence de lymphocytes T CD8⁺ (D) MF en stade érythrodermique et SS : les cellules malignes circulantes sont détectables au niveau sanguin et produisent des cytokines de type Th2 qui affectent le nombre et la fonction des cellules CD8⁺, des cellules NK et des DC (ou DCs) et donc la réponse immunitaire (Kim EJ et al. 2005).

Comme vu précédemment dans la partie sur l'immunité cutanée, on trouve dans le derme des cellules immunitaires mais également des fibroblastes. Ces cellules sont dispersées dans une MEC composée de substance fondamentale et de fibres de collagène principalement de type I puis V, de fibres de réticuline (collagène de type III) et de fibres élastiques. La substance fondamentale est un

gel hydrophile composé de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes (polysaccharides), d'acide hyaluronique et de protéines d'adhérence. Dans le microenvironnement cellulaire cutané non tumoral, les fibroblastes ont également leur importance. Ils synthétisent tous les éléments de la MEC (substances fondamentales et fibres) et certaines enzymes capables de la dégrader, ce sont les métalloprotéases (MMP). Les fibroblastes jouent ainsi un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du tissu conjonctif mais également dans la mobilité des cellules immunitaires dans le tissu lésé et lors de l'inflammation (Driskell RR et al. 2015 ; Thulabandu V et al. 2018 ; Fane M et al. 2020). Ils ont aussi un rôle dans l'homéostasie cellulaire et microenvironnementale par la sécrétion de facteurs solubles (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et autres protéines de signalisation). Dans les tissus jeunes et sains, ces fibroblastes fournissent un sécrétome très restrictif pour les cellules pré-malignes en acquérant un phénotype associé à la sénescence de courte durée avec un profil sécrétoire particulier appelé *senescence-associated secretory phenotype* (SASP) (Coppé JP et al. 2010 ; Campisi J et al. 2014 ; He S et al. 2017). Ce sécrétome est constitué d'environ 75 facteurs solubles définis (IL-6, IL-8, IL-10...) qui permettent le recrutement de cellules immunitaires afin de former des infiltrats immunitaires pour éliminer les cellules apoptotiques, sénescents et malignes. Les fibroblastes SASP sont éliminés rapidement après avoir alerté le système immunitaire et aider la réponse immunitaire.

Les patients atteints de LTCP sont en général âgés, le vieillissement du microenvironnement cutané pourrait donc avoir un rôle dans la progression tumorale. En effet, lors du vieillissement, il y a une altération biophysique de la MEC, des changements dans les facteurs sécrétés et dans la composition des cellules immunitaires. Les changements de composition de la MEC entraînent une perte de l'intégrité et induisent une augmentation de la rigidité du tissu ainsi qu'une modification des propriétés mécaniques de la MEC. En effet, il y a une diminution de la densité de collagène, de la surface et de l'épaisseur des fibres. Plus précisément, la diminution, liée à l'âge, de la sécrétion par les fibroblastes de protéine intervenant dans le remodelage de la MEC : *ECM remodelling protein hyaluronan* et *proteoglycan link protein 1* (HAPLN1) entraîne un relâchement et la dégradation du réseau d'acide hyaluronique et donc une diminution de la réticulation et de la densité du collagène (Diridollou S et al. 2001 ; Fisher GJ et al. 2002 ; Lee HO et al. 2011 ; Marcos-Garcés V et al. 2014). La diminution d'acide hyaluronique est associée à une augmentation de la tumorigénèse dans les tissus riches en acide hyaluronique comme la peau. Ces phénomènes favorisent l'invasion et la progression des cellules tumorales (Karjalainen JM et al. 2000).

Lors du vieillissement, le taux de renouvellement des fibroblastes sains non SASP diminue considérablement. Le microenvironnement tissulaire vieillit, les fibroblastes SASP s'accumulent et les

infiltrats immunitaires sont plus immunosuppresseurs en comparaison à un microenvironnement plus jeune. Les fibroblastes SASP sécrètent des facteurs qui favorisent l'accumulation de cellules immunosuppressives comme les *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC), les cellules T régulatrices et les macrophages M2 immunosuppresseurs. La sécrétion par les fibroblastes SASP de MMP et les LT effecteurs, NK, macrophages et CD qui ont une activité cytotoxique diminuée participe également à la formation d'un microenvironnement chronique qui deviendrait plus permissif pour l'invasion et la progression des cellules tumorales. Tous ces facteurs augmentent le risque de tumorigenèse (Fane M et al. 2020).

Afin de mieux comprendre ces pathologies notre équipe à développer des modèles de LTCP. Mais avant cela, je ferai un rappel des modèles d'étude des LTCP.

H) Modèles d'étude *in vitro* et *in vivo*

1) Les modèles utilisant des cellules murines ou murins transgéniques

Afin d'étudier les LTCP, des modèles murins existent tels que l'injection des cellules de lymphome T murin MBL-2 dans la peau de l'oreille de souris immunodéficientes SCID/Beige ou de souris immunocompétentes C57BL/6 mais avec une inoculation peptidique inflammatoire dans les oreilles. Ce type de modèle induit le développement d'un lymphome localement *in vivo* (Wu X et al. 2011).

Plus récemment, un modèle murin de souris transgéniques IL-15 a été également développé. Ce modèle induisant la surexpression de l'IL-15 *in vivo* a permis de reproduire certaines caractéristiques de LTCP telles que les plaques érythémateuses squameuses, les ulcérations, le prurit sévère dans les 4 à 6 semaines qui suivent la naissance. Ce modèle a pu également montrer que l'utilisation d'inhibiteurs des histones déacétylases (iHDAC) diminue cette progression (Mishra A et al. 2016)

2) Les modèles utilisant des cellules humaines

Concernant les modèles humains, peu de lignées SS sont disponibles. On retrouve 3 lignées principales : les lignées Sez/SZ4, HUT78/H9 et SeAX (Abrams JT et al. 1991 ; Mann DL et al. 1989 ; Kaltoft K et al. 1987). En revanche, il n'y a aucune lignée provenant de stade précoce MF, une seule lignée de MF-T (My-La) est disponible (Kaltoft K et al. 1992). Comme vu précédemment, de nombreuses études ont montré une hétérogénéité des cellules de LTCP, ainsi ces lignées ne représentent pas l'hétérogénéité interindividuelle et les différents stades de la maladie.

De plus, l'utilisation de modèles de xénogreffes sur des souris immunodéficientes n'ont pas permis d'obtenir à la fois des atteintes cutanées et à la fois des atteintes sanguines telles qu'observées dans le SS. On trouve par exemple l'injection de cellules de la lignée My-La en sous-cutanée dans des souris Nude (Krejsgaard T et al. 2010) ou l'injection de cellules HUT78 en sous cutanée dans des souris CB-17 SCID beige (Doebbeling U, 2010) qui a permis l'obtention d'une atteinte cutanée mais avec un faible taux de greffe. Le modèle de xénogreffe utilisant l'injection de cellules SeAX et HUT78 en intra-hépatique sur des nouveau-nés de souris RAG2(-/-) γ c(-/-) développe une atteinte sanguine et une dissémination dans les ganglions lymphatiques, le foie, la rate et le thymus. Malgré cela, il possède des inconvénients tels que le jeune âge des souris injectées ou l'absence de cellules au niveau cutané avec les cellules SeAx ou encore la mort des souris induites en raison de la croissance massive de tumeurs internes avec les cellules HUT78 (van der Fits L et al. 2012)

Notre équipe a par la suite développé un premier modèle plus robuste et reproductible d'injection intrahépatique dans des souris immunodéficientes NOD.Cg-Prkdc(scid)Il2rg(tm1Wjll)/SzJ (NSG) adultes de plusieurs lignées de LTCP permettant à la fois une greffe hépatique pour 80% des lignées cellulaires et une dissémination dans plusieurs organes tels que la rate et les reins, mais sans infiltration cutanée. Ce modèle a permis de générer des greffes avec des lignées de LTCP provenant de stades agressifs : My-La, HUT78, HH, MAC2A et MAC2B et indolents avec FE-PD et MAC1 (Andrique L et al. 2016).

Concernant les modèles de *Patient-Derived Xenograft* (PDX), seulement deux équipes ont obtenu des greffes avec des cellules de SS avec une migration dans la peau et un épidermotropisme après une injection intraveineuse des cellules de Sézary (Townsend EC et al. 2016 ; Wu CH et al. 2021).

Plus récemment, notre équipe a mis en place des méthodes de cultures *in vitro* standard avec les cellules de LTCP dérivant de patients qui impliquent l'ajout de différentes cytokines connues pour activer les LT telles que l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7 et l'IL-15, un agent mitogène non spécifique tel que la *phytohemagglutinin* (PHA) et avec ou sans cellules stromales. La mise au point de ces 6 conditions de culture *in vitro* et le développement de modèle PDX de greffe primaire (par injection intra-fémorale) et secondaire (par voie percutanée) dans des souris immunodéficientes NSG a permis d'obtenir une expansion à long terme des cellules de Sézary provenant de cellules fraîches de patients. Huit nouvelles lignées de SS correspondant à plusieurs étapes de différenciation ont été établies. Le modèle de PDX secondaire par voie percutanée a permis d'obtenir une tumorigenèse locale avec une infiltration cutanée ainsi qu'un épidermotropisme et une dissémination sanguine (Poglio S et al. 2021).

III) Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen (CLA)

En se basant sur la caractérisation des cellules de SS et de MF, nous avons pu voir qu'elles expriment CLA. Des résultats préliminaires avaient montré que dans le modèle de xénogreffe développé au laboratoire (Andrique L et al. 2016) et par comparaison aux autres lignées de LTCP, la lignée de MF-T My-La est celle qui présente la prise de greffe la plus rapide (2 semaines). Cette lignée est la seule exprimant CLA, suggérant un rôle potentiel de CLA dans la survie, la prolifération et/ou la dissémination des cellules de LTCP. Nous nous sommes donc intéressés à cette molécule qui pourrait être une potentielle cible thérapeutique.

A) Molécules de la famille des P-selectin glycoprotein ligand-1

1) P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)

CLA est une forme spécialisée de la protéine *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1), aussi appelée CD162, une glycoprotéine *mucine-like* transmembranaire de type I exprimée par les cellules myéloïdes et les lymphocytes (Frenette PS et al. 2000 ; da Costa Martins P et al. 2007). Elles sont codées par un gène unique, *SELPLG* (ENSG00000110876), situé sur le chromosome 12. Il existe 3 isoformes produit par épissage alternatif : SELPLG-203, -201 et -202. La séquence 203 code pour l'isoforme 1 et la forme canonique. Elle permet la production d'une protéine de 412 acides aminés (aa). La séquence 201 code pour l'isoforme 2 de 428 aa et la séquence 3 correspond à un isoforme potentiel de 402 aa. L'isoforme 1 diffère de l'isoforme 2 au niveau du 5' UTR. En effet, il manque une partie de la région 5' et l'initiation de la traduction se fait en aval par rapport à l'isoforme 2. L'isoforme 1 a donc une partie N-terminale plus courte (Veldman GM et al. 1995).

PSGL-1 interagit avec la P-sélectine, une molécule d'adhésion membranaire. En revanche, elle a une faible affinité pour la E et L-sélectine. On retrouve trois types de sélectine : la P-sélectine qui est exprimée sur les plaquettes et les cellules endothéliales activées, la L-sélectine qui est retrouvée sur les leucocytes et la E-sélectine qui est exprimée par les cellules endothéliales activées. Ce sont des glycoprotéines capables de se lier aux glycanes qui sont des polysaccharides (Barboux S et al. 2010). Les sélectines sont une famille de glycoprotéines transmembranaires inductibles de type I dépendantes du calcium. Ils partagent une topologie similaire, ils sont composée d'une courte queue cytoplasmique de longueur variable en fonction de la sélectine, d'un seul domaine transmembranaire et d'un large domaine extracellulaire composé d'un domaine de type lectine en N-terminal, d'un

domaine de type *epidermal growth factor* (EGF) et d'un nombre variable de séquences répétées (CRs). La fonction et la spécificité de chaque sélectine par rapport à un ligand particulier semblent être régulées principalement par trois paramètres physicochimiques : la longueur des CR de la sélectine, la structure unique du domaine de type lectine en N-terminale de la sélectine qui va reconnaître le motif oligosaccharidique présent sur le ligand et la modification glucidique post-traductionnelle particulière présente sur le ligand. Les résidus du domaine du EGF sont impliqués dans la spécificité et la liaison à la sélectine (Barthel SR et al. 2007).

PSGL-1 a d'abord été identifié comme un acteur de la migration cellulaire et plus particulièrement dans le recrutement des cellules immunitaires, comme les neutrophiles, les macrophages/monocytes, les lymphocytes B, les CD et les LT, au sein des sites inflammatoires grâce à son interaction avec les sélectines (Ley K et al. 2004 ; Nuñez-Andrade N et al. 2011). De manière non exhaustive, il a été démontré que PSGL-1 joue un rôle dans la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, dans l'activation des monocytes/macrophages et dans l'inhibition de la réponse immune en favorisant l'expression d'IL-10 et TGF- β par les CD et donc la polarisation des LT en LT régulateurs (Lévesque JP et al. 1999 ; Urzainqui A et al. 2007 ; Tinoco R et al. 2017). PSGL-1 fonctionne également comme un récepteur transmembranaire de signalisation cellulaire et régule négativement la fonction des LT (Figure 20). En effet, l'engagement de PSGL-1 induit une inhibition de la signalisation du TCR *via* l'inactivation des voies ERK et AKT (Tinoco R et al. 2016 ; Tinoco R et al. 2017). De manière intéressante, une étude sur un modèle murin *in vitro* a révélé que l'engagement du PSGL-1 avec un anticorps anti-PSGL-1, TAB4, peut déclencher un signal de mort dans les LT activés dont l'initiation serait indépendante des caspases et qui impliquerait la translocation du *apoptosis inducing factor* (AIF) des mitochondries au noyau et la libération de cytochrome c mitochondrial (Chen SC et al. 2004).

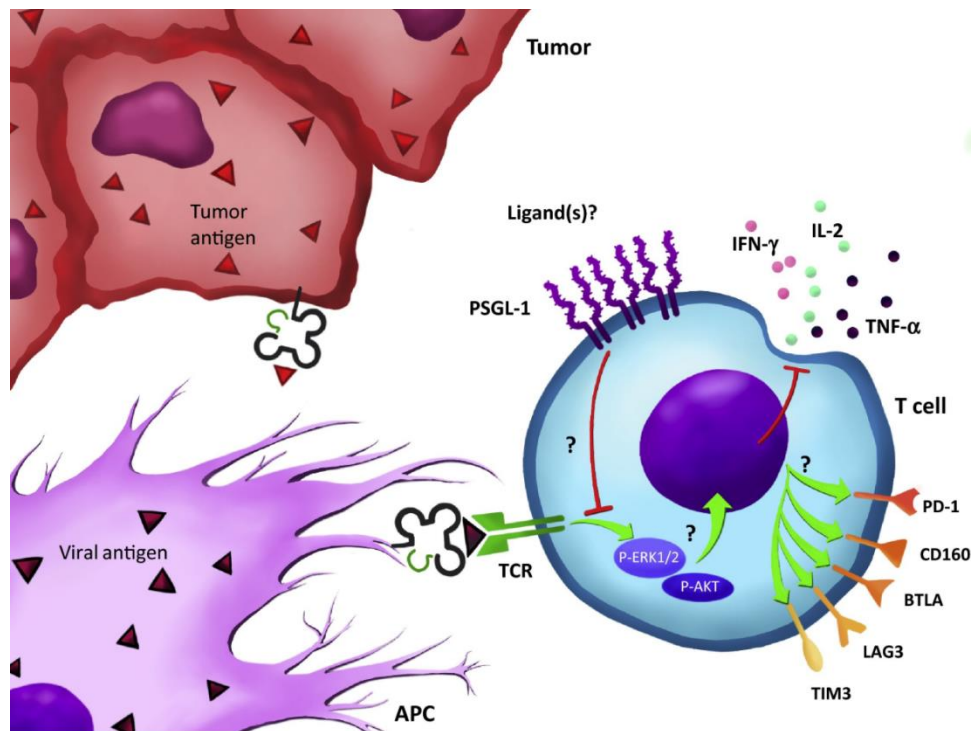
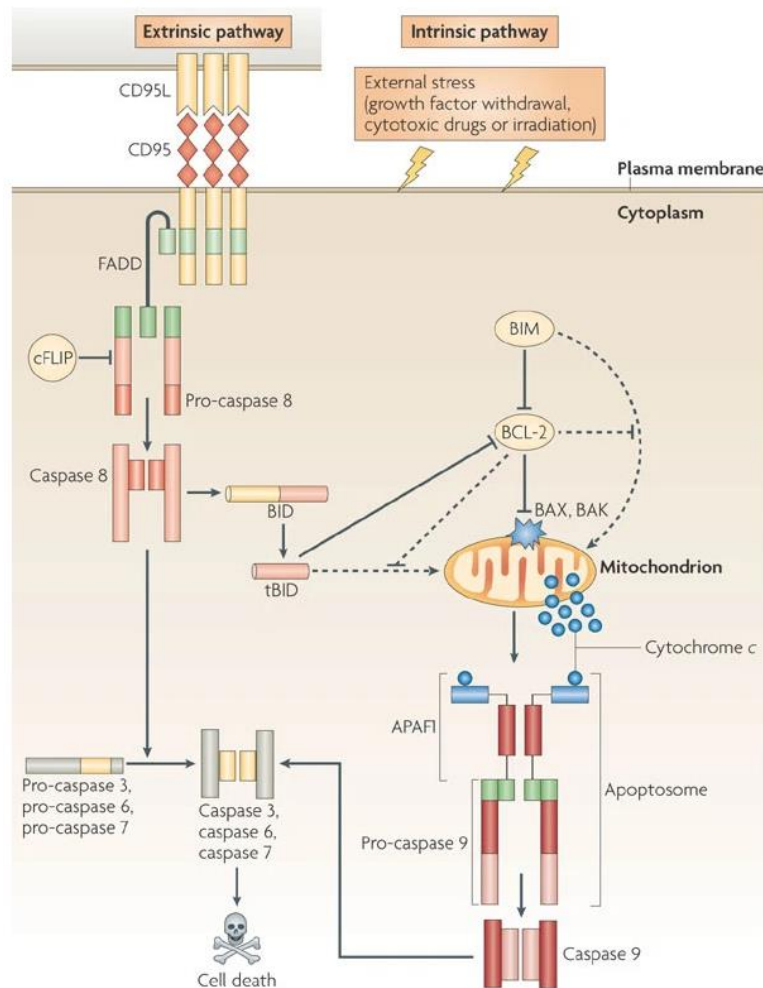


Figure 20 : PSGL-1 est un checkpoint inhibiteur qui facilite l'exhaustion des LT

La stimulation des LT par des antigènes tumoraux ou viraux tout en engageant PSGL-1 conduit à une signalisation TCR atténuée par déphosphorylation de ERK et AKT. Les LT dysfonctionnels présentent une perte de production de cytokines, une survie réduite et une régulation à la hausse des récepteurs inhibiteurs qui favorisent leur exhaustion (Tinoco R et al. 2017).

Pour rappel, deux voies générales sont impliquées dans la signalisation apoptotique : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Figure 21). De manière simplifiée, la voie extrinsèque est initiée par l'activation des récepteurs de mort de la famille des récepteurs du TNF contenant des domaines de mort cytoplasmique (DD, *Death domain*). Cette activation suite à la liaison des ligands extracellulaires (CD95L, TNF, TRAIL) induit la trimérisation du récepteur et l'apoptose de la cellule. La voie intrinsèque ou mitochondriale déclenche l'apoptose suite à la libération de cytochrome c par les mitochondries en réponse au stress ou à des stimulus comme l'absence de nutriments ou le manque de facteurs de croissance nécessaires à la survie mais également en réponse à l'exposition aux rayons UV ou à la chimiothérapie. Dans ces deux voies l'activation de caspase est observée. Les caspases sont synthétisées sous forme inactives (pro-caspases) et sont activées par clivage par d'autres caspases. On retrouve deux types de caspases : les caspases initiatrices et les caspases effectrices. Les caspases initiatrices clivent et activent les autres caspases, c'est le cas de la caspase 8 pour la voie extrinsèque et la caspase 9 pour la voie intrinsèque. Les caspases effectrices induisent la mort

cellulaire en clivant des protéines indispensables à l'intégrité cellulaire, comme les caspases 3, 6 et 7 que l'on trouve dans les deux voies (Bouillet P et al. 2009 ; Cuda CM et al. 2016).



Nature Reviews | Immunology

Figure 21 : Voie extrinsèque et intrinsèque menant à l'apoptose.

Dans la voie extrinsèque, l'engagement du récepteur de mort CD95 par le ligand CD95 (CD95L) conduit à l'activation de la caspase 8 par la protéine adaptatrice FADD (FAS-associated death domain) et à la formation du death-inducing signalling complex (DISC) par le biais d'interactions de domaine homologues. La caspase 8 active clive et active la caspase 3, 6 et 7, qui eux ciblent les substrats cellulaires vitaux et induisent la mort cellulaire. Dans la voie intrinsèque (ou B cell lymphoma 2 (BCL-2)-regulated), les signaux de stress externes tels que l'absence de facteur de croissance, l'exposition à des substances cytotoxiques ou aux radiations entraînent l'activation des protéines telles que le BCL-2-interacting mediator of cell death (BIM), qui à leur tour activent la BCL-2-associated X protein (BAX) et BCL-2 antagonist/killer (BAK) soit directement (ligne pointillée) soit indirectement (ligne continue) en interagissant avec les membres pro-survie de la famille BCL-2, comme BCL-2. L'oligomérisation de protéines telles que BAX et BAK provoque la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase 9 initiateur dans l'apoptosome. La caspase 9 active alors la caspase 3, 6 et 7 ce qui entraîne la mort cellulaire. Le clivage de BH3-only protein BH3-interacting-domain death agonist (BID) par la caspase 8 après induction de CD95 relie les deux voies dans certains types de cellules (par exemple, dans les hépatocytes). APAF1, apoptotic protease-activating factor 1; cFLIP, cellular FLICE-like inhibitory protein; tBID, BID tronqué (Bouillet P et al. 2009)

2) Modifications post-traductionnelles

PSGL-1 est une glycoprotéine de 120 kDa de type mucine dimérique qui fonctionne de manière calcium dépendante. Chaque sous-unité de PSGL-1 contient 70 résidus Ser et Thr dans le domaine extracellulaire qui sont des sites potentiels pour l'O-glycosylation et 3 sites potentiels pour la N-glycosylation. Cette glycoprotéine contient également un domaine de reconnaissance des glucides de type C à son extrémité N-terminale avec trois sites de sulfatation de tyrosine prévus aux résidus 46, 48 et 51 qui se situent dans une séquence flanquée de résidus acides (Figure 22).

Pour fonctionner comme un ligand des sélectines, PSGL-1 nécessite de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que des sulfatations de tyrosine et l'ajout de sialyl Lewis x tétrasaccharide (sLe^x) aux O-glycanes. La sulfatation sur la tyrosine 51 de PSGL-1 est la plus importante pour la liaison à la L-sélectine alors que celle sur la tyrosine 48 est nécessaire pour la liaison à la P-sélectine. En revanche, PSGL-1 ne peut se lier à la E-sélectine car ceci nécessite l'ajout de plus d'épitopes sLe^x (Cummings RD 1999 ; Snapp KR et al. 2001 ; Rodgers SD et al. 2001 ; Bernimoulin MP et al. 2003).

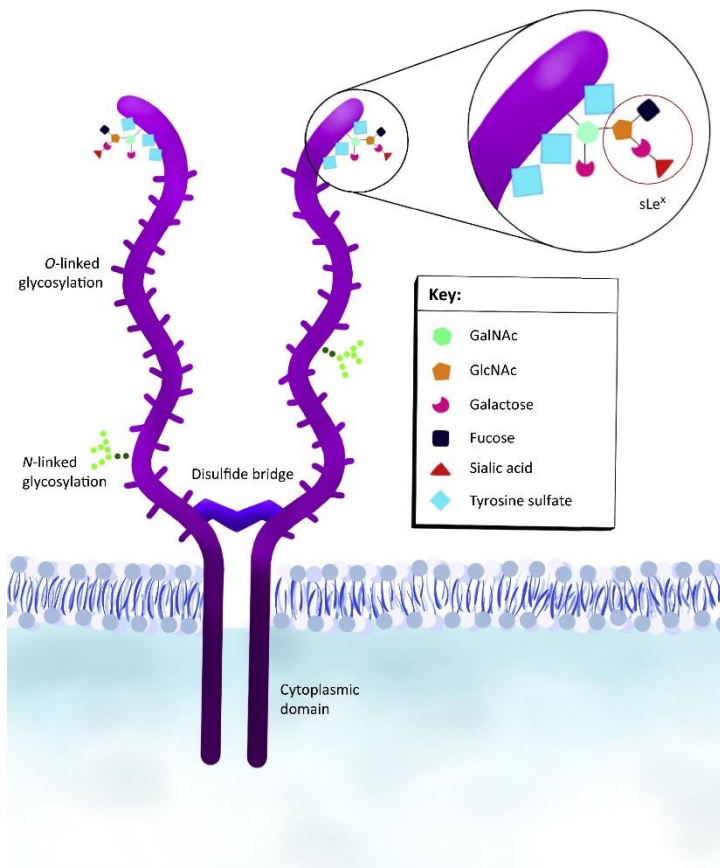


Figure 22 : Structure de PSGL-1.

PSGL-1 est exprimé à la surface des cellules sous la forme d'un homodimère lié par un pont disulfure. La protéine contient des domaines extracellulaires, transmembranaires et cytoplasmiques. Le domaine extracellulaire contient des sites de ramification qui permettent une glycosylation liée à l'O et à l'N et des sites terminaux où d'autres modifications post-traductionnelles sont possibles. Les cellules myéloïdes expriment de manière constitutive les enzymes qui induisent la liaison aux sélectines, tandis que les LT induisent ces enzymes lors de l'activation des lymphocytes T. Abréviations : GalNAc, N-acétylgalactosamine ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; sLe^x, sialyl Lewis x. (Tinoco R et al. 2017)

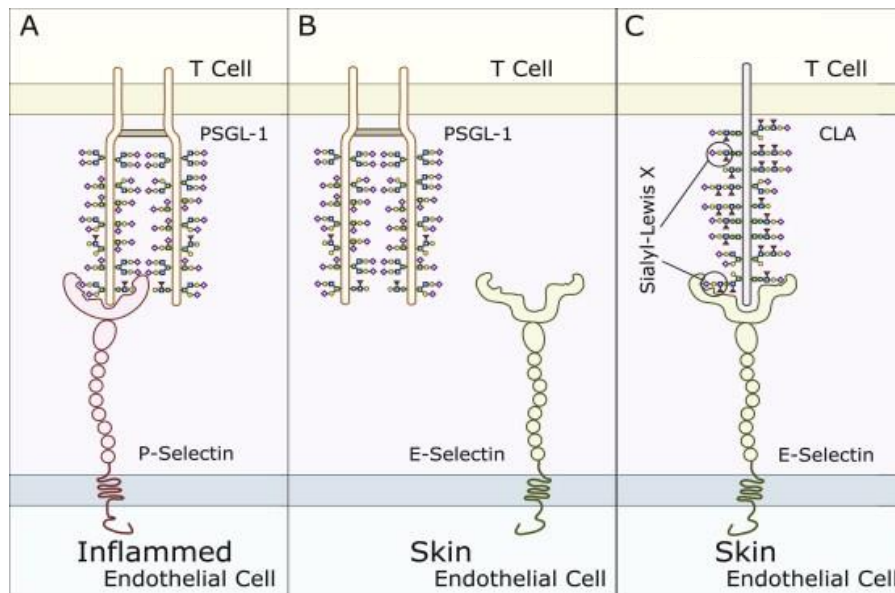


Figure 23 : CLA est un glycovariant de la glycoprotéine P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1).

A) PSGL-1, présent à la surface des LT se lie à la P-sélectine, qui est surexprimée sur les cellules endothéliales en cas d'inflammation. La liaison de PSGL-1 à la P-sélectine aide à initier le roulement des leucocytes. B) En revanche, PSGL-1 ne se lie pas à la E-sélectine qui est présente sur les cellules endothéliales de la peau. C) Les LT de la peau régulent à la hausse le nombre de fractions sialyl Lewis s (sLe^x) sur PSGL-1, lui conférant la capacité de se lier à la E-sélectine. Ce glycovariant, sous forme monomérique, capable de se lier à la E-sélectine décoré de sLe^x de PSGL-1 est appelée CLA (Maverakis E et al. 2015).

CLA partage une séquence et un corps protéique commun avec PSGL-1. En effet, il a été découvert que le CLA est un glycovariant inductible de PSGL-1. Le CLA est défini par sa réactivité avec un anticorps monoclonal unique, HECA-452, et son activité en tant que ligand de la E-sélectine. Les cellules exprimant PSGL-1 mais pas CLA ne sont pas capables de lier la E-sélectine à l'inverse des cellules qui co-expriment PSGL-1 et CLA (Fuhlbrigge RC et al. 1997). CLA est induit suite à une modification post-traductionnelle qui permet l'ajout de sLe^x (Figure 23). Cette glycosylation post-traductionnelle de PSGL-1 serait médiée, dans les cellules myéloïdes, par des glycosyltransférases ST3 β -galactoside α -2,3-sialyltransférase -3, -4 et -6 (ST3Gal-3, -4 et -6), et principalement ST3Gal-4. En effet, une étude a permis de mettre en évidence, grâce à l'inactivation des gènes codant pour ces enzymes en utilisant des shARN ou la stratégie CRISPR/Cas9, le rôle principal de ST3Gal-4 dans la

régulation de CLA en montrant une réduction de 80% de l'expression de l'épitope HECA-452 à la surface cellulaire lorsque ST3Gal-4 été inhibé par rapport à 35% avec ST3Gal-3 et contrairement à ST3Gal-6 qui a montré une augmentation de 2-fold de cet épitope. L'inhibition de ST3Gal-4 a induit une perte presque complète de l'épitope sLe^x sur les N- et O-glycanes des leucocytes et une réduction de leur adhésion avec toutes les sélectines. Ainsi, ST3Gal-4 permet le transfert d'acide sialique sur les structures N-Acetyllactosamine de type II (Gal β 1,4GlcNAc) afin que des fucosyltransférases agissent sur la lactosamide sialylée pour générer l'antigène sLe^x. L'ajout de sLe^x permet la maturation de CLA et ainsi son interaction avec la E-sélectine (Figure 24) (Mondal N et al. 2015).

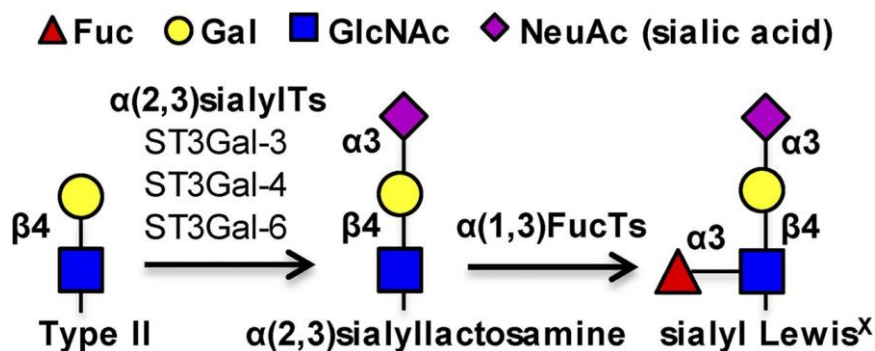


Figure 24 : Biosynthèse des sLe^x

Trois $\alpha(2,3)$ sialyltransférases, ST3Gal-3, -4 et -6, agissent sur le substrat de N-acétyllactosamine de type II pour ajouter l'acide sialique terminal. $\alpha(1,3)$ fucosyltransférases agissent sur la lactosamine sialylée résultante pour former l'antigène sLe^x. (Mondal N et al. 2015).

3) Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen (CLA)

CLA est exprimé par les cellules immunitaires et plus particulièrement la vaste majorité des cellules T mémoires de la peau des sujets sains ou des lymphocytes infiltrant les sites d'inflammation cutanés (Ni Z et al. 2009 ; Berg EL et al. 1991 ; Santamaria LF et al. 1995 ; Fuhlbrigge RC et al. 1997 ; D'Ambrosio D et al. 2000 ; Sernicola A et al. 2020). Chez des sujets en bonne santé, le CLA est absent à la surface des LT naïfs mais exprimés dans 10-25% des LT mémoires circulantes (CD45RO⁺) (Berg EL et al. 1991 ; Fuhlbrigge RC et al. 1997 ; Clark RA 2010 ; Sernicola A et al. 2020).

C'est une molécule également exprimée à la surface d'une petite proportion de cellules B mémoires, des NK, des granulocytes, des neutrophiles, des CD du sang et monocytes ou encore des cellules de Langerhans de la peau (Kieffer JD et al. 2001 ; Tsuchiyama J et al. 2002 ; Chang S-E et al. 2003 ; Yoshino T et al. 1999 ; Armerding D et al. 2001) jouant ainsi un rôle dans leur adressage cutané (Kantele A et al. 2003)

4) Rolling des lymphocytes T : rôle de l'interaction CLA/E-sélectine

L'extravasation ou diapédèse est le mécanisme qui permet le recrutement des cellules dans les sites inflammatoires (Sernicola et al. 2020). Les cellules circulantes sont attirées par un gradient de chimiokines inflammatoires sécrétées par les cellules résidentes dans le tissu lésé. Pour qu'un leucocyte circulant gagne un tissu, il doit d'abord ralentir et rouler le long de la surface endothéliale. Le roulement des leucocytes est permis par les sélectines qui vont initier l'adhérence transitoire et réversible des leucocytes sur la paroi interne des vaisseaux sanguins. Par exemple, la molécule CLA médie la migration des lymphocytes vers la peau grâce à son interaction avec la E-sélectine exprimée par les cellules endothéliales présentes dans les veinules post-capillaires du derme activées par des cytokines pro-inflammatoires (Figure 25). Des agents pro-inflammatoires tels que les lipopolysaccharides, l'IL2, le TNF- α , l'IL1 β et autres peuvent augmenter cette expression (Berg EL et al. 1991 ; Fuhlbrigge RC et al. 1997 ; Woodland DL et al. 2009). L'interaction E-sélectine/CLA est calcium dépendante et tient sa spécificité grâce aux motifs sLe^x (Ni Z et al. 2007). Elle permet l'initiation de la phase de roulement de l'extravasation des leucocytes, de la circulation à la peau et donc de la migration trans-endothéliale. Ce phénomène de roulement est possible grâce à une association et dissociation rapide d'interactions entre les molécules de sélectine et leur ligand (Kaplanski G et al. 1994). Les sélectines permettent un attachement faible des LT afin de les exposer aux chimiokines et autres stimulus (Etzioni A, 1996 ; Kishimoto TK et al. 1994) permettant ainsi l'activation rapide des intégrines, dont le LFA-1 à la surface des LT. Cela induit une adhésion forte et stable suite à l'ancrage aux molécules apparentées aux immunoglobulines, telle que ICAM-1 exprimée à la surface des cellules endothéliales de la peau. La transmigration des leucocytes à travers les cellules endothéliales ou diapédèse peut alors avoir lieu (Figure 25) (Etzioni A, 1996 ; Thelen M et al. 2008 ; Alon R et al. 2008).

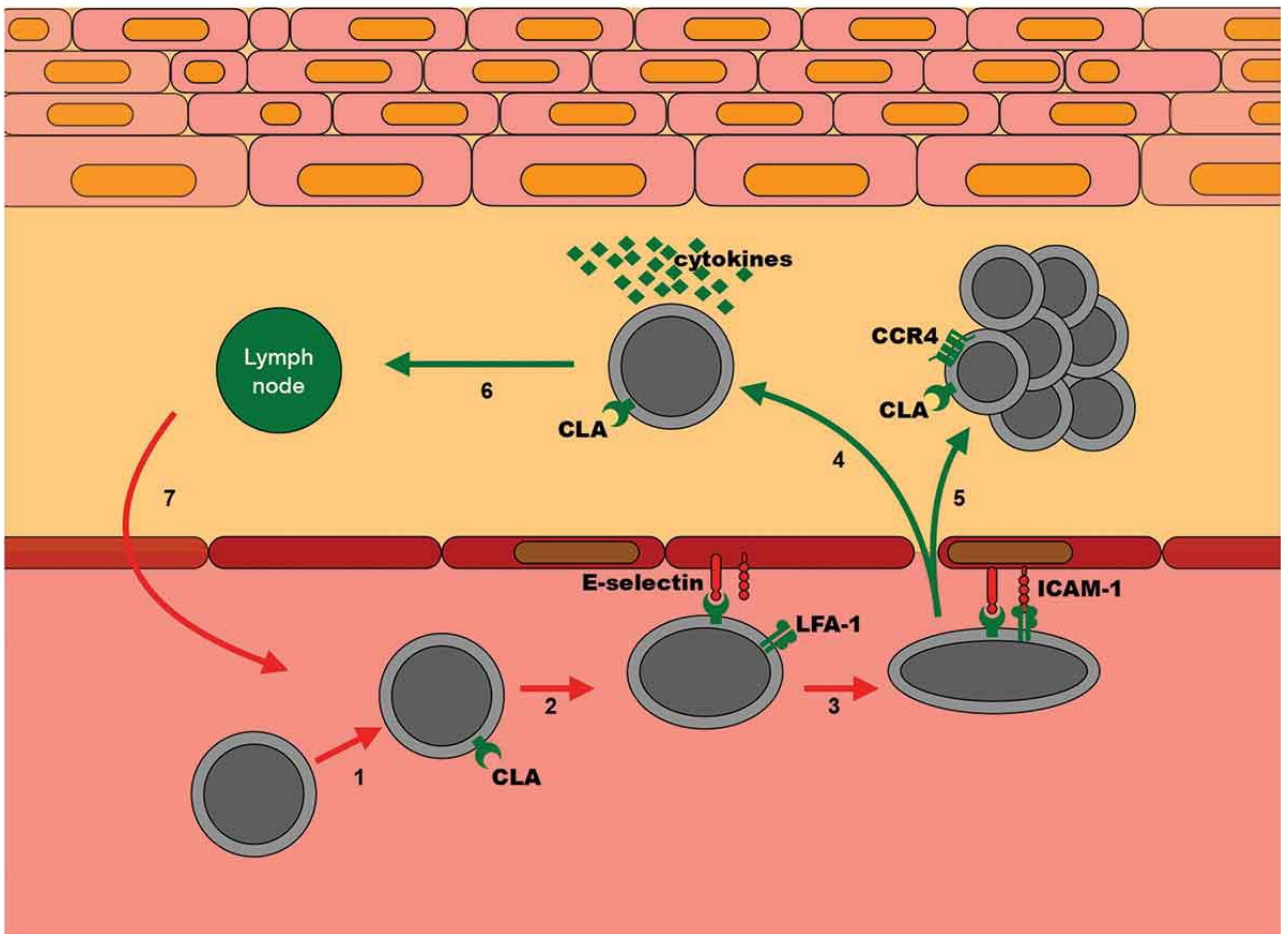


Figure 25 : L'adressage cutané des LT CLA+.

1. Le CLA est absent sur les LT naïfs et est exprimé après une transition naïve-mémoire. 2. L'extravasation des vaisseaux sanguins vers la peau des LT mémoires dépend d'un processus complexe de roulement et d'adhésion. La phase de roulement est médiée par l'interaction du CLA (LT) avec la E-sélectine (cellules endothéliales). 3. La phase d'ancrage est médiée par LFA-1 (LT) et ICAM-1 (endothélium). 4. Les LT_{EM} activé produisent des cytokines dans des conditions inflammatoires. 5. Les LT des LTCP expriment CLA et CCR4 et migrent préférentiellement vers la peau. 6 et 7. Une partie des LT mémoires cutanés subissent un phénomène de recirculation à travers les ganglions lymphatiques drainant la peau et retournant dans la circulation sanguine (Sernicola A et al. 2020)

B) Rôle de CLA dans les pathologies cutanées

1) Dans les pathologies inflammatoires cutanées

La quantité de LT CLA+ circulantes dans le sang est corrélée au microenvironnement immunitaire cutané (Sernicola et al. 2020). Ainsi, le CLA pourrait être considéré comme un biomarqueur périphérique de l'activation immunitaire cutanée dans des pathologies cutanées inflammatoires telles que le psoriasis (Czarnowicki T et al. 2015a ; Sernicola et al. 2020 ; de Jesús-Gil C et al. 2021) et

la dermatite atopique (Czarnowicki T et al. 2015b ; Czarnowicki T et al. 2017 ; de Jesús-Gil C et al. 2021) que je détaillerai de manière simplifiée ci-dessous. Cependant, le CLA est également impliqué dans d'autres pathologies, entres autres, l'alopecie aerata (Czarnowicki T et al. 2018 ; de Jesús-Gil C et al. 2021), le vitiligo (Czarnowicki T et al. 2019 ; de Jesús-Gil C et al. 2021) et les réactions allergiques induites par les médicaments (de Jesús-Gil C et al. 2021).

a. Psoriasis

La pathogenèse immunitaire du psoriasis nécessite à la fois dans les lésions aux stades précoces et dans celles aux stades tardifs le développement d'une réponse IL-23/IL-17 (Hawkes JE et al. 2017). Le phénotype Th17, prédominant au sein des lésions psoriasiques (Langrish CL et al. 2005), dépend des LT CLA+ (Langrish CL et al. 2005 ; Ruiz-Romeu E et al. 2018). Les LT CLA+ dans ces lésions sont impliqués dans les évènements immunitaires initiaux et conduisent à la formation des lésions (Davison SC et al. 2001 ; Vissers WHPM et al. 2004) ainsi que leur maintien (Krueger JG 2002). En effet, ils ont un rôle dans la réponse à une infection par streptococcus, un déclencheur environnemental connu et le mieux caractérisé du psoriasis (Thorleifsdottir RH et al. 2016), puisque seules les LT CLA+ répondent préférentiellement à *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) (Ruiz-Romeu E et al. 2016). Ils jouent également un rôle dans la production des cytokines Th17 liées aux évènements précoces de formation des lésions (Valdimarsson H et al. 2009). De nouvelles études ont permis de lier les LT CLA+ et l'IL-17 en montrant que le milieu cytokinique présent dans les lésions psoriasiques influence la réponse de l'IL-17 par les LT CLA+. Il a été démontré que l'IL-15 et l'IL-23, toutes deux présentes dans les lésions psoriasiques, sont en synergie avec les LT CLA+ et les cellules épidermiques autologues pour produire de l'IL-17A et de l'IL-17F sans stimulus exogène (de Jesús-Gil C et al. 2020). Dans le psoriasis, les antigènes streptococciques peuvent stimuler les LT et induire l'expression de CLA (Baker BS et al. 1997). Les LT Th9 principalement CLA+ et produisant la cytokine IL-9 ont également été associées au psoriasis et à d'autres troubles auto-immuns et inflammatoires de la peau (Schlapbach C et al. 2014).

Les LT CLA+ circulants ont un phénotype activé et la quantité de LT CLA+ circulantes est inversement corrélée à la sévérité de la maladie. Cela signifie que la quantité de LT CLA+ cutanés est de mauvais pronostic et ainsi, lorsque les lésions régressent, les cellules séquestrées dans la peau recirculent (Ferran M et al. 2013).

b. Dermatite atopique

Les LT cutanés participent aux différents stades de développement et du maintien de la dermatite atopique (Gittler JK et al. 2012), la maladie inflammatoire de la peau la plus courante (Boguniewicz M et al. 2011 ; Czarnowicki T et al. 2014). Dans la peau des patients, l'infiltrat se compose principalement d'un nombre élevé de LT mémoires CLA+ qui participent à l'environnement cutané local. L'expansion des LT CLA+ s'accompagne de la prédominance d'une réponse Th2 et Th22 (Soumelis V et al. 2002 ; Czarnowicki T et al. 2014 ; de Jesús-Gil C et al. 2021). Le niveau de LT CLA+ Th22 est corrélé avec la sévérité, le prurit et le taux de cellules productrices d'IL-17. La fréquence de LT CLA+ Th1 augmente avec l'âge et est associée à la chronicité de la maladie. On retrouve un ratio LT CLA+ Th1/Th2 déséquilibré qui augmente avec l'âge mais qui reste inférieur en comparaison avec les témoins sains (Czarnowicki T et al. 2015a ; Czarnowicki T et al. 2015b ; Czarnowicki T et al. 2020). Chez ces patients, les LT CLA+ présents au sein des lésions et dans la circulation sont plus activés par rapport aux témoins sains (Jung T et al. 2003) et produisent les cytokines IL-4, IL-13 et IL-31 (Akdis M et al. 1997 ; Teraki Y et al. 2000).

2) Dans le microenvironnement tumoral cutané

a. Mélanome cutané primitif

Les *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) sont responsables de la réponse immunitaire anti-tumorale et nécessitent pour leur migration cutanée des molécules d'adhésion spécifiques tel que le CLA (Gelb AB et al. 1993). Leur présence a été décrite dans les mélanomes cutanés primitifs (Clark WHJ et al. 1969) et leur nombre dans le microenvironnement du mélanome est associé à un pronostic favorable (Clemente CG et al. 1996 ; Mullins IM et al. 2004 ; Tuthill RJ et al. 2002). Des études de caractérisation ont permis de mettre en évidence une augmentation significative de l'expression du CLA (Adams DH et al. 1997) et donc la présence de TILs CLA+ suite à la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNF et IL-1) par les kératinocytes qui permettent l'augmentation de l'expression de la E-sélectine sur les cellules endothéliales (Gelb AB et al. 1993 ; Krieg C et al. 2009). L'interaction CLA/E-sélectine est donc impliquée dans le recrutement des TILs au sein du mélanome (Adams DH et al. 1997 ; Rohde D et al. 1992). Le taux d'expression global des molécules d'adhésion endothéliales tumorales (E et P-sélectine) diminue au cours de la progression du mélanome induisant une inhibition du recrutement des TILs CLA+ dans les stades avancés (Weishaupt C et al. 2007 ; Schadendorf D et al. 1995 ; Nooijen PT et al. 1998). En effet, les TILs CLA+ ne sont pas présents dans les lésions métastatiques cutanées contrairement au mélanome cutané primitif (Gelb AB et al. 1993).

b. Lymphomes cutanés primitifs

Comme vu précédemment, le CLA est également exprimé sur les cellules LTCP de type MF ou SS. La perte complète de l'expression du CLA a été rapportée dans les cellules T dermiques et sous-cutanées profondes dans la phase tumorale du MF par Magro et al. alors que Lu et al. n'ont pas décrit de différence dans l'expression du CLA entre les lésions cutanées précoces ou avancées de MF (Magro CM et al. 2001 ; Lu D et al.). Le pourcentage de LT tumoraux CLA+ circulants semble être corrélé à l'étendue des symptômes cutanés dans le SS (Borowitz MJ et al. 1993 ; Heald PW et al. 1993) et des taux élevés de CLA dans le MF à une dissémination extra-cutanée limitée. L'expression de CLA a également été rapportée dans d'autres LTCP plus rares, tels que les lymphomes T épidermotropes agressifs CD8+, les lymphoproliférations CD30+ et les lymphomes T cutanés à cellules NK (Magro CM et al. 2008). Contrairement au MF, dans les lymphomes T de type NK, l'expression de CLA par les cellules NK est corrélée à une évolution clinique plus agressive (Yoshino T et al. 2002).

En revanche, le CLA n'est pas exprimé dans la majorité des cellules néoplasiques des lymphomes B cutanés primitifs. En effet, l'expression du CLA n'a été rapportée que dans de rares cas de lymphomes B lymphoblastiques primitifs de l'enfance et lymphomes du manteau (Magro CM et al. 2008).

Néanmoins, le rôle de CLA, son impact pronostique/diagnostique et sa fonction n'ont pas été complètement explorés dans le contexte des LTCPs. En effet, seule une étude récente a montré que CLA pouvait permettre l'adressage thérapeutique dans le cadre du traitement du MF, en utilisant un anticorps anti-CLA couplé à la photo-immunothérapie dans le proche de l'infra-rouge (Silic-Benussia M et al. 2021). En revanche, dans cette étude, l'anticorps HECA-452 n'a aucun effet direct sur la viabilité des cellules de LTCP. La photo-immunothérapie dans le proche infra-rouge nouvellement développée utilise un anticorps monoclonal conjugué à un colorant photo-absorbeur, la phtalocyanine hydrophile IRdye 700DX®, et la lumière infra-rouge (Kobayashi H et al. 2021). Elle permet de provoquer une cytotoxicité sélective des cellules qui expriment l'antigène ciblé et n'a aucun effet sur les cellules ne l'exprimant pas (Kobayashi H et al. 2020).

IV) Problématique et Objectifs

Nous avons donc vu que les LTCP, tels que le SS et le MF, ont une origine non connue à ce jour. L'hétérogénéité génétique mais aussi immunophénotypique des cellules T CD4+ de LTCP rendent difficile la compréhension des processus de développement de ces LTCP. En effet, la suspicion de facteurs environnementaux ou infectieux à l'origine de la maladie n'a pas été vraiment prouvée (Morales Suárez-Varela MM *et al.* 2000). De même que l'oncogenèse n'est pas complètement élucidée, l'une des hypothèses serait que la transformation en cellules T atypiques pourrait être liée à une activation permanente consécutive à une stimulation antigénique chronique (Wong HK. 2013).

Les nombreux traitements (photochimiothérapie extracorporelle, anticorps monoclonaux...) proposés selon les stades de la maladie s'avèrent peu efficaces notamment pour le SS avec un taux de survie à 5 ans de 24% à 40%. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est donc nécessaire afin d'améliorer la prise en charge des patients.

Sur la base des travaux de caractérisations immunophénotypiques, des anticorps anti-CCR4 ont été développés et approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) (Kasamon et al., 2019). CLA qui peut aussi être exprimée par les cellules de LTCP (Campbell JJ *et al.* 2010 ; Kamarashev *et al.* 1998), est une glycoprotéine de surface de la famille des P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) permettant aux cellules de l'immunité qui l'expriment d'interagir avec la E-Sélectine présente à la surface des cellules endothéliales vasculaires activées. Cette interaction est nécessaire dans le cadre de l'immunosurveillance cutanée. Concernant les LTCP, il a largement été montré que les cellules tumorales expriment le CLA notamment dans la peau (Kamarashev *et al.* 1998). En revanche, son rôle fonctionnel n'a pas été réellement étudié. Nous avons donc voulu étudier son rôle et supposé qu'il pourrait être impliqué dans l'agressivité de l'invasion cutanée et/ou la dissémination voire la survie des cellules de LTCP. Et cela, particulièrement après l'obtention de précédents résultats au laboratoire montrant que seule la lignée My-La exprime CLA et qu'elle est la plus agressive dans un modèle de xénogreffe (Andrique L et al., 2016).

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'expression de CLA à la surface des cellules tumorales chez les patients atteints de SS de la cohorte du Service d'Oncodermatologie (Pr Beylot-Barry, CHU Bordeaux). Nous avons ensuite étudié le rôle fonctionnel de CLA dans la migration trans-endothéliale et la survie des cellules de LTCP *in vitro*. Nous avons par la suite étudié la fonction de CLA dans la tumorigenèse et la dissémination des cellules de LTCP *in vivo* dans un modèle de xénogreffe où les cellules de la lignée My-La été pré-traitées avant la greffe.

Nous avons évalué en parallèle si l'expression de CLA à la surface des cellules tumorales circulantes pouvait être corrélée au pronostic, au diagnostic ou autres paramètres évalués chez les patients atteints de SS. Pour cela, nous avons corrélé l'expression du CLA aux données cliniques des patients.

Enfin, nous avons tenté de comprendre les mécanismes moléculaires modulés par CLA dans les cellules de SS de patients et de développer un modèle pré-clinique afin de valider l'effet de CLA où cette fois-ci les cellules de la lignée cellulaire My-La étaient injectées aux souris puis une fois les tumeurs établies, 2 groupes de souris présentant un volume tumoral homogène ont été traitées soit avec l'anti-CLA soit l'isotype contrôle.

RESULTATS

I) Publication: *Cutaneous Lymphocyte Antigen (CLA) is a potential therapeutic target in Cutaneous T Cell Lymphoma (soumis à Journal of Investigative Dermatology)*

Les cellules de LTCP ont un phénotype hétérogène et expriment notamment des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire telles le CLA jouant un rôle dans l'adressage cutané. Nous avons étudié le rôle fonctionnel de CLA dans la migration trans-endothéliale et la survie des cellules de LTCP *in vitro*. Ceci a été possible grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal (HECA-452) contre le CLA et le recours à 2 shARN dirigés contre l'enzyme qui intervient dans la maturation de CLA, ST3Gal-4. L'utilisation de l'anticorps anti-CLA a significativement diminué la migration à travers un endothélium dérivé du derme et la survie des cellules LTCP provenant de patients et de la lignée cellulaire My-La ($p = 0,05$ et $p < 0,001$, test de Mann-Whitney) en induisant des voies apoptotiques *via* l'activation rapide des effecteurs des caspases 3/7, 8 et 9. La diminution de l'expression du CLA par l'utilisation de shARN dirigés contre ST3Gal-4 a également altéré la migration, la prolifération et la survie des cellules de LTCP.

Après avoir confirmé son rôle *in vitro*, nous avons étudié la fonction de CLA dans la tumorigénèse et la dissémination des cellules de LTCP *in vivo* dans un modèle de xénogreffe où les cellules de la lignée cellulaire My-La ont été pré-traitées avec l'anticorps anti-CLA, ou l'isotype contrôle correspondant, puis injectées dans les souris immunodéficientes NSG. Le traitement par l'anticorps anti-CLA sur ces cellules a diminué la tumorigénicité ainsi que la dissémination des cellules LTCP dans différents tissus par rapport au groupe témoin ($p=0,05$, test de Mann-Whitney).

TITLE: Cutaneous Lymphocyte Antigen (CLA) is a potential therapeutic target in Cutaneous T Cell Lymphoma

Authors and affiliations:

Sara PERU¹, Martina PROCHAZKOVA-CARLOTTI¹, Floriane CHERRIER¹, Joanne VELAZQUEZ¹, Elodie RICHARD², Yamina IDRISSE¹, David CAPPELLEN^{3,4}, Lamia AZZIMARTIN^{5,6}, Anne PHAM-LEDARD^{1,7}, Marie BEYLOT-BARRY^{1,7}, Jean-Philippe MERLIO^{1,3}, Sandrine POGGIO^{1*}

¹ INSERM U1053, Team 3-Oncogenesis of Cutaneous Lymphoma, Bordeaux University, F-33000 Bordeaux, France.

² Institut Bergonié Recherche fondamentale, ACTION U1218, F-33000 Bordeaux, France

³ Tumor Bank and Tumor Biology Laboratory, Bordeaux University Hospital, F-33600 Pessac, France

⁴ INSERM U1035, Bordeaux University, F-33000 Bordeaux, France.

⁵ INSERM U1053, Bordeaux Research in Translational Oncology, BaRITOn, Team 2-Helicobacter infection: Inflammation and Cancer, Bordeaux University, F-33000 Bordeaux, France

⁶ UFR des Sciences Médicales, Bordeaux University, F-33000 Bordeaux, France.

⁷ Dermatology Department, Bordeaux University Hospital, F-33000 Bordeaux, France

Address correspondence:

*Sandrine Poggio, INSERM U1053-BaRITOn-Team Oncogenesis of cutaneous lymphoma, Bat 3B, 2ème étage- 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux, France, (phone: 33-5-57-57-10-87; FAX: 33-5-57-57-10-32, email: sandrine.poggio@u-bordeaux.fr).

Key-words: cutaneous T-cell lymphomas, cutaneous lymphocyte antigen, cell migration, cell survival

ABSTRACT

Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) such as Sézary syndrome (SS) or Mycosis Fungoides (MF) correspond to an abnormal infiltration of T lymphocytes in the skin with different progressive entities. CTCL cells have a heterogeneous phenotype and express cell adhesion molecules such as cutaneous lymphocyte antigen (CLA) supporting skin addressing and homing. The use of a monoclonal antibody (mAb, HECA-452) against CLA significantly decreased trans-endothelial migration and survival of CTCL cells from patient samples and My-La cell line. The decrease of CLA expression by inhibition of its maturation enzyme, ST3Gal-4, also impaired CTCL cell migration, proliferation and survival. We confirmed *in vivo* that the treatment with anti-CLA mAb decreased the tumorigenicity as well as dissemination of CTCL cells in different tissues compared to the control group.

Our findings provide evidence on the involvement of CLA in CTCL cell migration and survival, supporting that CLA inhibition could represent a new actionable therapy in patients with CTCL.

INTRODUCTION

Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) corresponds to an abnormal infiltration of T lymphocytes in the skin. The most common is Mycosis Fungoides (MF), which is characterized by an indolent evolution with patches and plaques on the skin and epidermotropism of atypical and clonal T cells. In contrast, Sézary Syndrome (SS) is less frequent but more aggressive and is characterized by an erythroderma associated with pruritus and a clonal expansion of CD4+ T cells circulating in the blood (Olsen et al., 2007). Patients with SS have a poorer prognosis than MF, with a 5-year survival rate of approximately 24% to 40% (Fink-Puches et al., 2002 ; Wilcox RA, 2016). Treatments are not curative especially in advanced stages, excepted in cases eligible for allogenic stem cell transplantation (de Masson et al., 2014).

Recent studies have focused on the immunophenotypic characterization of Sézary cells (SCs) using flow cytometry. While a central memory phenotype of SC had been suggested by Campbell et al. (Campbell et al., 2010), it seems to be more heterogeneous with cells exhibiting the phenotype of resident memory, effector memory, central memory or naive T lymphocytes (Roelens et al., 2017, Poglio et al., 2021).

Such studies have however identified that blood clonal T cells express a combination of molecules (CLA and CCR4) which could allow them to be addressed to the skin (Kamarashev et al., 1998 ; Campbell et al., 2010). Based on such observations, an antibody directed against the CCR4 chemoreceptor (Mogamulizumab) was tested on CTCL cell lines prior to the phase II and III clinical trials and it is FDA approved since 2018 for treatment of adult patients with relapsed or refractory MF or SS after at least one prior systemic therapy (Chang et al., 2012 ; Kim et al., 2018 ; Kasamon et al., 2019 ; Ramelyte et al., 2019).

Alternatively, it has been shown in MF and SS skin biopsies that skin infiltrating lymphocytes express CLA in the vast majority of cases (Picker et al., 1990 ; Kamarashev et al., 1998). While

its expression by CTCL cells has been reported, functional data on the role of the CLA molecule in CTCLs are still missing. In healthy donors, CLA is absent on the surface of naïve T cells but is expressed by 10-25% of circulating memory T cells (CD45RO+) (Berg et al., 1991). T cells expressing CLA interact with the E-selectin, an adhesion molecule expressed by activated endothelial cells (Fuhlbrigge et al., 1997). Such interaction is necessary to address T cells to the skin. CLA shares a common core protein with P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1). The 2 proteins are encoded by the same gene, *SELPLG*, and differ thanks to a post-translational modification (Fuhlbrigge et al., 1997 ; Maverakis et al., 2015). In myeloid leukocytes, the enzyme ST3 β -galactoside α -2,3-sialyltransferase 4 (ST3Gal-4) allows Sialyl Lewis^x biosynthesis that is required for CLA maturation and then specific CLA/E-selectin interaction (Mondal et al., 2015).

More recently, a study has evidenced that CLA could also be a promising target to specifically address to tumor cells a light sensitive molecule for the treatment of MF (Silic-Benussia et al., 2020). Therefore, we decided to investigate the expression of CLA in both, patients' circulating SCs and MF cell line. Here, we evaluated CLA functions on migration and survival of patient SCs and My-La cell line both *in vitro* and *in vivo* after targeting CLA by a specific monoclonal antibody (mAb) or inhibition of the CLA maturation enzyme, ST3Gal-4.

RESULTS:

CLA is expressed in the majority of SS blood samples

Thirty-six patients with SS (stage B2 at diagnosis) were included in our study. PBMC containing circulating SCs were isolated. The patients' characteristics such as gender, age and TNMB stage at the time of analysis are available in Table S1. For all samples, we evaluated by flow cytometry (FACS) the percentage of CLA+ T cells in the SC clonal population (TCRV β +CD3+) (Figure 1a). Such percentage of CLA+ SC was heterogeneous among patients (Figure 1b). Thirty-four of 36 patient samples exhibited more than 10% of CLA+ cells, 16 more than 50% of CLA+ cells in the tumor clonal population (Table S1). The quantification using HALO software of the CLA+ area on the total biopsy surface was heterogeneous (range: 0.04 to 2.45%) among 12 patients (Figure 1c and Supplementary Figure S1a). The co-immunostaining of CLA and CD3 on the patients' skin biopsies revealed that only a portion of the skin-resident CD3+ cells were CLA+ (Supplementary Figure S1b). For patients whose skin and blood were matched, no correlation was found between the proportion of CLA+ area in skin-resident and circulating CLA+CD3+ cells (Figure 1d).

Figure 1

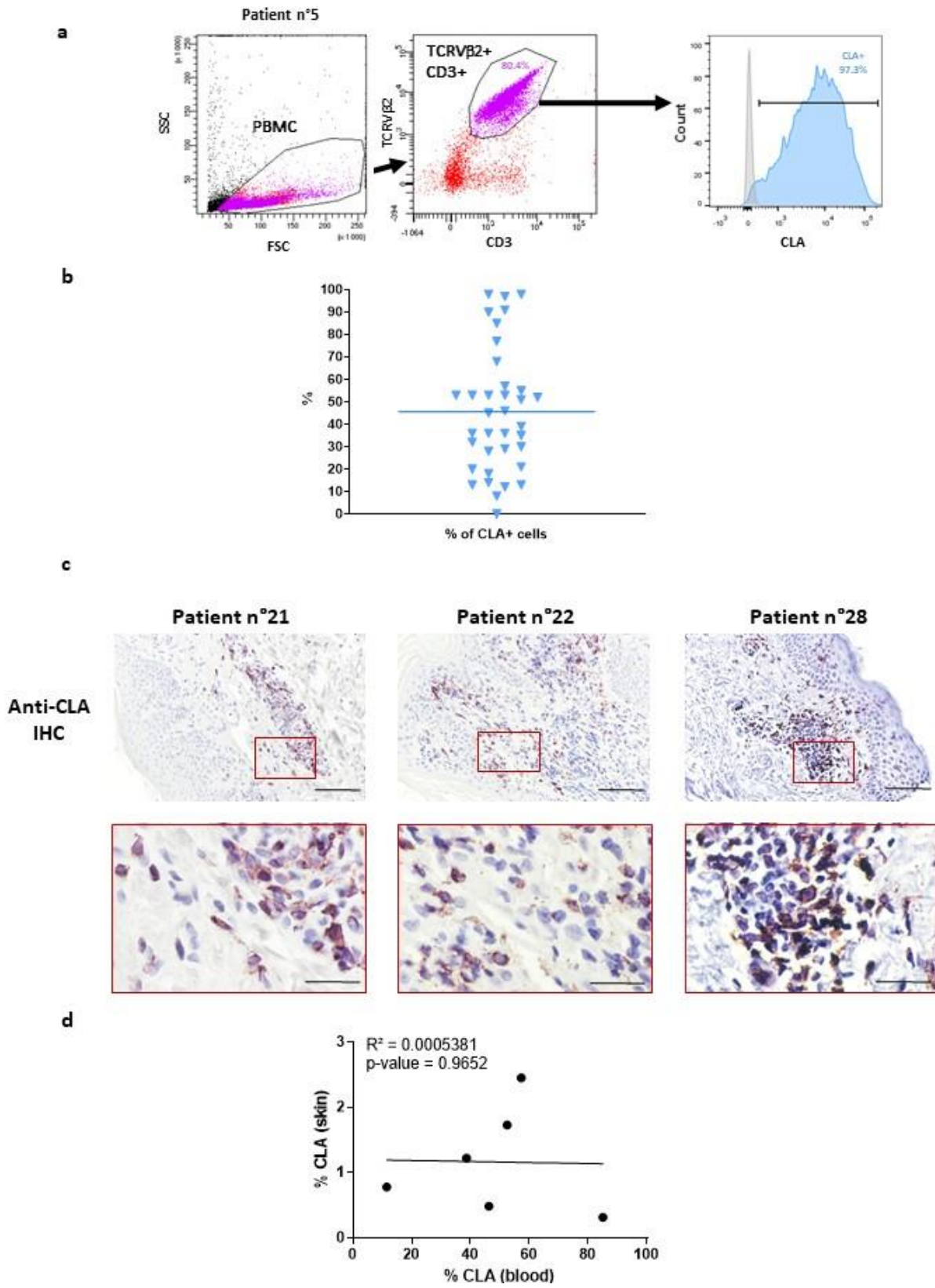


Figure 1: Proportion of CLA+ T cells in SS blood and skin samples are heterogeneous between patients.

(a) Immunophenotyping of tumor cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) prepared from 36 patient samples with SS were analyzed by flow cytometry to determine the percentage of CLA+ T cells in the clonal tumor population (TCRV β tumoral+CD3+). Example of gating strategy for patient 5. **(b)** Percentage of CLA+ tumor T cells are variable in blood SS samples. Horizontal bar represents the median of CLA+ cells inside the tumor population. **(c)** IHC showing CLA expression in SS patient skin biopsies. Example of anti-CLA staining on skin sections of 3 SS patients. Scale bars correspond to 100 μ m (upper panel) and 30 μ m (lower panel). **(d)** Percentages of CLA+ cells in blood and CLA+ area in skin are not correlated. These percentages were compared using simple linear regression test.

Targeting CLA inhibits CTCL cell trans-endothelial migration

The involvement of CLA in CTCL cell migration was investigated by targeting CLA with a mAb in a trans-endothelial migration assay using a Transwell® system coated with HMVEC-D or HUVECs. 3 hours after inducing migration with SDF-1 and CCL19/21 chemokines, the percentages of migrating My-La and SCs treated with an anti-CLA mAb were significantly lower compared to the isotype control antibody group ($n=3$ My-La, 4.33 vs 20.23%, $p=0.05$, $n=3$ Sézary patients, 23.37 vs 40.28 %, $p<0.001$) (Figure 2a). In parallel, we also increased the expression of CLA ligand (E-selectin) on endothelial cell surface by mimicking inflamed tissue by lipopolysaccharide (LPS) exposure (Supplementary Figure S2a). My-La cell migration was also significantly increased after E-selectin induction and impaired after anti-CLA mAb treatment (Supplementary Figure S2b). Interestingly, in an inflammatory context, anti-CLA antibody has a higher effect on the migration inhibition than at steady state condition (Supplementary Figure S2b).

These data show that CLA is involved in CTCL migration process through dermal vascular cells.

Figure 2

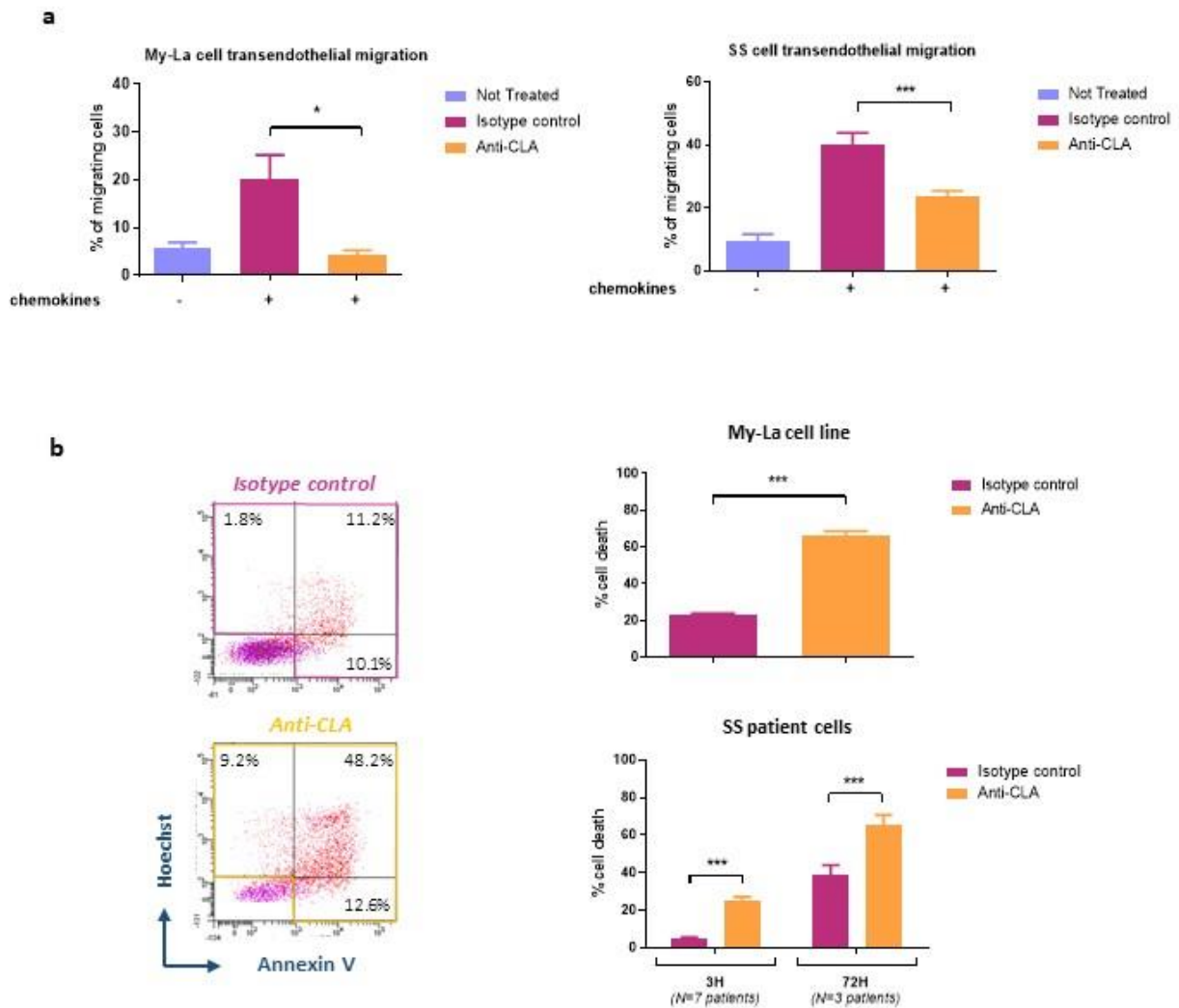


Figure 2: Anti-CLA mAb inhibits CTCL cell trans-endothelial migration and alters cell survival.

(a) Anti-CLA mAb treatment decreases CTCL migration. My-La cell line or SS patient cells were incubated with an anti-CLA mAb (HECA-452- 15 or 30 μ g/ml) or isotype control in a Transwell® system coated with human microvascular cells from the dermis (HMVEC-D cells) for 3 hours. Histogram represents percentage of migration of My-La cells ($n=3$) or SS patient cells ($n=3$). (b) Anti-CLA mAb increases CTCL cell death. Percentage of My-La ($n=3$) or SS patient cell death after anti-CLA mAb or isotype control treatment during 3 hours or 3h and 72 hours respectively. Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. * $p<0.05$ and *** $p<0.0001$. (Mean \pm SEM).

Targeting CLA alters CTCL cell survival

To investigate if CLA is involved in CTCL cell survival, we performed an apoptosis-necrosis assay on My-La cell line and on fresh CLA⁺ SCs from patients after treatment with anti-CLA mAb. Three and 72 hours after treatment, the percentage of total dead cells significantly increased when cells were treated with the anti-CLA mAb in comparison to the isotype control antibody (*n*=3 My-La cells 3h, 65.9 vs 22.9%, *p*<0.0001, *n*=7 patients 3h, 25.1 vs 5.2 %, *p*<0.0001, *n*=3 patients 72h, 65.5 vs 38.8 %, *p*<0.0001) (Figure 2b). Moreover, the percentage of CLA⁺ cells was significantly correlated ($R^2=0.7498$, *p*=0.0117) with the efficacy of the antibody on tumor cell death (Supplementary Figure S3). This also supported that the effects of the anti-CLA antibody were specific and dependent on CLA expression, as also demonstrated by the absence of increase of cell death when CLA negative cell lines were treated with the anti-CLA antibody (Supplementary Figure S4a). In addition, treatment of CD3⁺CD4⁺ cells from healthy donors with the anti-CLA mAb did not increase cell death, suggesting an absence of effect on normal CD4⁺ T cells even if 30% of the cells expressed CLA (Supplementary Figure S4b). This could be explained by a lower expression of CLA as observed on the surface of healthy donor CD4⁺ compared to CTCL cells (Supplementary Tables S1 and S2).

Targeting CLA with a mAb induces CTCL cell death in a level dependent manner, specifically in tumor CLA⁺ cells, showing that CLA is involved in the control of CTCL cell survival.

Impaired CLA maturation reduces trans-endothelial migration and survival of CTCL cells

The CLA molecule shares a common core with PSGL-1 and differs by post-translational modifications mediated by ST3Gal-4 (Figure 3a, *left*). To confirm if the decrease of CLA levels could affect cell survival, we silenced ST3Gal-4, the maturation enzyme of CLA, using 2 lentiviruses encoding shRNA targeting *ST3Gal-4* mRNA on exon 5 or on exon 8, and GFP as a reporter gene (Supplementary Figures S5). My-La cells transduced with *shST3Gal-4 ex5* or *shST3Gal-4 ex8* had a decreased *ST3Gal-4* mRNA levels compared to the Control shRNA (Supplementary Figure S6a). As expected, in these cells, the expression of PSGL-1 was not decreased by *ST3Gal-4* silencing (Supplementary Figure S6b). Sorted GFP⁺ My-La cells transduced with *ST3Gal-4* shRNA vectors exhibited a high decrease of CLA expression compared to the Control shRNA (MFI = 20091 vs 3398, $n=3$) (Figure 3a, *right*). This was associated with a significant decrease of trans-endothelial migration capacity of CTCL cells ($n=3$ My-La cells, 15.8 (shControl) vs 7.6 (shex5) and 2.5% (shex8), $p<0.001$) (Figure 3b).

The decrease of CLA expression at the CTCL cell surface was also associated with significantly decreased cell numbers after 72h of culture (Figure 3c). Both decreased proliferation in *shST3Gal-4 ex8* condition (Supplementary Figure S6c) and increased cell death were observed with *shST3Gal-4 ex5* and *shST3Gal-4 ex8* compared to the *shControl* condition ($n= 3$, 20.7 vs 37.8 and 49.7%, $p <0.001$) (Figure 3d). These data support that the presence of CLA on the cell surface is involved in both CTCL trans-endothelial migration, proliferation and survival.

Figure 3

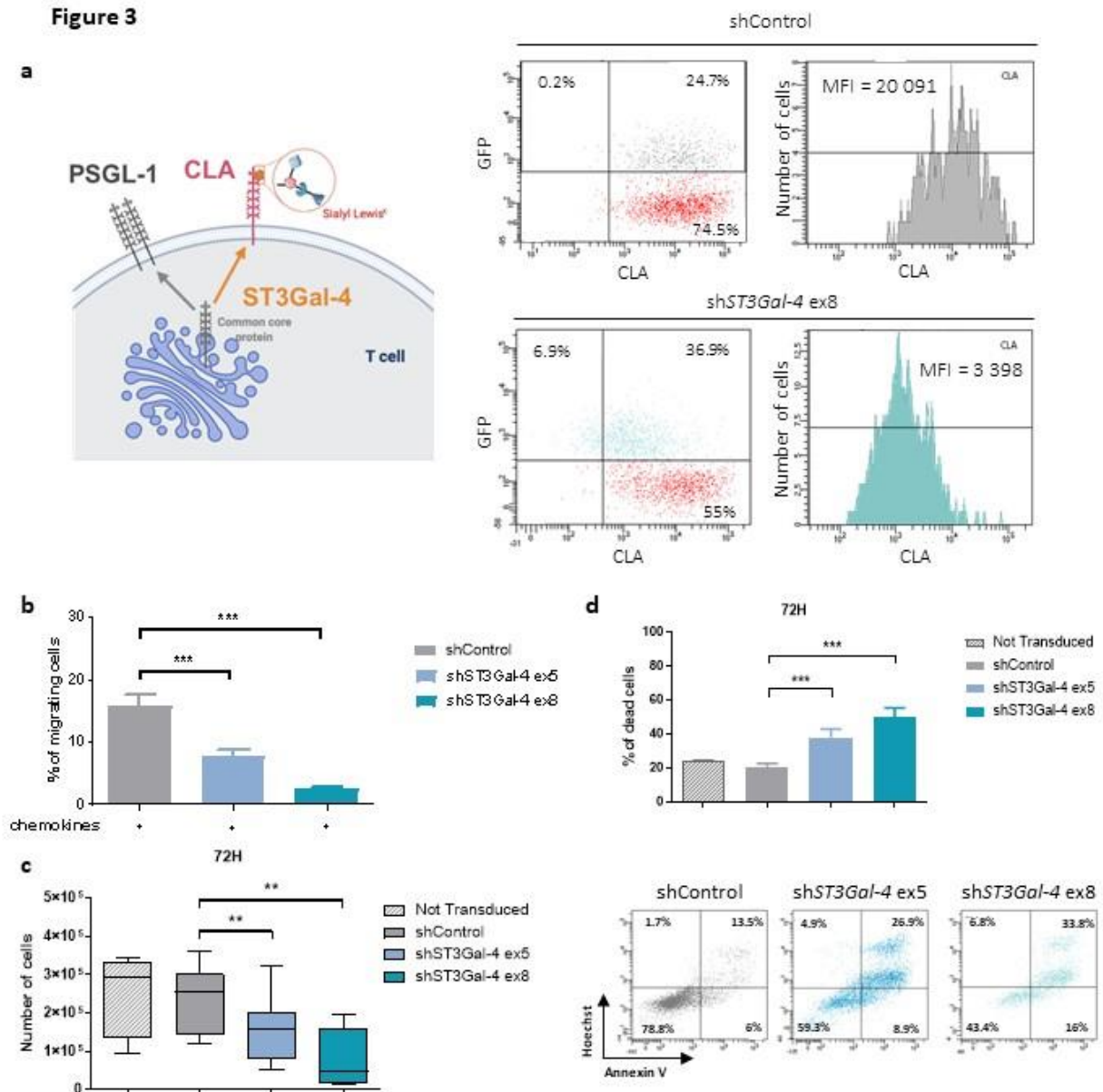


Figure 3: Decreasing cell surface CLA expression by ST3Gal4 gene silencing impairs CTCL cell trans-endothelial migration and cell survival.

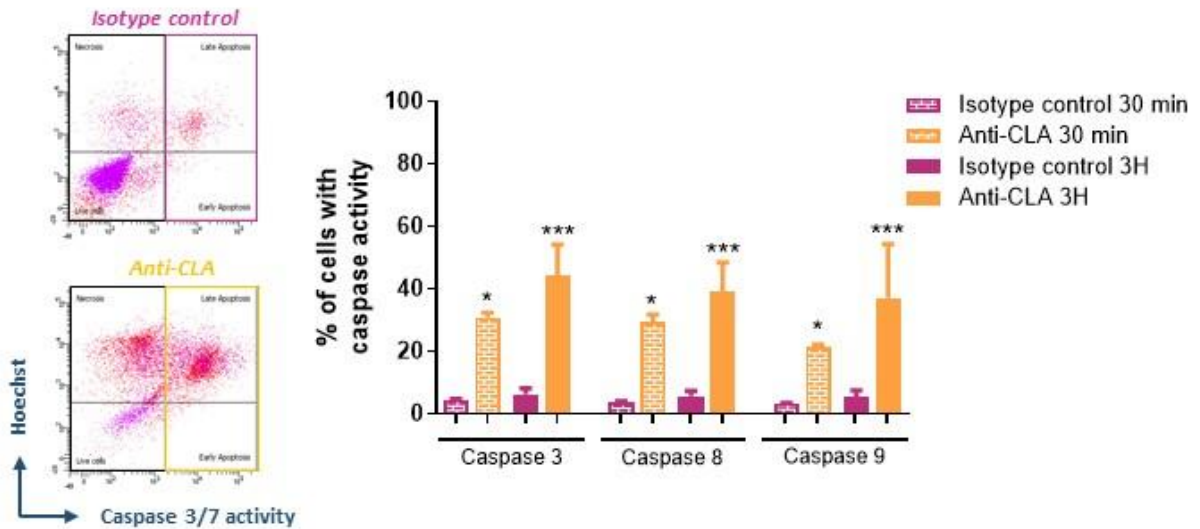
(a) *ST3Gal-4* shRNAs decrease CLA surface expression. Schematic representation of CLA and PSGL-1 molecules using Biorender.com (left). Dot plots (right) represent the transduction rate of My-La cells with a lentivirus encoding a GFP reporter and shRNAs targeting *ST3Gal-4* or a non-silencing control. Histograms show the decrease of CLA expression on My-La cell surface after *ST3Gal-4* silencing. (b, c, d) Decrease of CLA cell surface expression inhibits trans-endothelial migration (b), cell number (c) and increases cell death (d). (b) shControl or sh*ST3Gal-4* transduced My-La cells were plated for 3 hours in Transwell® coated with human microvascular cells. Histogram represents percentage of My-La cell migration. (c, d) Cell count and death percentage in each condition after 72h. Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. ** $p < 0.001$. *** $p < 0.0001$ (Mean \pm SEM, $n=3$).

Targeting CLA mediated cell apoptosis

To understand the mechanisms of cell death induced by the anti-CLA mAb, caspases-3/7, caspase-8, caspase-9 activities and mitochondria permeability were measured in CTCL cells, 30 minutes and 3h after treatment. At these two time points, the anti-CLA antibody induced an increase of the caspase 3/7 activity compared to isotype control antibody (Figure 4a). Caspase-8, caspase-9 activities were also both increased by the anti-CLA mAb, showing that the cell death is due to a global activation of apoptotic pathways (Figure 4a). Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) staining was also reduced after treatment with the anti-CLA mAb, showing a loss of the mitochondrial membrane potential and suggesting that at least part of CTCL cell apoptosis is due to the induction of the intrinsic pathway (38.12%, $p < 0.001$) (Figure 4b). Altogether, the anti-CLA antibody induced rapid activation of the different apoptotic pathways in CTCL cells.

Figure 4

a



b

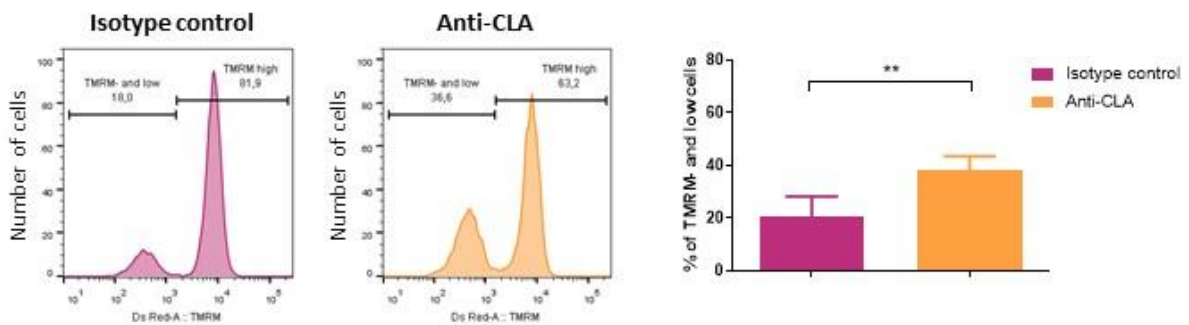


Figure 4: Anti-CLA mAb activates apoptotic pathways

(a) Anti-CLA mAb increases caspase 3/7, 8 and 9 activities. My-La cells were incubated with anti-CLA antibody mAb (HECA-452) or isotype control during 30 min or 3 hours. Percentage of apoptotic cells (caspase activity+) and necrotic cells (Hoechst+, caspase activity -) were studied by flow cytometry (left). Quantification of cells with caspase 3/7, 8 and 9 activities after 30 min or 3 hours of treatment (right). Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. * $p < 0.05$. *** $p < 0.0001$ (b) Anti-CLA mAb increases mitochondria permeability. Mitochondrial membrane potential was measured by flow cytometry using TMRM dye on My-La cell line after 3 hours of incubation with an anti-CLA antibody (HECA-452) or isotype. Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. ** $p < 0.001$. (Mean \pm SD).

Anti-CLA treatment impairs the capacity of tumorigenesis of CTCL cells *in vivo*

My-La cells were previously treated for 2 hours with the anti-CLA mAb or with the corresponding isotype control antibody and then injected intrahepatically in immunodeficient mice. After 2 weeks of clinical monitoring, the mice were sacrificed (Figure 5a).

Macroscopic analysis showed a decrease in tumor size at the site of injection in the anti-CLA antibody group compared to the control group (Figure 5b). Percentage of HLA-ABC+ cells analysed by immunohistochemistry (IHC) on peritumoral liver and kidney sections was significantly lower in the anti-CLA group compared to the control (Figure 5c). These results and macroscopic analysis showed that, after anti-CLA treatment, CTCL cells are less prone to promote tumorigenesis and spreading of SCs in different tissues in an experimental *in vivo* mouse model.

Figure 5

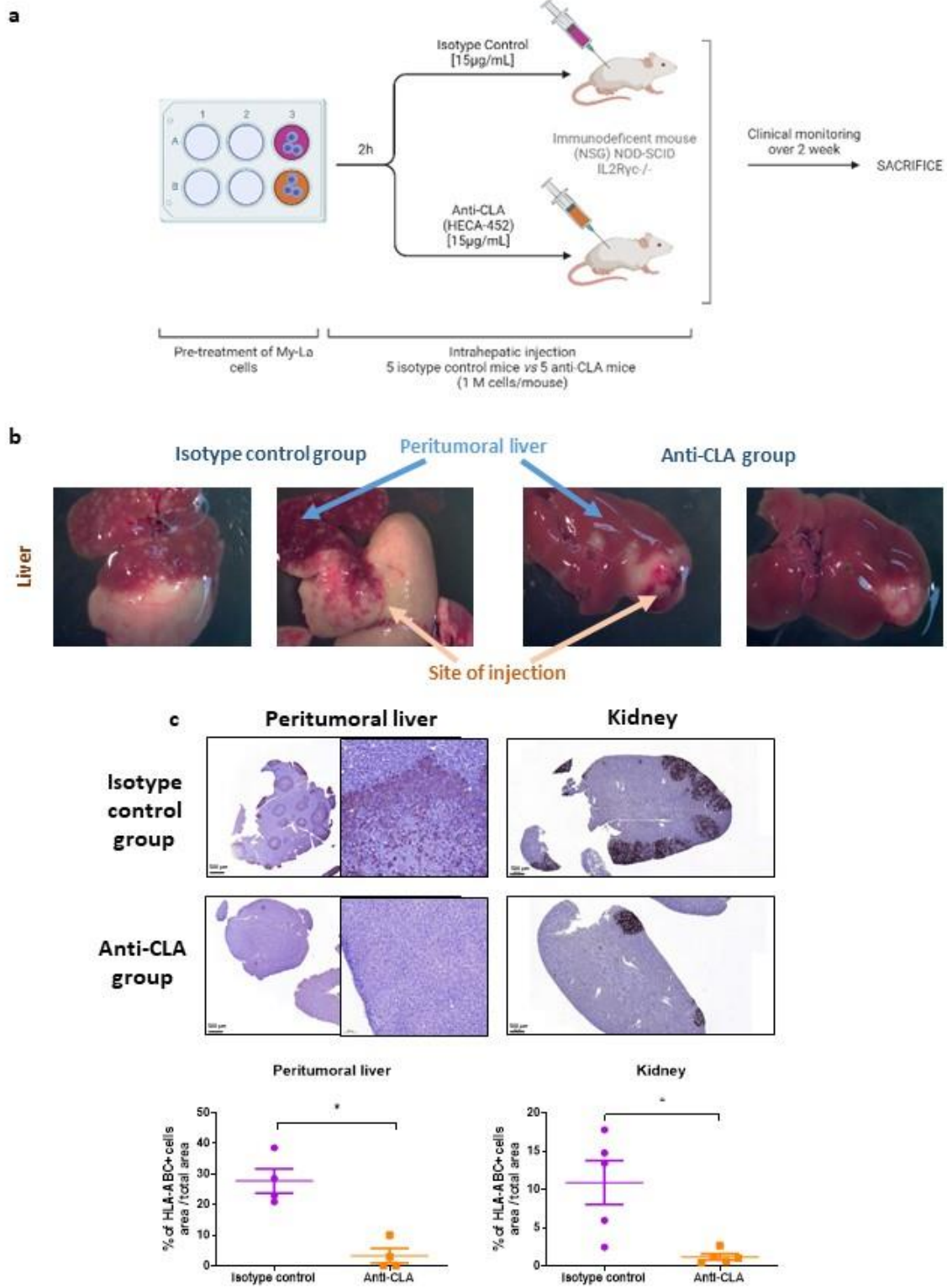


Figure 5: Anti-CLA mAb pretreatment decreases survival and dissemination of CTCL cells *in vivo*

(a) Experimental strategy. Schematic representation of the experimental strategy *in vivo* created using Biorender.com. (b) Pictures of livers from mice treated with anti-CLA mAb (HECA-452) or its isotype control. We can assess the invasion at the site of injection (N=5 for each group). (c) Decreased percentage of HLA-ABC+ cells in the peritumoral liver section and the kidney in anti-CLA group. Example of IHC using anti-HLA-ABC on peritumoral liver and kidney sections of mice injected with cells treated with anti-CLA mAb or an isotype control, and quantification of HLA-ABC+ cells area percentages. *, p<0.05.

DISCUSSION:

Previous studies already demonstrated that the CLA molecule is expressed on CTCL cell surface on skin biopsies (Kamarashev et al., 1998). However, CLA biological functions in CTCL cells had not been previously investigated. Our report provides evidence that CLA is involved in trans-endothelial migration of CTCL cells from patient SS samples and a T-MF cell line, as already shown for normal memory T cells (Clark et al., 2006). Surprisingly, the targeting of the CLA molecule or decreasing its expression on the cell surface impairs *in vitro* survival of CTCL cells, but not normal CD4+ T cells. This loss of survival occurs through apoptotic signal resulting in caspase 3/7, 8 and 9 activation. Using a mice xenograft model (Andrique L et al., 2016), we also confirmed that targeting the CLA molecule decreases CTCL tumorigenesis and spreading *in vivo*.

We observed a wide interpatient heterogeneity in CLA expression on SCs in blood and skin biopsies. The absence of correlation between the number of circulating and skin-resident CD3+CLA+ cells supports that CLA expression is heterogeneous between blood and skin compartments. Interestingly, a recent single cell study showed that malignant T cells from the skin exhibit higher expression of genes related to the T cells activation status and cell cycle progression compared to blood cells (Herrera A et al., 2021). Another study also revealed a higher proliferative index in the skin-derived T cells in SS compared to the blood, explained by a higher mTOR pathway activation in skin-derived SCs *via* the tumor skin microenvironment (Cristofolletti C et al., 2019). This shows that skin and blood-derived SCs appear to have different pattern of expression and proliferative status that account for difference in CLA expression between SCs of these two compartments.

CLA is a molecule involved in memory T cell migration towards the skin. In the literature, the effect of the blocking potential of anti-CLA mAb (HECA-452 clone) on immune cells notably was not well-established (De Boer et al., 1994 ; Kummitha et al., 2012). Here, we demonstrate,

in a transwell system coating with human vascular cells, that HECA-452 treatment blocks the CTCL trans-endothelial migration. This decrease could be partially explained by the destabilization of E-selectin-CLA interaction. Indeed, we have also shown that overexpression of E-selectin on microvascular cell surface increases significantly CTCL cells trans-endothelial migration. The use of shRNAs silencing the maturation enzyme ST3Gal-4 decreased cell surface CLA levels and had the same effect than the HECA-452 antibody on cell migration. This suggests that the effect of the anti-CLA antibody would be due to blocking functions. ST3Gal-4 involvement in cancer cell migration processes was previously described. However, excepted in stem/stromal cell biology, its functions on cell survival remained not well established (Guerrero et al., 2020 ; Templeton et al., 2021). Our results suggest that targeting ST3Gal-4 sialyl transferase in the context of CTCL could represent another strategy to induce tumor cell death. Such investigations need new therapeutic drugs because current inhibitors of sialyltransferase are not ST3Gal-4 specific and could have important side effects (Templeton et al., 2021). Such broad-spectrum inhibitors could have unexpected effects such as improving the survival of tumor cells as observed in human multiple myeloma cells (Natoni et al., 2020). So far, the impact of HECA-452 on CTCL cell survival has not been reported except after the combination of the mAb to a photo-absorber dye, the hydrophilic phtalocyanine IRdye 700DX® (IR700), actionable by near infrared light (Silic-Benussi et al., 2021). However, in this study, no direct effect of HECA-452 was observed on CTCL survival. This may be due to the use of a lower concentration of antibody as compared to our study. Interestingly, we demonstrated that CLA targeting induced CTCL cell death with no effect on normal CD4+ T cells survival, although they partially express CLA. Indeed, its expression at a lower level in normal cells than in the My-La cell line and patients SCs could explain such tumor cells specific effects.

CLA is a molecule from the PSGL-1 family that differs by post-translational modifications and addition of sialyl Lewis^x motifs. PSGL-1 is described in the literature as a potential inhibitor of T-cell function by dampening TCR signalling through ERK and AKT dephosphorylation (Tinocco et al., 2017). Our data suggest that CLA may have an opposite effect in CTCL tumor cells as CLA expression protects them from apoptosis. Indeed, the process of T-cell survival may differ between CTCL and normal T cells. At basal levels and after stimulation, the activation of TCR pathways is reduced in CTCL cells compared to healthy donor cells (Fargnoli et al., 1997 ; Klemke et al., 2009). This phenomenon also confers resistance of CTCL cells to activation-induced cell death (AICD) due to the down-regulation of CD95 (Klemke et al., 2009).

CLA targeting appears independent from such mechanism, as modulation of AICD regulators was not observed after treatment of CTCL cells (data not shown). In contrast, the anti-CLA antibody induced apoptotic pathways in CLA+ CTCL cells through a rapid activation *in vitro* (within 30 minutes) of the caspases 3/7, 8 and 9 effectors, compared to other potential or current therapeutic agents as Curbitacin, Bexaroten or Cobomarsen (Brouwer et al., 2020 ; Seto et al., 2018).

Here, we also demonstrated an *in vivo* biological role of CLA in T cells tumorigenesis by pretreating the cells with mAbs and injecting them in a mouse model (Andrique et al., 2016). CLA targeting by HECA-452 treatment decreased tumor development at the injection site, probably through induction of cell death. This shows that the treatment alters the ability of the cells to generate a tumor *in vivo*.

This work evidenced specific roles of CLA in CTCL cell survival, proliferation and migration. In addition, we also demonstrated that CLA could be targeted either directly using a monoclonal antibody on fresh patient SCs and a T-MF cell line, or by silencing its maturation enzyme. Anti-CLA treatment impaired both CTCL cell migration and survival by inducing apoptosis that may depend on the level of CLA expression on CTCL cells, sparing normal CD4+ blood T cells from a side effect. CLA may therefore, represent a new therapeutic target in the treatment of CTCL.

MATERIALS AND METHODS:

Sézary patient cells

Blood samples from 36 patients diagnosed for a SS (T4NxMxB2) were obtained thanks to the Onco-Dermatology Department of the Bordeaux University Hospital. Patient characteristics at the time of analysis were provided in Supplementary Table S1. Patients gave informed consent in accordance with the declaration of Helsinki and national ethic rules. The institutional review board approved the manipulations of patient Sézary samples (DC-2008-412). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using a Pancoll centrifugation technique (PAN BIOTECH™, Aidenbach, Germany). Tumor (TCRVβ+CD3+) cells were purified by FACS from PBMC as described below and then characterized in the different experiments.

Patient cell cultures

SCs from patients purified by flow cytometry cell-sorting as described below, were cultured as previously described (Armstrong et al., 2009 ; Poglio et al., 2021). Briefly, SC were cultivated in a T-cell lymphoma medium (TLM) that is composed of alpha-MEM medium, 10% FBS, 10% human AB serum (Jacques Boy Biotechnology Institute, Reims, France), human *Stem Cell Factor* (hSCF) at 50 ng/mL, human *Fms-like tyrosine kinase-3* (hFLT-3) at 20 ng/mL, Interleukine-7 (IL-7) at 20 ng/ml, insulin at 20 nM and 1% Penicillin/Streptomycin. SCs were held at 37°C, in an atmosphere with 5% CO₂, in an incubator.

Flow cytometry analyses

TCRVβ variant characterization

The clonal population was characterized by the dominant T-cell receptor (TCR) Vβ variant using the TCR Vβ Repertory Kit (Beckman Coulter). Staining and controls were made as

provider's recommendations with 1 μ L of anti-CD8-PE-Cy7 (RPA-T8), anti-CD4-BV421 (RPA-T4) and anti-CD3-APC-H7 (SK7) antibodies.

Quantification of CLA expression

SCs were pretreated with fragment constant (Fc) blocking reagent (human BD Fc Block, BD Biosciences, New Jersey, USA). SCs were then stained with anti-CLA-APC (HECA-452), anti-TCRV β -PE (dominant clone), anti-CD45RO-FITC (UCHL1) and anti-CD3-APC-H7 (SK7). The percentage of CD45RO+CLA+ cells was quantified by flow cytometry (FACS) among TCRV β +CD3+ cells.

All FACS analyses were performed with a Canto II cytometer (BD, Biosciences, New Jersey, USA) at the UB'Facility platform (TBM Core, Bordeaux, France). BD FACSDiva™ software (BD, Biosciences, New Jersey, USA) was used for data interpretation.

Sézary and My-La cells sorting:

SCs were previously stained with anti-TCRV β -PE, anti-CD8-PE-Cy7, anti-CD4-BV421 and anti-CD3-APC-H7 antibodies, as mentioned above. The clonal cell population (TCRV β +) was sorted using BDFACSAria™. TCRV β + cells were selected among CD3+, CD4+ and CD8-cells and the purity was evaluated. The transduced My-La cells were sorted by selecting the transduced GFP+ cells.

Transendothelial migration assays

Five μ m and 8 μ m-porous transwells were used for the SC and for the My-La cell line respectively (ThinCert™, Greiner Bio-one). Transwells were coated with 0.2% gelatin solution during 1h at 37°C and 1.5x10⁵ HMVECs or HUVECs cells were seeded into transwells. After 2 days, chemoattractants were added in the lower chambers: SDF-1 (100 ng/mL) of CCL19/21 (100 ng/mL). Then, 5x10⁵ sorted Sézary or My-La cells were pre-treated 30 min with

respectively 30 or 15 $\mu\text{g/mL}$ anti-CLA mAb (HECA-452, Biolegend) or its isotype control (RTK2118) or no treated (control condition), and seed in upper chamber. After 3h of incubation at 37°C, cells in the lower chamber were counted and the percentage of migrating cells was calculated.

Ethics Statement

Animal experiments were performed in level 2 animal facilities, Bordeaux University, in accordance with national institutional guidelines and with the agreement of the local Ethic Committee on Animal Experiments CEEA50 of Bordeaux (agreement number APAFIS#29572-2021020517035043 v4).

Intrahepatic Mouse Model

A total of 1×10^6 cells were intrahepatically xenografted in male NSG immunodeficient mice (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl/SzJ}) aged 8 to 12 weeks under 2.5% isoflurane anesthesia (Belamont, Piramal Healthcare, Northumberland, UK), as previously described (Andrique et al., 2016). Mice were clinically monitored for 2 weeks with a global surveillance of animal health. At 2 weeks after engraftment, mice were sacrificed, body and liver weights were measured, and liver/body ratio was then determined. Liver and kidneys were fixed in 4% formaldehyde (MERCK Millipore, VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France) for immunohistochemistry (IHC).

Immunohistochemistry (IHC)

Immunohistochemistry was performed as described previously (Andrique et al., 2016) and in the Supplementary data.

Statistical analysis

The statistical analysis was done using the Prism software (GraphPad Software V9, Inc, La Jolla, CA, USA). The unpaired Mann-Whitney test was used to analyze migration and survival assays with Spearman correlation test. Significance was defined as *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Table Supplemental
Table S1

Patients	Gender	Age at SS diagnosis (years)	Stage at analysis	% of circulating CLA+ cells among SS cell compartment	RFI
Patient 1	M	45	T4N3M1B2	55	72
Patient 2	F	51	T4N3MOB2	8	60
Patient 3	M	63	T4N0MOB2	29	59
Patient 4	M	66	T4N3MOB2	35	54
Patient 5	F	81	T4N0MOB2	98	340
Patient 6	F	81	T4N3MOB2	0	155
Patient 7	F	80	T4N0MOB2	97	295
Patient 8	F	73	T4N0MOB2	12	45
Patient 9	M	64	T4N0MOB2	57	99
Patient 10	F	60	T4N1MOB2	52	27
Patient 11	F	77	T4N0MOB2	28	88
Patient 12	F	57	T4N0MOB2	46	21
Patient 13	F	79	T4N0MOB2	68	31
Patient 14	M	51	T4N0MOB2	36	28
Patient 15	F	89	T4N0MOB2	85	587
Patient 16	M	82	T4N1MOB2	90	440
Patient 17	M	57	T4N0MOB2	77	58
Patient 18	F	77	T2N0MOB1	91	216
Patient 19	F	64	T4N0MOB1	13	28
Patient 20	F	81	T4N0MOB1	14	55
Patient 21	F	70	T2N0MOB2	53	36
Patient 22	F	87	T4N0MOB2	39	52
Patient 23	F	63	T4N0MOB2	18	42
Patient 25	M	64	T4N3MOB2	53	56
Patient 27	M	59	T4N3MOB2	32	19
Patient 28	F	87	T2bN0MOB2	13	52
Patient 29	F	79	T1N0MOB2	20	47
Patient 30	F	93	T4N1MOB2	36	36
Patient 32	F	60	T4N3MOB2	53	176
Patient 33	M	66	T4NXMOB2	30	43
Patient 34	M	64	T4N3MOB2	36	85
Patient 35	M	29	T4N3MOB2	53	248
Patient 36	M	67	T4N1MOB2	51	119
Patient 38	F	61	T4N0MOB1	21	555
Patient 39	M	62	T4N0MOB2	45	631
Patient 40	F	93	T2aN0MOB2	98	362
Median				42	59
Moyenne				45	145

Table S1: Patients' characteristics and percentage of CLA expression on patients' circulating SS cells.

M = Male, F = Female. TNMB status: T (Tumor), N (Node), M (Metastasis), B (Blood), RFI = Relative fluorescence intensity.

Table Supplemental
Table S2

	% CLA+ cells	RFI
MyLA	100	93
CD3+CD4+ healthy donors cells	33	34
	27	33
	33	35

Table S2: My-La cell line and CD3+CD4+ healthy donors cells percentage of CLA expression and RFI.

RFI = Relative fluorescence intensity.

Figure Supplementary Data

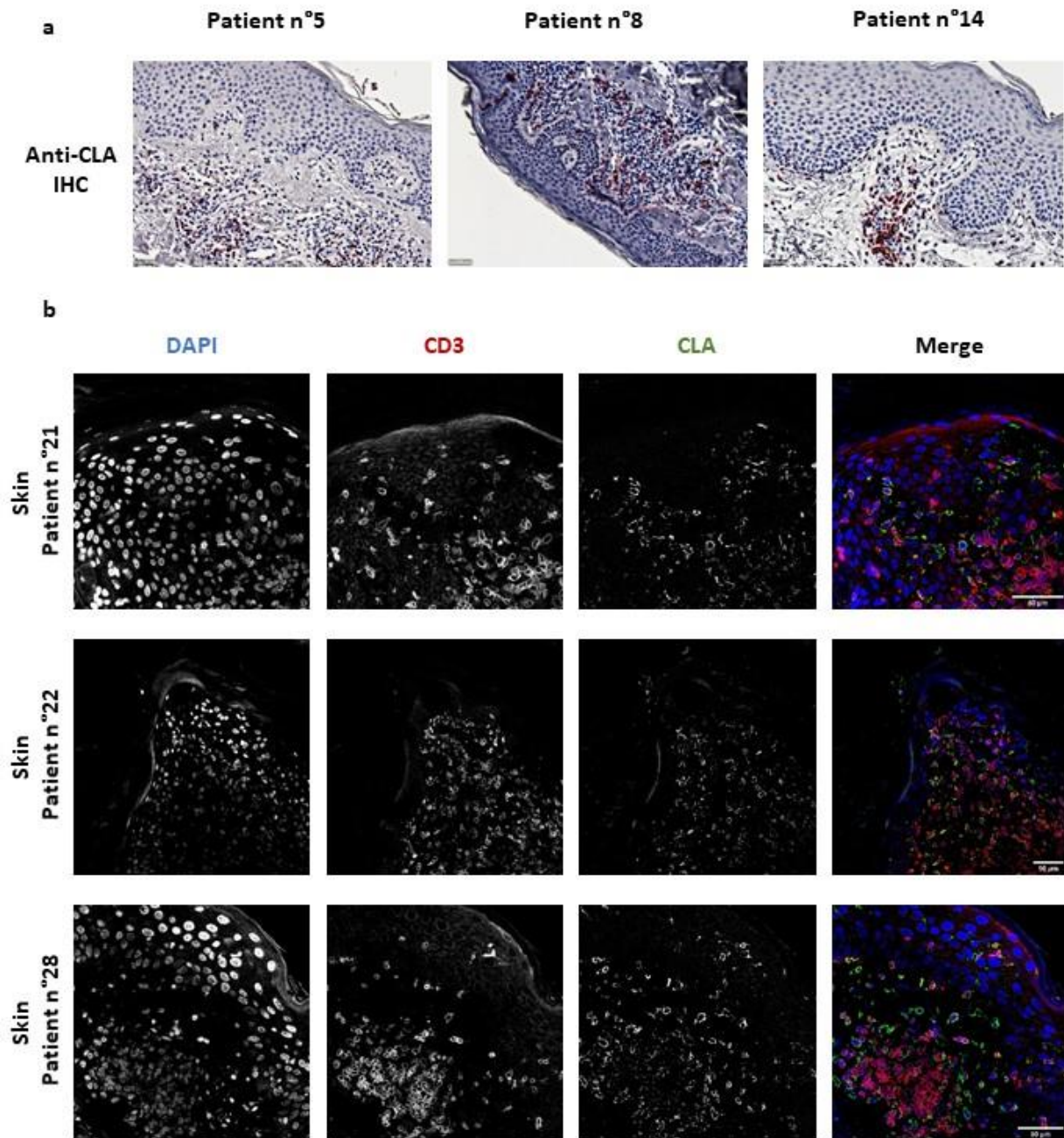


Figure S1: CLA+ T cells in SS patients' skin biopsies.

(a) IHC showing expression of CLA molecule in SS patient skin biopsies. Example of Immunohistochemistry (IHC) using anti-CLA mAb (HECA+452) on skin sections of 3 other SS patients. (b) Immunofluorescence showing expression of CLA molecule by skin SS cells. Example of immunofluorescence using anti-CLA (green), anti-CD3 (red) antibodies and DAPI (blue) on skin sections of SS patients.

Figure Supplementary Data

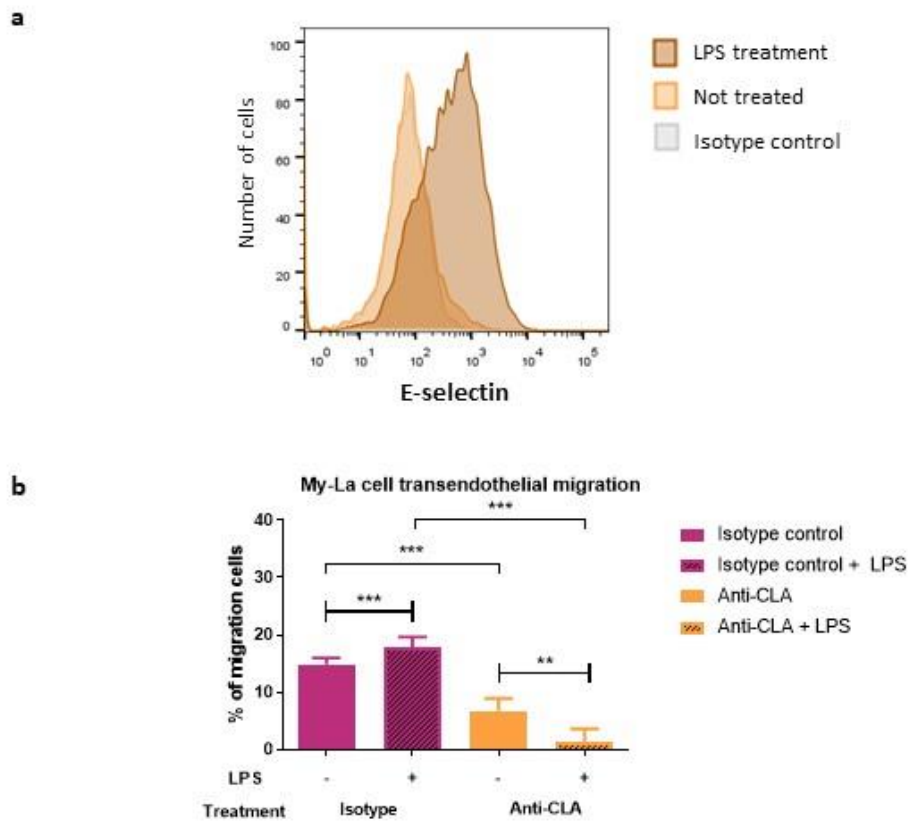


Figure S2 : Anti-CLA mAb inhibits CTCL cells trans-endothelial migration.

(a) E-selectin expression. E-selectin expression on HUVECs cells treated or not with LPS for 8 hours.

(b) Percentage of migration of CTCL cells treated with anti-CLA mAb or isotype control. My-La cells were incubated with an anti-CLA mAb (HECA-452 - 15 $\mu\text{g/ml}$) or isotype control in a Transwell[®] system coated with HUVECs pre-treated or not with LPS for 8 hours. 3 hours later after induction of migration by addition of SDF1 α (100ng/ml) and/or CCL19/21 (100ng/ml) in the lower chamber, migrating cells were harvested and counted. Histogram represents percentage of migration of My-La cells treated with anti-CLA mAb or isotype control. Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. ** $p < 0.001$. *** $p < 0.0001$

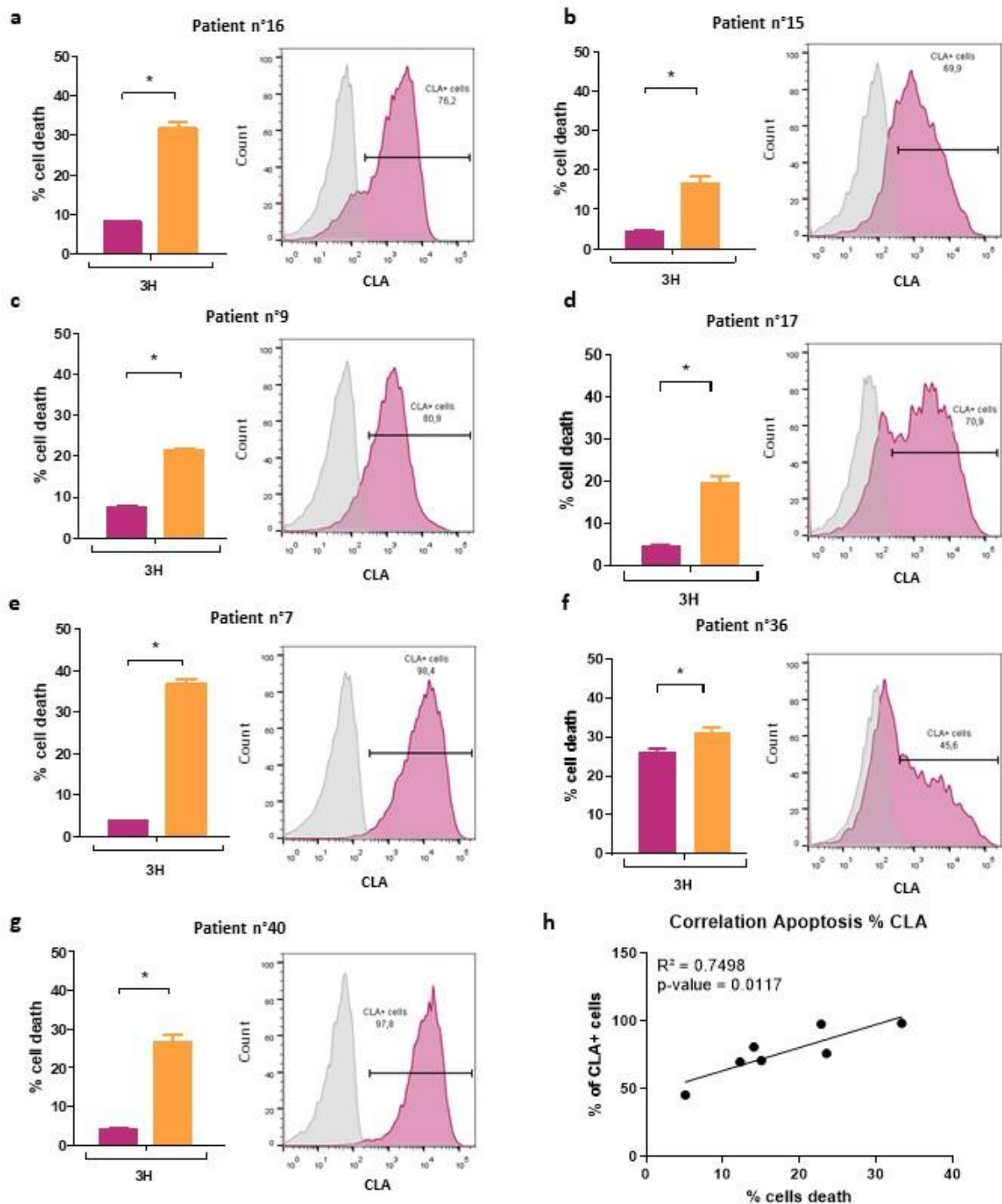


Figure S3: Anti-CLA mAb alters survival of CTCL cells.

(a-g). Percentage of CLA+ cells and evaluation of cell death of CTCL cells treated with anti-CLA or isotype control. SCs from patients were incubated with an anti-CLA mAb (HECA-452) or isotype control for 3h. Percentage of apoptotic cells (Annexin V+) and necrotic cells (Hoechst+, Annexin V-) were determined by flow cytometry. **(h)** CLA expression is correlated with cell death. Correlation between the percentage of CLA+ cells and cell death induced after treatment with an anti-CLA mAb (HECA-452). Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. * $p < 0.05$.

Figure Supplementary Data

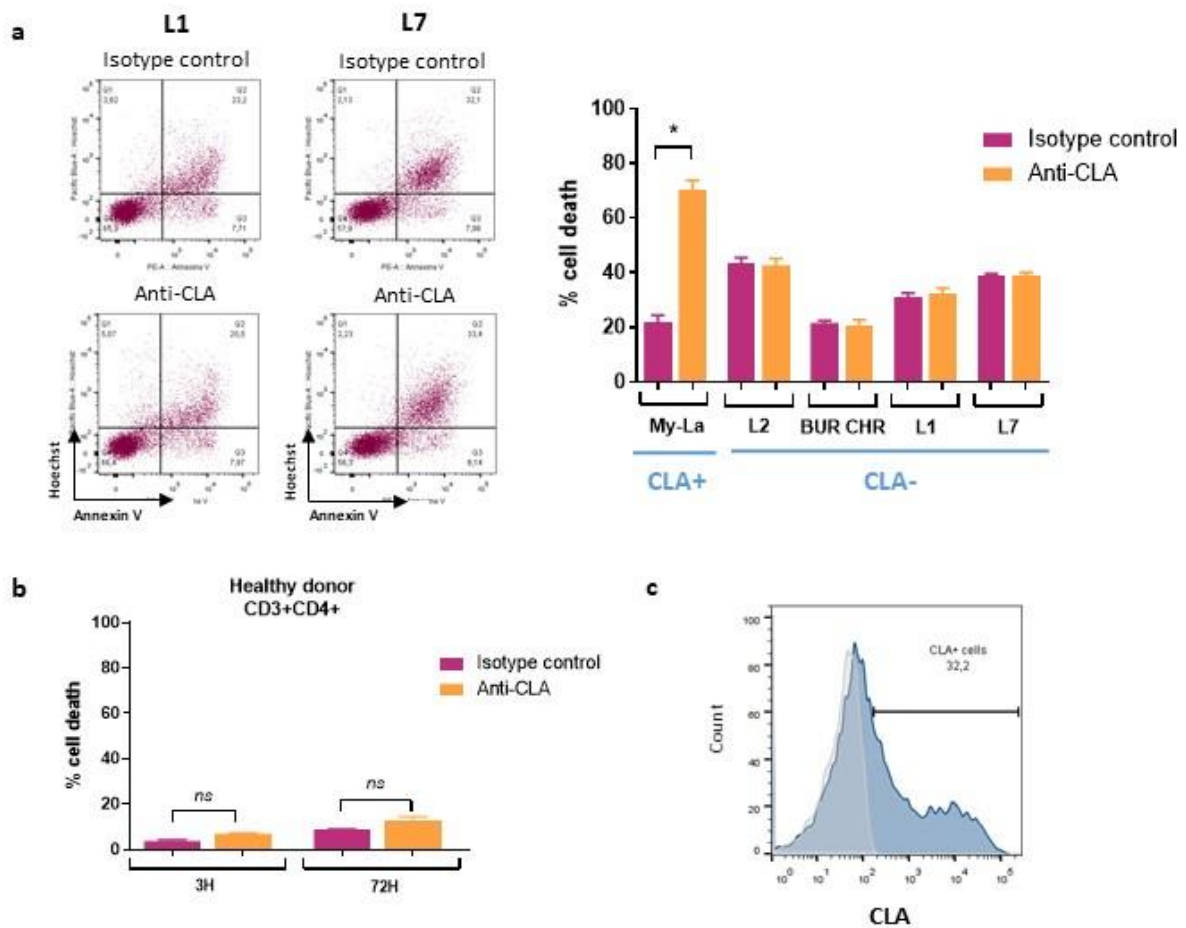
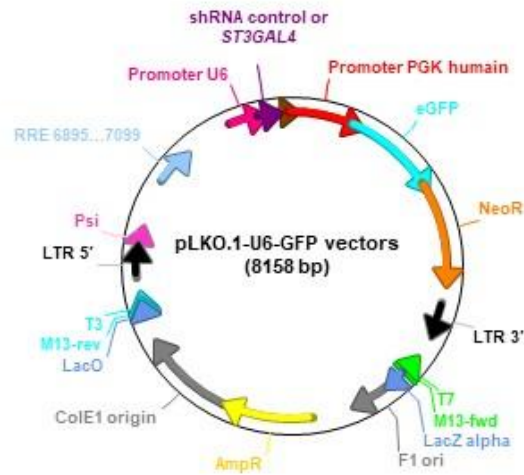


Figure S4 : Anti-CLA mAb has no effect on CLA-negative CTCL cell line survival and CLA-positive healthy donor cells.

(a,b) Percentage of cell death of CTCL cell lines **(a)** or healthy donors CD3+CD4+ **(b)** treated with anti-CLA mAb or isotype control. Cells were incubated with an anti-CLA mAb (HECA-452) or isotype control for 3 hours or 72h with a treatment every 24h. Percentage of apoptotic cells (Annexin V+) and necrotic cells (Hoechst+, Annexin V-) were studied by flow cytometry (Left). Quantification of My-La cell death (% of apoptotic and necrotic cells) after 3 hours of treatment (Right) **(c)** Immunophenotyping of tumor cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) prepared from healthy donors analyzed by flow cytometry to determine the percentage of CD3+CD4+CLA+ T cells. Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. * $p < 0.05$.

Figure Supplementary Data

a



b

shRNA <i>ST3Gal-4</i> exon 5 (5'3') <i>Reference</i> <i>ENST00000534083.5</i>	<p style="text-align: center;">Sense shRNA</p> <p style="text-align: center;">anti-sense shRNA</p> <p>CCGGCCTGCGGCTTGAGGATTATTctcgagAAATAATCCTCAAGCCGCAGGtttttG</p>
shRNA <i>ST3Gal-4</i> exon 8 (5'3') <i>Reference</i> <i>ENST00000534083.5</i>	<p style="text-align: center;">Sense shRNA</p> <p style="text-align: center;">anti-sense shRNA</p> <p>CCGGGCAATGGACTTCCACTGGATTctcgagAATCCAGTGAAGTCCATTGCtttttG</p>
<i>ST3Gal-4</i> primers	<p><i>ST3GAL4-F</i> : 5'-CAAGACGCCATCTGCTTACGA-3'</p> <p><i>ST3GAL4-R</i> : 5'-GCACCTGAGGCTCTGGATGTT-3'</p>

Figure S5 : Lentiviral vector construct.

(a) pLKO.1-U6-GFP vectors. pLKO.1-U6-GFP vectors are encoding a Green Fluorescent Protein (GFP) reporter and a control shRNA (shControl) or shRNAs targeting exon 5 (shex5) or exon 8 (shex8) of *shST3Gal-4* transcripts.

(b) Sequences of sense-strand oligonucleotides used for cloning of *ST3Gal-4* ex5 and *ST3Gal-4* ex8 shRNA vectors, as well as forward and reverse primers used for quantitative RT-PCR analysis of *ST3Gal-4* transcript levels.

Figure Supplementary Data

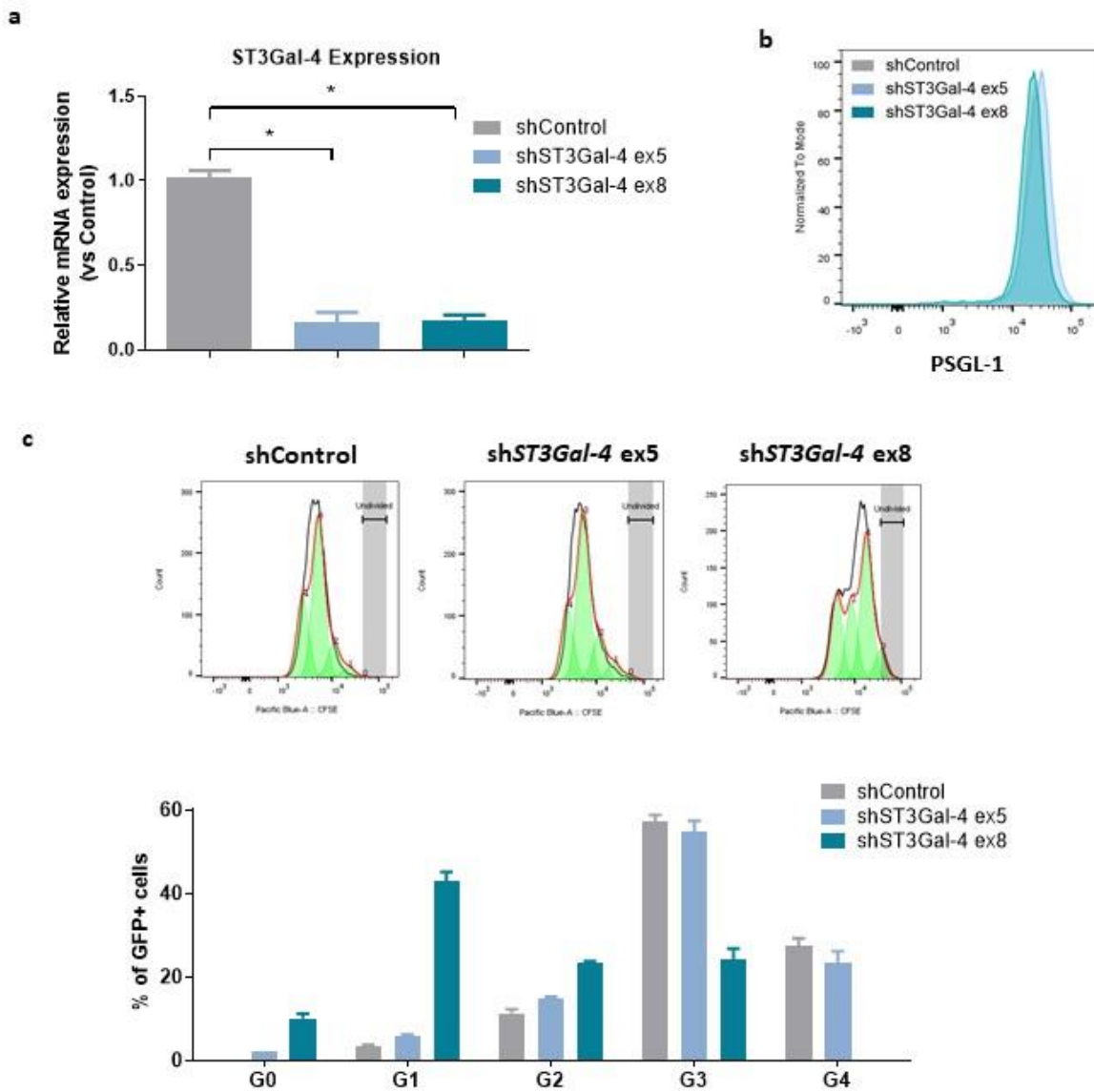


Figure S6: Decreasing cell surface CLA expression by *ST3Gal-4* gene silencing impairs cell proliferation and has no effect on PSGL-1 expression.

(a) Relative mRNA expression of *ST3Gal-4*. Evaluation of the relative mRNA expression of *ST3Gal-4* in My-La cells transduced with the lentivirus encoding a Control shRNA or shRNA targeting exon 5 or exon 8 of *ST3Gal-4* gene transcripts.

(b) PSGL-1 expression of CTCL cells after *ST3Gal-4* inhibition. Evaluation of the PSGL-1 expression after transduction with lentivirus encoding a Control shRNA or shRNA targeting exon 5 or exon 8 of *ST3Gal-4* transcripts.

(c) Effect of CLA inhibition by *ST3Gal-4* gene silencing on proliferation was evaluated on My-La cells CFSE+. Intensity of CFSE staining was evaluated by FACS after 3 days in culture.

Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. *p<0.05

ORCIDs

Sara PERU: 0000-0002-1763-2413

Martina PROCHAZKOVA-CARLOTTI: 0000-0002-7719-7679

Floriane CHERRIER: 0000-0002-4181-0283

Joanne VELAZQUEZ: 0000-0002-1346-3608

Elodie RICHARD: 0000-0003-3778-1210

Yamina IDRISSE: 0000-0002-8654-5380

David CAPPELLEN: 0000-0002-9634-2595

Lamia AZZI-MARTIN: 0000-0002-5575-2539

Anne PHAM-LEDARD: 0000-0003-2960-6084

Marie BEYLOT-BARRY: 0000-0001-6150-1229

Jean-Philippe MERLIO: 0000-0002-0305-0850

Sandrine POGGIO: 0000-0001-8783-0709

CONFLICTS OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the team of the Onco-Dermatology and Pathology Tumor Biobank Departments (Bordeaux University Hospital) for helping us in providing fresh and fixed patients samples but also the patients who agreed with informed consent to the research. Mouse experiments were greatly facilitated by Benoît Rousseau and Julien Izotte from the A2 Animal facility at Bordeaux University. We thank the vectorology platform Vect'UB for providing lentiviral particles and for technical support, CNRS UMS3427, INSERM US005, Univ. Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France. We thank the TBM Core cytometry platform (Atika Zouine and Vincent Pitard) for technical assistance (CNRS UMS3427, INSERM UMS005).

AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

SP1, MPC and SP2 designed the experimental research. SP1, SP2, MPC, FC, JV, YI, LAM and ER performed experiments and analyzed data. SP1, SP2 and JPM wrote the paper. DC performed lentivector design and participated to discussion. MBB and APL conducted the clinical research reviewing diagnosis, providing patient samples with clinical data, participated to discussion and reviewed the paper.

GRANT SUPPORTS

This work was supported by INSERM, Bordeaux University and CHU Bordeaux institutions and grants from the Ligue Régionale Contre le Cancer (Comités de Gironde and Charentes) and the Société Française de Dermatologie.

REFERENCES

- Andrique L, Poglio S, Prochazkova-Carlotti M, Kadin ME, Giese A, Idrissi Y, et al. Intrahepatic Xenograft of Cutaneous T-Cell Lymphoma Cell Lines: A Useful Model for Rapid Biological and Therapeutic Evaluation. *Am J Pathol.* 2016 Jul;186(7):1775–85.
- Armstrong F, Brunet de la Grange P, Gerby B, Rouyez M-C, Calvo J, Fontenay M, et al. NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood.* 2009 Feb 19;113(8):1730–40.
- Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK, Picker LJ, Butcher EC. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med.* 1991 Dec 1;174(6):1461-6.
- Brouwer IJ, Out-Luiting JJ, Vermeer MH, Tensen CP. Cucurbitacin E and I target the JAK/STAT pathway and induce apoptosis in Sézary cells. *Biochem Biophys Rep.* 2020 Oct 15;24:100832.
- Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood.* 2010 Aug 5;116(5):767–71.
- Chang D-K, Sui J, Geng S, Muvaffak A, Bai M, Fuhlbrigge RC, et al. Humanization of an Anti-CCR4 Antibody That Kills Cutaneous T-Cell Lymphoma Cells and Abrogates Suppression by T-Regulatory Cells. *Mol Cancer Ther.* 2012 Nov 1;11(11):2451–61.
- Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K, Dowgiert RK, et al. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J Immunol.* 2006 Apr 1;176(7):4431-9.
- Cristofolletti C, Bresin A, Picozza M, Picchio MC, Monzo F, Helmer Citterich M, et al. Blood and skin-derived Sezary cells: differences in proliferation-index, activation of PI3K/AKT/mTORC1 pathway and its prognostic relevance. *Leukemia.* 2019 May;33(5):1231-1242.
- De Boer OJ, Horst E, Pals ST, Bos JD, Das PK. Functional evidence that the HECA-452 antigen is involved in the adhesion of human neutrophils and lymphocytes to tumour necrosis factor-alpha-stimulated endothelial cells. *Immunology.* 1994 Mar;81(3):359–65.
- de Masson A, Beylot-Barry M, Bouaziz J-D, de Latour RP, Aubin F, Garciaz S, et al. Allogeneic stem cell transplantation for advanced cutaneous T-cell lymphomas: a study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and French Study Group on Cutaneous Lymphomas. *Haematologica.* 2014 Mar 1;99(3):527–34.
- Fargnoli M-C, Edelson R, Berger C, Chimenti S, Couture C, Mustelin T, et al. Diminished TCR signaling in cutaneous T cell lymphoma is associated with decreased activities of Zap70, Syk and membrane-associated Csk. *Leukemia.* 1997 Aug;11(8):1338–46.

- Ferran M, Romeu ER, Rincón C, Sagristà M, Giménez Arnau AM, Celada A, et al. Circulating CLA+ T lymphocytes as peripheral cell biomarkers in T-cell-mediated skin diseases. *Exp Dermatol*. 2013 Jul;22(7):439–42.
- Fink-Puches R, Zenahlik P, Bäck B, Smolle J, Kerl H, Cerroni L. Primary cutaneous lymphomas: applicability of current classification schemes (European Organization for Research and Treatment of Cancer, World Health Organization) based on clinicopathologic features observed in a large group of patients. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):800–5.
- Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature*. 1997 Oct 30;389(6654):978–81.
- Guerrero PE, Miró L, Wong BS, Massaguer A, Martínez-Bosch N, Llorens R, et al. Knockdown of α 2,3-Sialyltransferases Impairs Pancreatic Cancer Cell Migration, Invasion and E-selectin-Dependent Adhesion. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 28;21(17):6239.
- Herrera A, Cheng A, Mimitou EP, Seffens A, George DD, Bar-Natan M, et al. Multimodal single-cell analysis of cutaneous T cell lymphoma reveals distinct sub-clonal tissue-dependent signatures. *Blood*. 2021 Jul 7;blood.2020009346.
- Kamarashev J, Burg G, Kempf W, Schmid MH, Dummer R. Comparative analysis of histological and immunohistological features in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *J Cutan Pathol*. 1998 Sep;25(8):407–12.
- Kasamon YL, Chen H, de Claro RA, Nie L, Ye J, Blumenthal GM et al. FDA Approval Summary: Mogamulizumab-kpkc for Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Clin Cancer Res*. 2019 Dec 15;25(24):7275-7280.
- Kim YH, Bagot M, Pinter-Brown L, Rook AH, Porcu P, Horwitz SM, et al. Mogamulizumab versus vorinostat in previously treated cutaneous T-cell lymphoma (MAVORIC): an international, open-label, randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Sep;19(9):1192–204.
- Klemke C-D, Brenner D, Weiß E-M, Schmidt M, Leverkus M, Gülow K, et al. Lack of T-Cell Receptor-Induced Signaling Is Crucial for CD95 Ligand Up-regulation and Protects Cutaneous T-Cell Lymphoma Cells from Activation-Induced Cell Death. *Cancer Res*. 2009 May 15;69(10):4175–83.
- Kummitha CM, Shirure VS, Delgadillo LF, Deosarkar SP, Tees DFJ, Burdick MM, et al. HECA-452 is a non-function blocking antibody for isolated sialyl Lewis x adhesion to endothelial expressed E-selectin under flow conditions. *J Immunol Methods*. 2012 Oct;384(1–2):43–50.
- Maverakis E, Kim K, Shimoda M, Gershwin ME, Patel F, Wilken R, et al. Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review. *J Autoimmun*. 2015 Feb;57:1–13.

- Mondal N, Buffone A, Stolfa G, Antonopoulos A, Lau JTY, Haslam SM, et al. ST3Gal-4 is the primary sialyltransferase regulating the synthesis of E-, P-, and L-selectin ligands on human myeloid leukocytes. *Blood*. 2015 Jan 22;125(4):687–96.
- Natoni A, Farrell ML, Harris S, Falank C, Kirkham-McCarthy L, Macauley MS, et al. Sialyltransferase inhibition leads to inhibition of tumor cell interactions with E-selectin, VCAM1, and MADCAM1, and improves survival in a human multiple myeloma mouse model. *Haematologica*. 2020 Jan 31;105(2):457–467.
- Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*. 2007 Sep 15;110(6):1713–22.
- Picker LJ, Michie SA, Rott LS, Butcher EC. A unique phenotype of skin-associated lymphocyte in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *Am J Pathol*. 1990 May;136(5):1053–68.
- Poglio S, Prochazkova-Carlotti M, Cherrier F, Gros A, Laharanne E, Pham-Ledard A, et al. Xenograft and cell culture models of Sézary syndrome reveal cell of origin diversity and subclonal heterogeneity. *Leukemia*. 2021 Jun;35(6):1696–1709.
- Ramelyte E, Dummer R, Guenova E. Investigative drugs for the treatment of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL): an update. *Expert Opin Investig Drugs*. 2019 Sep;28(9):799–809.
- Roelens M, Delord M, Ram-Wolff C, Marie-Cardine A, Alberdi A, Maki G, et al. Circulating and skin-derived Sézary cells: clonal but with phenotypic plasticity. *Blood*. 2017 Sep 21;130(12):1468–71.
- Seto AG, Beatty X, Lynch JM, Hermreck M, Tetzlaff M, Duvic M, Jackson AL. Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2018 Nov;183(3):428–444.
- Silic-Benussi M, Saponeri A, Michelotto A, Russo I, Colombo A, Pelizzo MG, et al. Near infrared photoimmunotherapy targeting the cutaneous lymphocyte antigen for mycosis fungoides. *Expert Opin Biol Ther*. 2021 Jul 3;21(7):977–81.
- Templeton K, Ramos M, Rose J, Le B, Zhou Q, Cressman A, et al. Mesenchymal Stromal Cells Regulate Sialylations of N-Glycans, Affecting Cell Migration and Survival. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 26;22(13):6868.
- Tinoco R, Otero DC, Takahashi AA, Bradley LM. PSGL-1: A New Player in the Immune Checkpoint Landscape. *Trends Immunol*. 2017 May;38(5):323–35.
- Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management: Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Am J Hematol*. 2016 Jan;91(1):151–65.

SUPPLEMENTAL MATERIAL AND METHODS

CTCL cell lines' culture

My-La cell line derived from a T-MF (kindly gifted by Dr. Kalfot, Aarhus University, Denmark) (Kaltoft et al. 1992). Cells were cultured in RPMI medium (with 10% FBS and 1% Penicillin/Streptomycin) at 37°C, in an atmosphere with 5% CO₂, in an incubator.

Endothelial cells' culture

We used HMVECs derived from the dermis and HUVECs derived from the umbilical vein (LONZA, Bale, Switzerland). Cells were cultured in EBM-2 (LONZA, Bale, Switzerland) at 37°C, in an atmosphere with 5% CO₂, in an incubator. All the compounds used to maintain the cells were those recommended by the cell lines provider (LONZA, Bale, Switzerland).

Transduction of cells

pLKO.1-U6-GFP vectors encoding a Green Fluorescent Protein (GFP) reporter and a control shRNA (shControl) or shRNA targeting exon 5 (sh*ST3Gal-4* ex5) or exon 8 (sh*ST3Gal-4* ex8) of *ST3Gal-4* transcripts were produced in our laboratory (Supplementary Figure S5). The lentiviral production was done by the Vect[®]UB platform (TBM Core, INSERM UMS 005). The My-La line was transduced at a Multiplicity Of Infection (MOI) of 10.

RTqPCR

Total RNA from shControl, sh*ST3Gal-4* ex5 and ex8 transduced cells was extracted using the Direct-zol RNA MiniPrep (ZYMO Research, Ozyme) as recommended by the manufacturer. 200 ng of RNA were used to generate cDNA using the SuperScript II reverse transcriptase kit (Invitrogen, France). qPCR on the *ST3Gal4* gene was performed using Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dttP Blue (Eurogentec, France) with the following primers, forward : 5'-CAAGACGCCATCTGCTTACGA-3', and reverse: 5'-GCACCTGAGGCTCTGGATGTT-3'. The Stratagene Mx3005P system (Agilent Technologies, USA) was used to perform the RTqPCR. Gene expression was normalized to the expression of the housekeeping gene *TBP* (TATA-Box Binding Protein) (forward primer : 5'-CACGAACCACGGCACTGATT-3' and reverse primer: 5'-TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGA-3'). Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ according to the method described by Livak and Schmittgen (2001).

Proliferation assays

Proliferation assays were performed using CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester (Cell Trace CFSE Proliferation kit, Molecular Probes)-labeled on My-La cell line according to the manufacturer recommendations'. My-La shControl, sh*ST3Gal-4* ex5 or sh*ST3Gal-4* ex8 transduced cells were cultured in their medium for 3 days and acquisition was performed with a Canto II cytometer (BD, Biosciences, New Jersey, USA) at the UB'Facility platform (TransBiomed Core facility, Bordeaux University). FlowJo software (BD, Biosciences, New Jersey, USA) was used for data interpretation.

Apoptosis-necrosis assay

Apoptosis-necrosis assay was performed on SCs, My-La cell line or healthy donors CD4+ T cells. 1×10^5 cells were cultured in 24 well-plate in their medium and treated with an anti-CLA mAb or its isotype control (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively) for 3 or 72 hours with a treatment every 24h. Data were obtained from the mean of replicates for each condition. The percentage of total dead cells was evaluated by FACS after staining with Annexin V (APC) and Hoechst as recommended by the manufacturer. Annexin V- Hoechst + cells were considered as necrotic cells, early apoptotic cells were Annexin V + and Hoechst -, and late apoptotic cells were Annexin V + and Hoechst +. Apoptosis was assessed by measuring the activities of caspases-3/7, caspase-8, caspase-9 by FACS using the FAM-FLICA detection kit according to the manufacturer's recommendations (Biorad). Apoptosis was also detected by the loss of mitochondrial membrane potential using Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) dye. After treatment, cells were incubated with 200nM TMRM for 30min at 37°C and the fluorescence measured by flow cytometry as described above. The loss of the fluorescence corresponds to an increase mitochondria permeability since TMRM is a fluorescent lipophilic cation able to accumulate in active mitochondria with intact membrane potentials.

Immunohistochemistry (IHC)

Mayer's hematoxylin labelling, human leukocyte antigen (HLA-ABC - 1:100 of Antibody 70328; Abcam, Paris, France) and CLA (HECA-452, 1:100 of Antibody; Biolegend) IHC were performed on mice organ or human SS skin biopsy sections (3 μm thick of formalin-fixed, paraffin-embedded organs). A secondary horseradish peroxidase (HRP)-labelled ImmPRESS anti-mouse kit (Vector laboratories) and the Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako) were used to reveal HLA-ABC-positive cells. Slides were analyzed using Panoramic Scan (3DHISTECH, Budapest, Hungary) and Panoramic Viewer software version 1.15.4 (3DHISTECH) or using microscope LEICA DMR coupled with a camera NIKON DS-FI2 and

NIS BR imaging software version 4.0 (Nikon, Champigny sur Marne, France). Quantitative evaluation of HLA-ABC labeling was performed using ImageJ image analysis software version 1.48 (Java) or HALO image analysis software (Indica Labs).

Immunofluorescence (IF)

IF were performed on human SS skin biopsies sections (3 µm thick of formalin-fixed, paraffin-embedded organs). After blocking, cells were incubated with a rabbit anti-CD3 antibody (polyclonal, 1:200, A0452, Agilent) and rat anti-CLA antibody (HECA-452, 1:50 of Antibody; Biolegend) and with a fluorescent-labelled secondary anti-rabbit Alexa-594-labelled (goat, 1:400, A32740, Thermo Fischer Scientific) and anti-rat Alexa-488-labelled (goat, 1:400, A11006, Thermo Fischer Scientific). The coverslips were mounted on glass slides using an antifade mounting medium with DAPI (VECTASHIELD®, Vector Laboratories). Images and scans were done using a microscope ZEISS Axiomager Z2 coupled with MetaSystems imaging software or Metafer scanning system (MetaSystems, Altlussheim, Germany). The quantitative evaluation of CLA+ area labeling/total tissue area was performed using HALO image analysis software (Indica Labs).

REFERENCES

- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods San Diego Calif.* **25**, 402–408 (2001).
- Kaltoft K, Bisballe S, Dyrberg T, Boel E, Rasmussen PB, Thestrup-Pedersen K. Establishment of two continuous T-cell strains from a single plaque of a patient with mycosis fungoides. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1992 Mar;28A(3 Pt 1):161-7. doi: 10.1007/BF02631086. PMID: 1582990.

II) Caractérisation de l'expression du CLA à la surface des LT tumoraux dans les échantillons de sang de patients et corrélation aux données cliniques

A) Le pourcentage de LT mémoires CLA+ dans les échantillons de sang est un facteur pronostique

Dans un second temps, nous avons corrélé l'expression du CLA à la surface des cellules T clonales tumorales aux données cliniques des patients. Grâce au département d'Onco-dermatologie du CHU de Bordeaux, nous avons accès à des échantillons séquentiels de sang de patients atteints de SS dans le cadre de la prise en charge de routine. Afin de diminuer les biais sur notre étude, nous avons caractérisé par cytométrie en flux les cellules des échantillons obtenus lors du diagnostic ou à une date proche de celui-ci. Pour cela, le pourcentage de LT CLA+ a été déterminé dans la population clonale tumorale (TCRV β +CD3+), comme vu précédemment dans l'article, ou bien dans la population mémoire clonale tumorale (TCRV β +CD3+CD45RO+) (Figure 26A). Le pourcentage de LT CLA+ ou LT mémoires CLA+ est hétérogène en fonction des patients, du traitement et/ou du stade de la maladie (Figure 26B). Deux groupes de patients ont été définis en fonction de ce pourcentage (% > et < à la médiane) (Figure 26C). Le pourcentage de LT CLA+ circulants n'est pas corrélié au pronostic (Figure 26C gauche). Le premier groupe dont le pourcentage de LT mémoire CLA+ est en dessous de la médiane est associé à un mauvais pronostic (Figure 26C droite). Le faible taux de LT mémoire CLA+ chez 5 patients sur 14 dans ce groupe est associé à une atteinte ganglionnaire (stade N1 ou N3), suggérant que les cellules de LTCP ne pouvant pas être adressées à la peau pourraient gagner les ganglions, y proliférer et disséminer dans les différents tissus diminuant ainsi la survie des patients (Tableau 5). Malgré un meilleur pronostic, les patients ayant un pourcentage élevé de LT mémoires CLA+ ont une mauvaise qualité de vie et meurent du SS environ 10 à 16 ans après le diagnostic malgré les traitements.

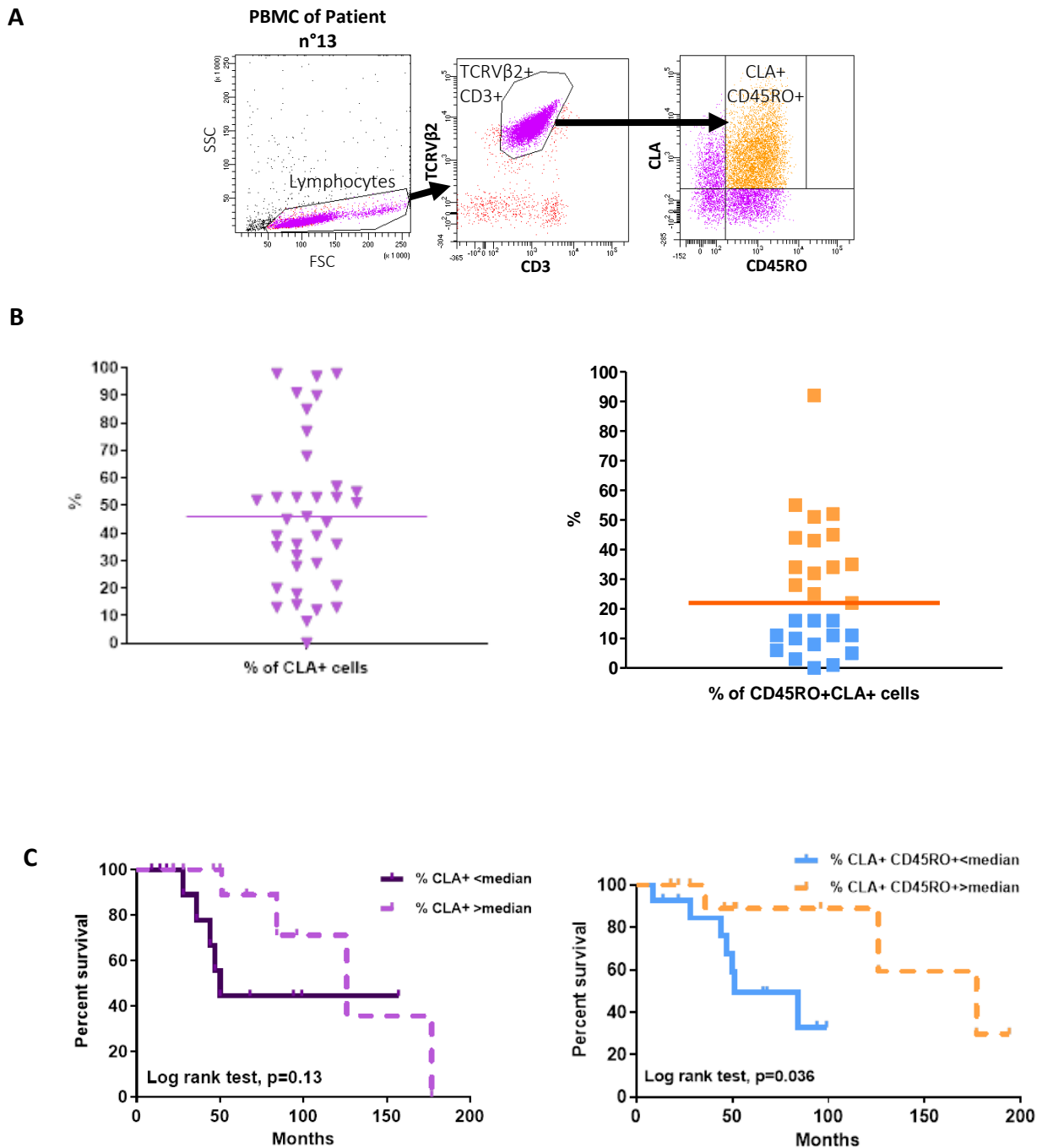


Figure 26 : Le pourcentage de LT mémoires CLA+ dans les échantillons de sang SS est un facteur pronostique

A. Immunophénotypage des cellules tumorales. Des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) préparées à partir de 27 échantillons de patients atteints de SS ont été analysées par cytométrie en flux pour déterminer le pourcentage de LT mémoires CLA+ (CD45RO+CLA+) dans la population tumorale (TCRVβ_{tumoral}+CD3+). Exemple de stratégie de caractérisation pour le patient 13. B. Pourcentage de LT tumoraux CLA+ et LT tumoraux mémoires CLA+. Deux groupes de patients ont été définis selon le pourcentage de cellules CD45RO+ CLA+. La médiane (barre horizontale) du pourcentage de chaque population discrimine un groupe avec un pourcentage élevé (> médiane, en bleu) et un avec un faible pourcentage (< médiane, en jaune). C. Courbe de Kaplan-Meier montrant l'impact pronostic du pourcentage de cellules CLA+ et CD45RO+CLA+ dans le sang sur la survie des patients.

	T	N	M	B
Patient 1	4	0	0	2
Patient 2	4	3	0	2
Patient 3	4	0	0	2
Patient 4	4	3	0	2
Patient 5	4	0	0	2
Patient 6	4	3	0	2
Patient 7	4	0	0	2
Patient 8	4	0	0	2
Patient 9	4	0	0	2
Patient 10	4	1	0	2
Patient 11	4	0	0	2
Patient 12	4	0	0	2
Patient 13	4	0	0	2
Patient 14	4	0	0	2
Patient 15	4	0	0	2
Patient 16	4	1	0	2
Patient 17	4	0	0	2
Patient 18	2	0	0	1
Patient 19	4	0	0	1
Patient 20	4	0	0	1
Patient 21	2	0	0	2
Patient 22	4	0	0	2
Patient 23	4	0	0	2
Patient 24	4	0	0	2
Patient 25	2	0	0	2
Patient 26	1	0	0	2
Patient 27	4	1	0	2

Tableau 5 : Stade TNBM des patients montrant un envahissement ganglionnaire

Deux groupes de patients ont été définis selon le pourcentage de cellules CD45RO+ CLA+. La médiane du pourcentage de chaque population discrimine un groupe avec un pourcentage élevé (> médiane, en **bleu**) et un avec un faible pourcentage (< médiane, en **jaune**).

B) Le pourcentage séquentiel de LT mémoires CLA+ dans le sang de patient évolue différemment au cours de la maladie

Nous avons accès à des échantillons du même patient dans le cadre du suivi. Pour déterminer si le pourcentage de LT mémoire CLA+ circulantes évolue au cours de la maladie et pour évaluer l'impact des traitements sur l'expression du CLA, nous avons étudié son expression à différents moments pendant 2 à 3 ans (Figure 27A). Pour 10 patients, ce pourcentage est stable (patient 3, 5, 6, 8, 9, 13, 14, 15, 17, 20). Pour les autres, le pourcentage de LT mémoire CLA+ évolue (patient 1, 4, 7, 10, 16, 18, 21, 22, 23). En effet, pour le patient 1, nous avons observé une diminution des LT mémoires CLA+ lors d'un traitement par un inhibiteur des histones déacétylases (Vorinostat) puis une augmentation lorsque le traitement était une polychimiothérapie CHOEP (cyclophosphamide, doxorubicine,

vincristine, prednisone et étoposide) (Figure 27B). Cependant, sur l'analyse globale des patients, nous n'avons pas trouvé de lien entre un traitement et le pourcentage de cellules CLA+. Le pourcentage de LT mémoires CLA+ évolue au cours de la maladie pour environ 50 % des échantillons de patients mais indépendamment du traitement et/ou du stade de la maladie. Nous devons analyser un plus grand nombre d'échantillons sur une plus longue période en séquentiel afin de pouvoir conclure sur l'effet éventuel d'un traitement ou de l'évolution de la maladie.

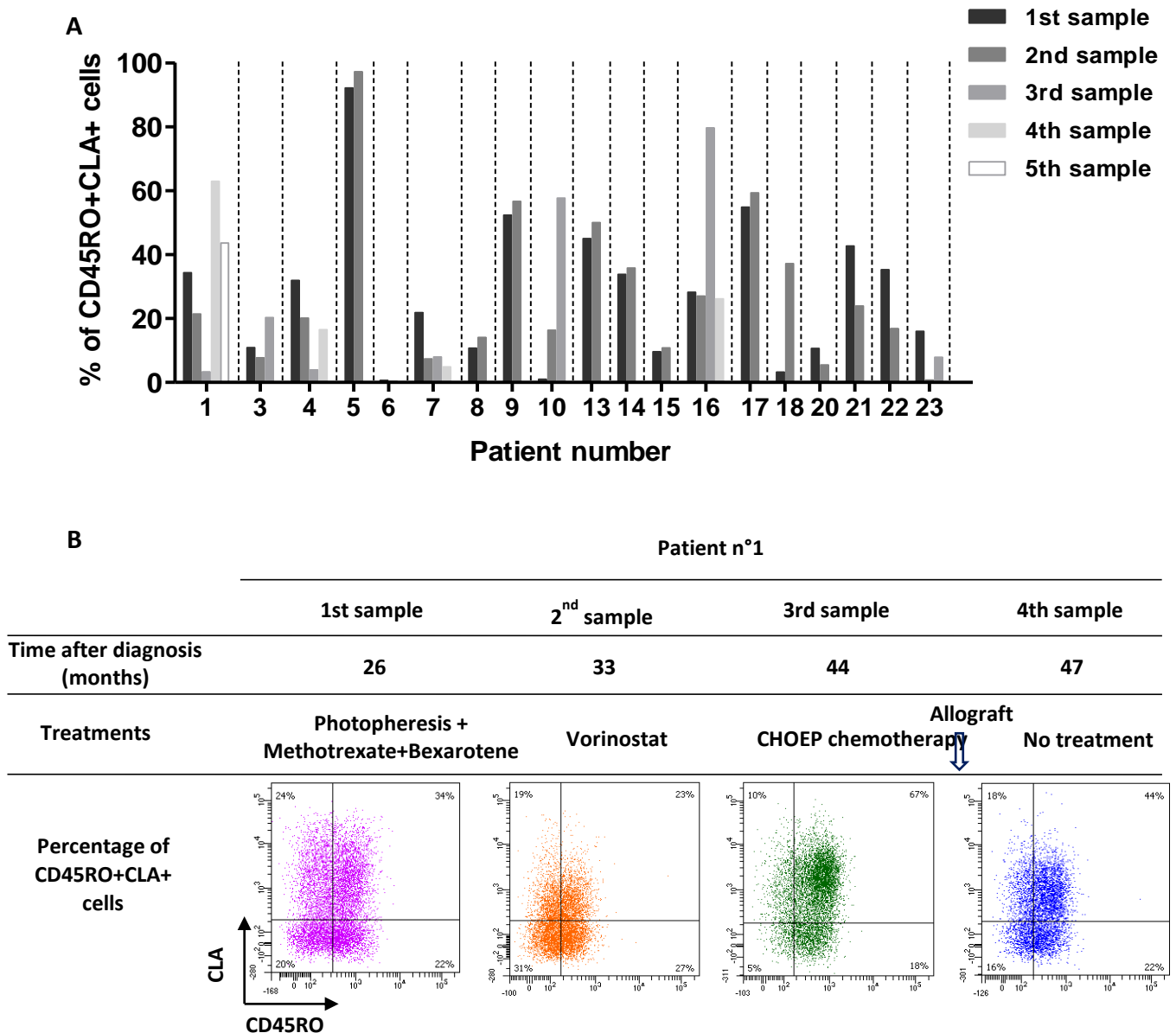


Figure 27 : Pourcentage séquentiel des LT mémoires CLA+ au cours de la maladie

A. Pourcentage séquentiel de LT CD45RO+CLA+ circulants pour 19 échantillons de patients. B. Exemple d'évolution du pourcentage des LT CD45RO+CLA+ au cours du SS pour le patient 1. 19 échantillons sanguins de patients atteints de SS ont été analysés par cytométrie en flux pour déterminer le pourcentage de LT CD45RO+CLA+ au sein de la population tumorale (TCRV β tumoral+CD3+). Exemple de stratégie de gating pour le patient 1.

Méthotrexate : agent chimiothérapeutique antifolique (inhibition des mitoses et de la synthèse d'ADN) ; Bexarotène : rétinoïde (induction de l'apoptose des cellules tumorales) ; Vorinostat : inhibiteur des histones déacétylases (iHDAC) (arrêt du cycle cellulaire et induction de la mort cellulaire) ; Chimiothérapie CHOEP : polychimiothérapie (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone et étoposide).

III) Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet de CLA sur la survie et la prolifération des cellules de lymphomes T cutanés primitifs

Par la suite, nous avons tenté de comprendre les mécanismes moléculaires qui pouvaient être impliqués dans l'effet de CLA sur la survie et la prolifération des cellules tumorales de patients atteints de SS et la lignée cellulaire My-La. PSGL-1, qui appartient à la même famille de molécule que CLA, joue un rôle dans la survie des LT normaux en inhibant les voies en aval du TCR. Nous avons donc émis l'hypothèse que CLA pourrait avoir des effets sur l'apoptose en étant impliquée dans les voies en aval du TCR comme PSGL-1. Nous avons traité 1×10^6 cellules de la lignée My-La avec $15 \mu\text{g/mL}$ d'anticorps dirigé contre le CLA (HECA-452) ou son isotype contrôle (RTK2118). La deuxième stratégie fut de transduire la lignée My-La avec les lentivirus contenant 2 shARN dirigés contre l'enzyme ST3Gal-4 ciblant l'exon 5 et 8 dont l'efficacité a déjà été validée (Mondal N et al. Blood 2015). Nous avons ensuite évalué l'état d'activation des voies de signalisation en aval du TCR en *Western Blot* par étude de la phosphorylation des protéines AKT (Ser473) et ERK (Thr202/Tyr204) qui sont connues comme étant impliquées dans la survie des cellules de LTCP (Kamijo H et al. 2018). Mais également de ZAP70 (Tyr319) qui joue un rôle dans l'activation des LT suite à l'engagement du TCR. En effet, l'activation du LT induit l'interaction du TCR avec le complexe CD3 qui contient des domaines *immunoglobulin-like* et des motifs *immunoreceptor tyrosine based activation motifs* (ITAMs). Ces motifs peuvent être phosphorylés au niveau des tyrosines permettant ainsi la liaison avec des domaines SH2 présent par exemple sur la tyrosine kinase ZAP70. Cette liaison permet la phosphorylation et l'activation de ZAP70 qui va jouer un rôle dans la transduction du signal menant notamment à la survie (Kumar A et al. 2006). Afin de réaliser les Western Blots, nous avons dans un premier temps validé nos anticorps sur des cellules Jurkat ou L1 (Poglio S et al. 2021) activées avec des billes CD3/CD28 (pour ZAP70) ou stimulées avec de l'insuline (pour AKT) ou de la PHA (pour ERK) (résultats non montrés). Les résultats que nous avons obtenus avec les cellules de LTCP dans les conditions shContrôle ou traitée avec l'isotype contrôle confirment que l'activation basale de ces voies est très faible. En effet, au niveau basal et après stimulation, il a déjà été décrit que l'activation des voies du TCR est diminuée dans les cellules de LTCP par rapport aux LT de donneurs sains (Fargnoli MC et al. 1997 ; Klemke et al., 2009). Cette expérience a montré que la diminution d'expression de CLA par les 2 shARNs ou son blocage ne modifie pas l'état de phosphorylation de ZAP70, Akt et ERK. On peut ainsi conclure que l'inhibition de CLA n'a pas d'effet sur l'activation de ces voies de

l'immunité alors que nous observons une diminution significative de la migration et de la survie des cellules My-La, comme vu précédemment dans l'article (Figure 28A et B).

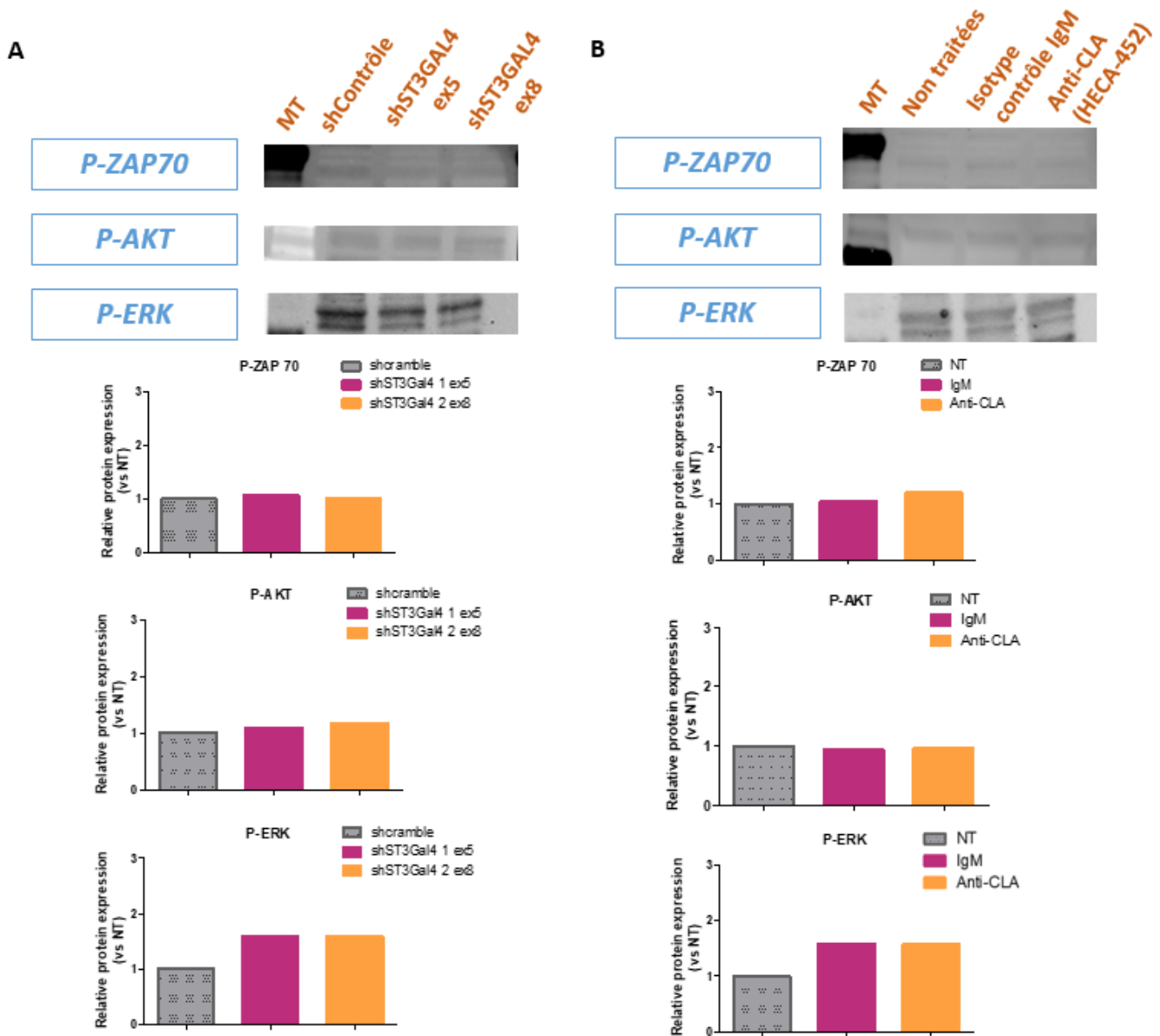


Figure 28 : Mécanismes moléculaires et voies de signalisation impliquées.

Etude de l'impact du CLA sur les voies de signalisation en aval du TCR en évaluant la phosphorylation des protéines ZAP70, AKT, ERK par Western Blot. **A.** Lignée My-La transduite par des shRNA (shcontrôle, shST3Gal4 1 Ex5, shST3Gal4 2 Ex8) **B.** Lignée My-La traitée ou non avec un anticorps isotype contrôle IgM ou un anticorps anti-CLA (clone HECA-452).

Nous avons ensuite évalué l'effet de l'anti-CLA (HECA-452), en comparaison avec son isotype contrôle (RTK2118) (30µg/mL), sur différentes voies de signalisation afin d'expliquer l'effet de l'anticorps sur la survie des cellules de LTCP. Pour cela, nous avons fait produire des plaques de RTqPCR array à façon permettant de quantifier et détecter différents gènes cibles impliqués (Tableau 6) entre autres

dans l'apoptose, la survie cellulaire, le cycle cellulaire et la signalisation lié au TCR. L'expression des gènes a été évaluée sur les ARNm des cellules tumorales de patients atteints d'un SS traitées ou non avec l'anticorps anti-CLA (Annexe I. K. RTqPCR). L'analyse GSEA (Get Set Enrichment Analysis) a été réalisée sur 4 échantillons de patients dont 1 en duplicat. Nous avons obtenu des résultats hétérogènes. En effet, pour le patient n°1 dans la condition traitée avec l'anticorps anti-CLA nous avons observé une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la signalisation PI3K, AKT, MTOR et TNFA. Au contraire pour les autres échantillons, nous avons obtenu des résultats surprenant opposés à ceux attendus. Par exemple, l'expression des gènes impliqués dans l'activation de la signalisation du TCR comme LCK/PLCG1 est augmentée après traitement avec l'anti-CLA alors que dans ce cas la survie est diminuée. Ainsi, le ciblage de CLA avec l'anticorps a un effet hétérogène sur les mécanismes moléculaires chez les patients (Figure 29). Cette hétérogénéité ne s'explique pas par le niveau d'expression de CLA ni la proportion de cellules CD45RO+CLA+. Cette analyse a été réalisée à un temps donné (3h) sur l'expression de gènes. Hors comme mentionné dans l'article 1, l'effet sur l'activation des caspases dans les cellules MyLA est rapide. De ce fait, l'analyse à plus court terme sur des phospho kinases array pourrait être plus informative.

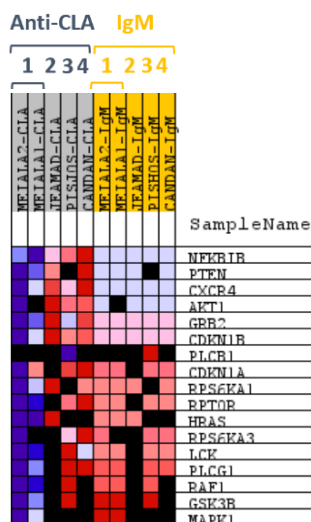


Fig 2: HALLMARK_PI3K_AKT_MTOR_SIGNALING
Blue-Pink O' Gram in the Space of the Analyzed GeneSet

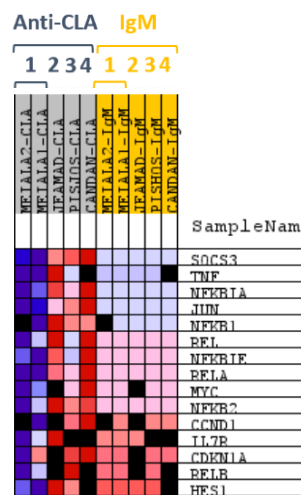


Fig 2: HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB
Blue-Pink O' Gram in the Space of the Analyzed GeneSet

Figure 29 : Effet de l'anticorps anti-CLA sur la signalisation des cellules SS de patients

Gene Set Enrichment Analysis des cellules de LTCP traitées avec un anti-CLA ou un contrôle isotypique. L'impact du CLA dans la signalisation des cellules de LTCP a été évalué à l'aide d'un anticorps (HECA-452). Les cellules SS des patients (N = 5) ont été incubées avec un anticorps anti-CLA (30 ug/ml) ou un contrôle isotypique. 3 heures plus tard, les cellules ont été récoltées et l'ARN a été extrait. La RTqPCR a été réalisée sur une plaque à façon contenant des amorces de différents gènes.

Apoptosis Survival	Cancer	mTOR	NFAT	Senescence	Notch	NFkB	MAPK-ERK	WNT	Cell cycle	Extracellular matrix and adhesion molecules	Chemokines
AKT1	AKT1	AKT1	AKT1	AKT1	CCND1	AKT1	GRB2	CCND1	BCL2	COL11A2	CXCL12
AKT2	AKT2	AKT2	AKT2	CDKN1A	CCND2	AKT2	HRAS	CCND2	CASP3	COL1A1	TNF
AKT3	AKT3	AKT3	AKT3	CDKN1B	CXCL12	AKT3	MAPK1	FRZB	CCND1	COL3A1	
BCL10	BCL10	CHUK	CHUK	CDKN2A	FRZB	CHUK	PLCB1	FZD5	CCND2		
BCL2	BCL2	DDIT4	GSK3B	COL1A1	FZD5	IKBKB	PLCB4	GSK3B	CCND3		
CASP3	CASP3	DEPTOR	IKBKB	COL3A1	HES1	NFKB1	PRKACB	JUN	CCNE1		
CASP9	CCND1	GSK3B	LCK	GSK3B	IGF1R	NFKB2	PRKAR1A	MYC	CDKN1A		
CDKN1A	CCND2	HRAS	NFKB1	HRAS	IL7R	NFKBIA	PRKAR2B	RHOA	CDKN1B		
CDKN1B	CCND3	IKBKB	NFKB2	MYC	JUN	NFKBIE	RAF1	TCF7	CDKN2A		
CDKN2A	CCNE1	STK11	NFKBIA	NFKB1	NOTCH1	REL	RASA1	WNTA5	TP53		
CXCR4	CDKN1A	MAPK1	NFKBIB	PIK3CA	NOTCH3	RELA	SRC				
DDIT4	CDKN2A	MTOR	PIK3CA	PTEN	RUNX1	RELB					
HRAS	COL11A2	RPS6KA3	PIK3CB	TERT	SOCS3	TNF					
IKBKE	CXCL12	PDCD4	PIK3CD	TP53	TCF15						
JUN	GSK3B	PIK3CA	PIK3R1	TWIST1	WNTA5						
LCK	HRAS	PIK3CB	PLCG1	VIM							
MAPK1	IGF1R	PIK3CD	PLCG2								
MTOR	JUN	PIK3CG	RAC1								
MYC	KRAS	PRKCA	REL								
NFKB1	LCK	PTEN	RELA								
NFKBIA	MAPK1	RHOA	SYK								
NFKBIB	MTOR	RPS6KA1	ZAP70								
PDCD4	MYC	RPTOR									
PIK3CA	PIK3CA	TP53									
PIK3CB	PIK3CB										
PIK3CD	PIK3CD										
PIK3CG	PIK3CG										
PRKCA	PIK3R1										
PTEN	PRKAR1A										
RAC1	PTEN										
RAF1	RAF1										
RHOA	REL										
RPS6KA1	RELA										
RPS6KB2	RUNX1										
RUNX1	SRC										
SRC	SYK										
TCF7L2	TCF7L2										
TNF	TCL1A										
TP53	TNF										
TWIST1	TP53										
VIM	VIM										
WNTA5											

Tableau 7 : Liste des gènes étudiés dans la plaque de qPCR array

Nous avons par la suite initié une étude de l'impact de CLA sur l'expression de certaines molécules à la surface des cellules SS de patients et la lignée My-La. Comme vu précédemment, PSGL-1 joue un rôle dans la fonction des cellules T, comme l'inhibition de l'IL-7R et l'IL-2R. Afin d'évaluer l'impact du CLA sur ces molécules, nous avons traité les cellules de patients SS triées ou cellules My-La avec 30 ou 15 µg/mL de mAb anti-CLA (HECA-452) ou son isotype contrôle (RTK2118) pendant 3 ou 72 heures et évalué l'expression des différentes molécules de surface telles que PSGL-1, IL-2R (CD25), IL-7R (CD127), CXCR4, CD28 par cytométrie en flux. Après traitement avec l'anticorps anti-CLA, PSGL-1 ($n=2$ patients ; $n=2$ My-La) est faiblement surexprimé par rapport à la condition contrôle. Ce qui serait en accord avec l'effet pro-apoptotique de la surexpression de PSGL-1. Le traitement n'a eu aucun effet sur l'expression de CXCR4 ($n=2$ patients ; $n=2$ My-La), CD28 ($n=2$ patients ; $n=2$ My-La), CD25 (IL2-R) ($n=1$ patients ; $n=2$ My-La) et CD127 (IL7-R) ($n=1$ patients ; $n=2$ My-La) (Figure 30). Cependant, cette analyse n'a été réalisée que sur 2 patients atteints de SS et sur les cellules de la lignée My-La ($n=2$), ils restent donc à confirmer.

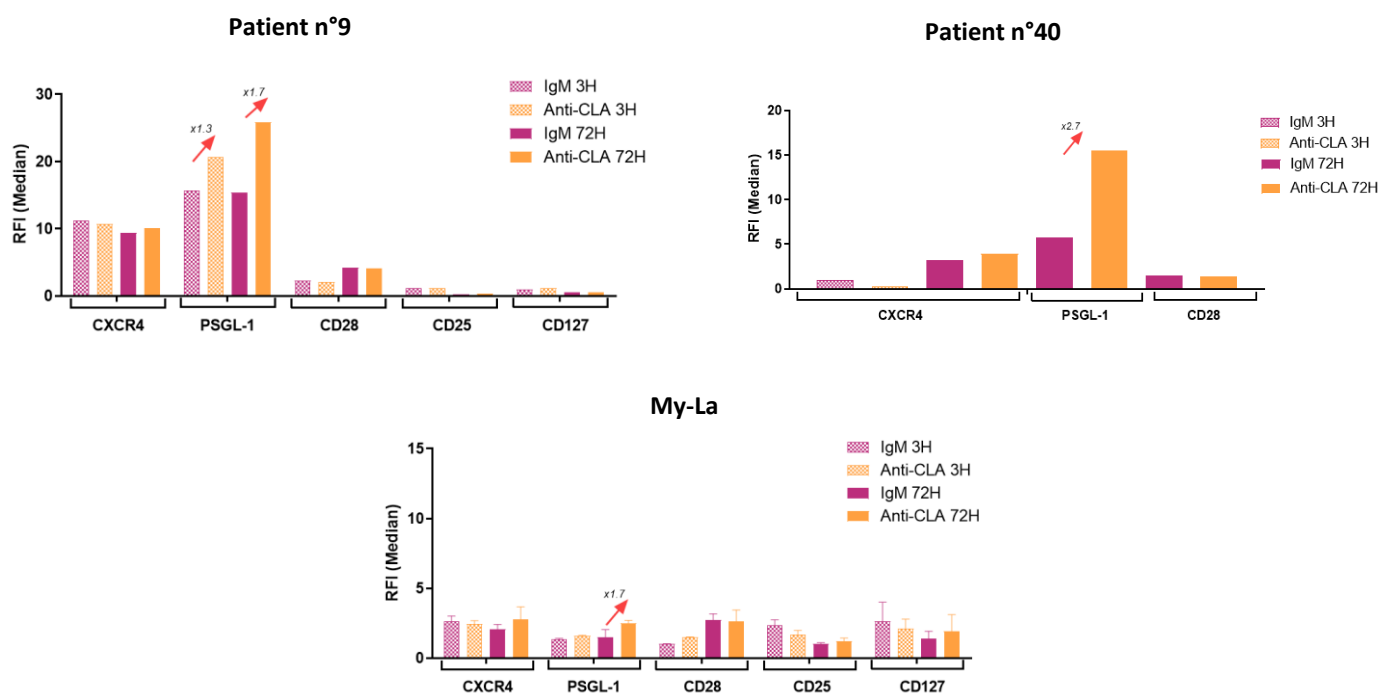


Figure 30 : Effet de l'anticorps anti-CLA sur l'expression de PSGL-1, CXCR4, CD28, CD25 et CD127

Expression des molécules de surface des cellules de LTCP traitées avec un anti-CLA ou un contrôle isotypique. Les cellules My-La ou les cellules SS de patients ont été incubées avec les anticorps 3 heures et 72 heures. Le ratio fluorescence intensity (RFI) a été obtenu par cytométrie en flux (Mean Fluorescence Intensity (MFI) marqueur testé/MFI isotype contrôle)

IV) Développement d'un modèle pré-clinique afin de valider l'effet de l'anticorps anti-CLA *in vivo*

Nous avons tenté de développer un modèle pré-clinique afin de valider l'effet de CLA. En effet, nous savons que le traitement des cellules My-La avec l'anticorps anti-CLA induit la mort cellulaire, donc le prétraitement avant l'injection *in vivo* induit un biais car il affecte d'emblée la viabilité des cellules. Cependant, la quantité d'anticorps à injecter chez les souris (prenant en compte la dose, fréquence, durée) était trop importante et coûteuse pour réaliser une telle étude d'emblée. Nous avons donc choisi de reproduire ces résultats en utilisant des tumeurs établies chez la souris afin de valider le rôle de CLA *in vivo* (Annexe I. L. Modèles murins).

Pour cela, nous avons dans un premier temps, par limite de quantité d'anticorps disponible, effectué une première expérience *in vivo* ($n=1$) où cette fois-ci 1×10^6 de cellules de la lignée cellulaire My-La dans un volume de $100 \mu\text{L}$ de PBS ont été injectées dans des souris immunodéficientes NSG par voie sous-cutanée. Après l'établissement d'une tumeur d'environ $100\text{-}150 \text{mm}^3$, les souris ont été traitées en péri-tumoral avec $37 \mu\text{g}$ d'anticorps anti-CLA (HECA-452) ou son isotype contrôle (RTK2118) ($n=4$ souris pour chaque groupe) (Figure 31).

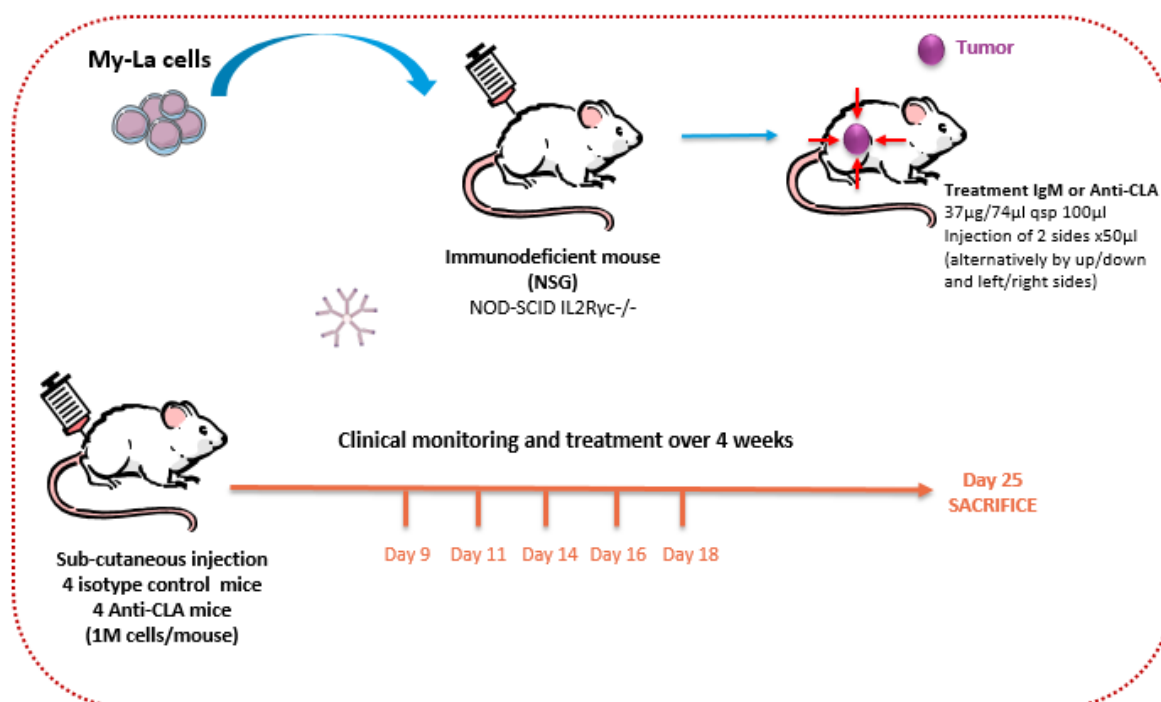


Figure 31 : Rôle de l'anti-CLA sur la tumorigénicité et la dissémination des LTCP dans un modèle de xélogreffe sous-cutané *in vivo* avec traitement péri-tumoral. Résumé schématique de la stratégie expérimentale.

L'évolution de la croissance tumorale a tendance à diminuer dans le groupe traité avec l'anticorps anti-CLA en comparaison au groupe contrôle (Figure 32). La quantification de l'aire HLA-ABC+, sur la surface totale du tissu, évaluée par IHC sur des coupes de foie et reins a montré un pourcentage légèrement plus important mais non significatif dans le groupe anti-CLA et au contraire dans le rein un pourcentage plus faible mais non significatif par rapport au groupe contrôle (Figure 32).

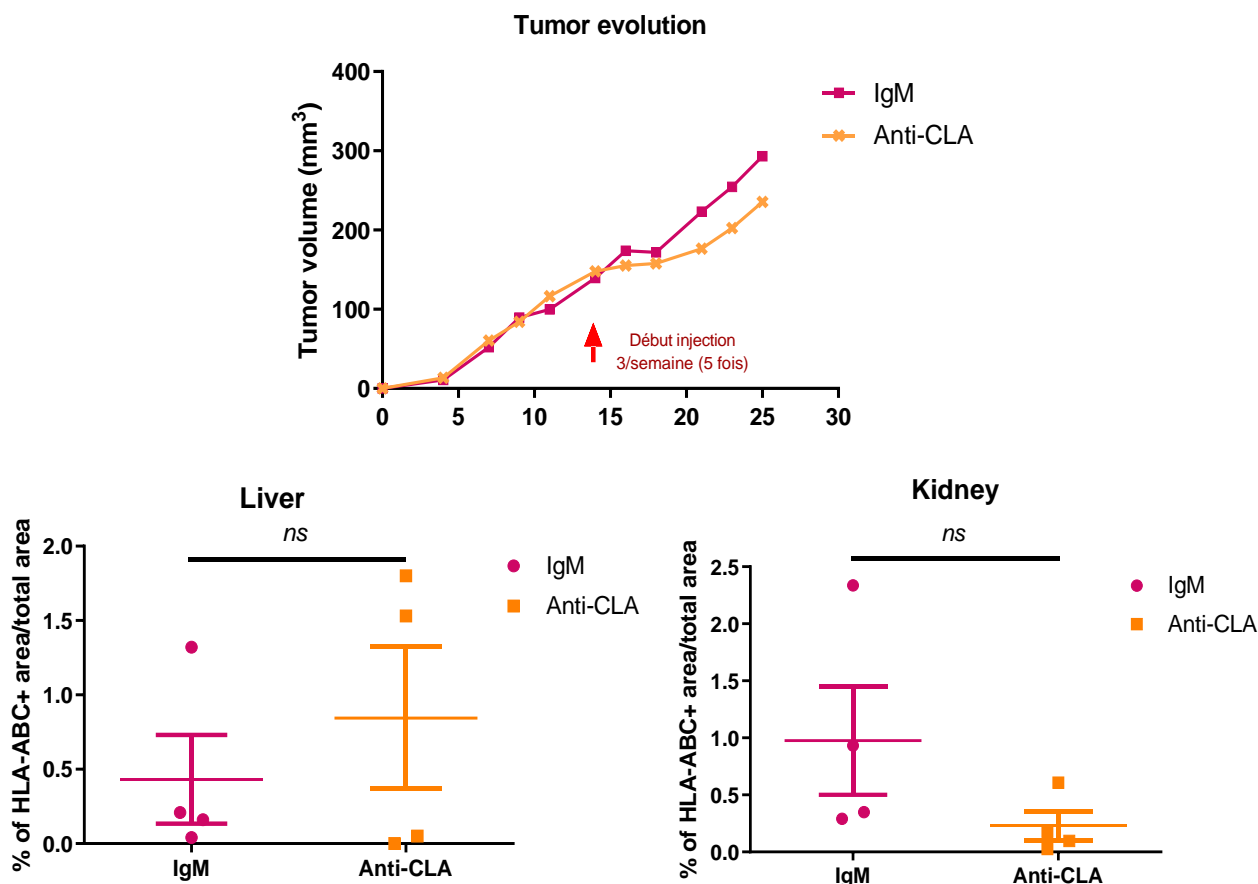


Figure 32 : Rôle de l'anti-CLA sur la tumorigénicité et la dissémination des LTCP dans un modèle de xénogreffe sous-cutané in vivo avec un traitement péri-tumoral.

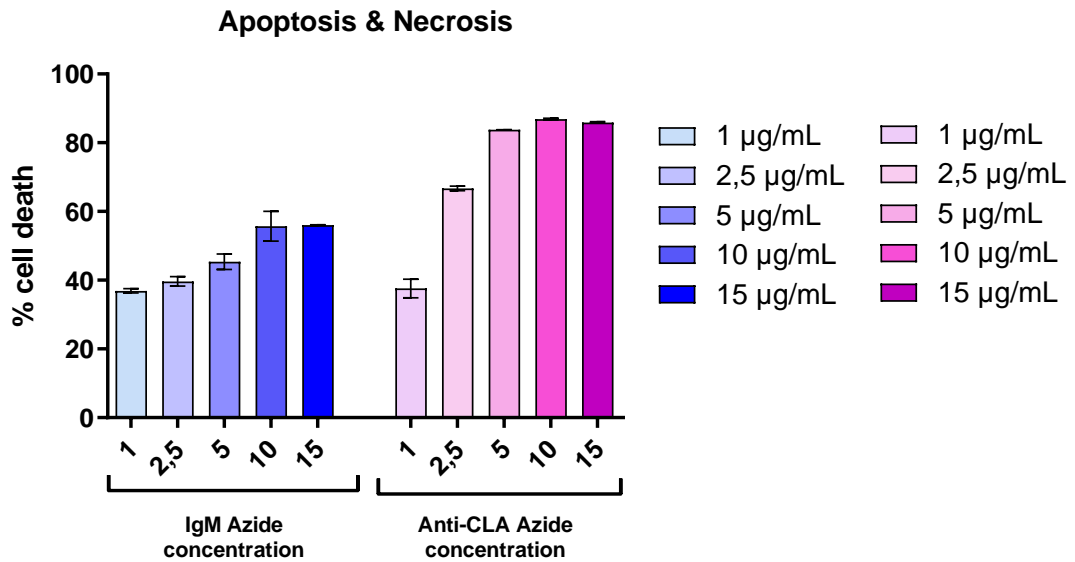
Evolution tumorale et quantification des cellules HLA-ABC+ sur des coupes de foie et de reins de souris injectées avec des cellules My-La puis traitées en péri-tumoral avec isotype contrôle IgM ou un anticorps anti-CLA (HECA-452). La quantification de l'aire HLA-ABC+ est réalisée avec le logiciel HALO. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Mann-Whitney. ns = non-significatif.

Nous avons refait cette expérience, en utilisant un anticorps de qualité fonctionnelle. En effet, toutes les expériences précédentes ont été réalisées avec un anticorps contenant de l'azide nécessaire à la conservation de l'anticorps. Nous avons rencontré pendant 2 années des difficultés pour faire fabriquer un anticorps de grade fonctionnel à moindre coût dû notamment au type d'immunoglobuline (IgM pentamérique) du clone HECA-452, le seul clone existant sur le marché. Les résultats précédents obtenus *in vivo*, nous ont permis d'obtenir un financement qui nous a permis d'obtenir la forme purifiée de l'anticorps, ultra-leaf (Ultra-low endotoxin azide free), en quantité suffisante pour le reste des expériences *in vivo*.

Nous avons d'abord validé l'effet fonctionnel de cet anticorps purifié *in vitro* (Figure 33). Pour cela, la lignée cellulaire My-La a été traitée avec différentes concentrations de l'anti-CLA ou l'isotype contrôle 48h avec la forme contenant de l'azide ou la forme ultra-leaf. L'effet sur la mort cellulaire a été quantifié en évaluant l'apoptose et la nécrose des cellules par cytométrie en flux. Au bout de 48h, une augmentation de la mort cellulaire de manière concentration-dépendante a été observée avec les 2 types d'anticorps, contenant de l'azide et l'ultra-leaf. Il est également intéressant de noter que le traitement avec le contrôle isotypique contenant de l'azide induit également une légère mort cellulaire après 48h. En effet, 50% contre 30% de mort cellulaire a été observé avec le contrôle isotype ultra-leaf. Il est donc important d'avoir un contrôle qui soit le moins toxique pour les cellules pour ne pas sous-évaluer l'effet de l'anticorps à tester.

L'expérience précédente (Figure 32) *in vivo* a été répétée avec l'anticorps ultra-leaf ($n=1$). Les résultats obtenus entre les 2 groupes et au sein d'un même groupe étant très hétérogènes n'ont montré aucun effet de l'anti-CLA. Nous avons noté que le site d'injection de l'anticorps à cette fréquence pouvait induire des biais et notamment une nécrose de la tumeur uniquement liée à l'injection elle-même et non au traitement.

A



B

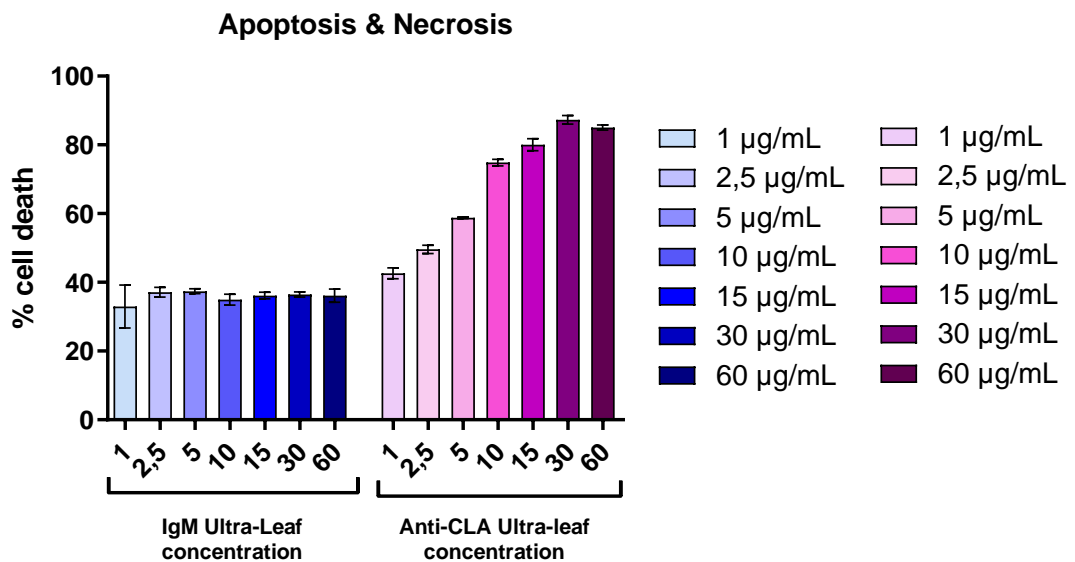


Figure 33 : Les formes contenant de l'azide et les formes ultra-leaf de l'anticorps anti-CLA altèrent la survie cellulaire des cellules de LTCP

A et B. L'anticorps anti-CLA augmente la mort des cellules de LTCP. La lignée cellulaire My-La a été incubée avec la forme ultra-leaf (A) ou celle contenant de l'azide (B) d'un anticorps anti-CLA (HECA-452) ou l'isotype correspondant pendant 48 heures. Les pourcentages de cellules apoptotiques (Annexine V+) et de cellules nécrotiques (Hoechst+, Annexine V-) ont été étudiés par cytométrie en flux. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ et *** $p < 0,0001$.

Nous avons donc entrepris de changer de modèle *in vivo* en utilisant deux approches différentes. Elles consistaient à injecter les cellules de la lignée My-La soit par voie intra-hépatique ($n=2$; 1×10^6 de cellules par souris) (Figure 34A) soit par voie sous-cutanée ($n=1$; 2×10^6 de cellules par souris) (Figure 34B) dans des souris immunodéficientes NSG puis de traiter en intra-péritonéal les souris avec $100 \mu\text{g}$ d'anticorps anti-CLA ultra-leaf (HECA-452) ou l'isotype correspondant (RTK2118) tous les deux jours durant 2 ou 3 semaines.

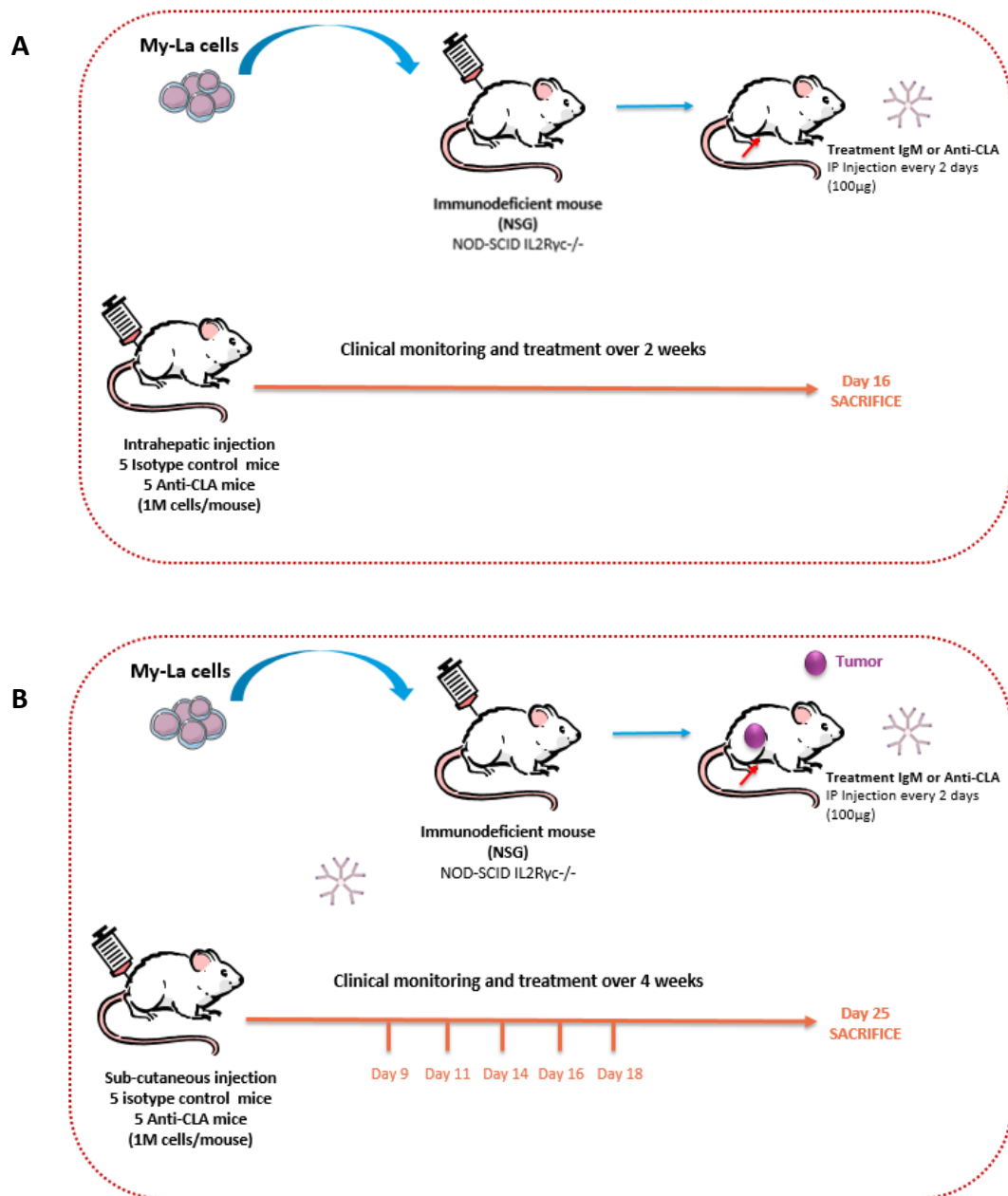


Figure 34 : Résumé schématique des stratégies expérimentales.

A. Rôle de l'anti-CLA sur la tumorigénicité et la dissémination des LTCP dans un modèle de xélogreffe intra-hépatique *in vivo* avec traitement intra-péritonéal. B. Rôle de CLA sur la tumorigénicité et la dissémination des LTCP dans un modèle de xélogreffe sous-cutané *in vivo* avec traitement intra-péritonéal.

Concernant la première approche par voie intra-hépatique ($n=2$), la première expérience *in vivo* a montré lors de la quantification du pourcentage de cellules HLA-ABC+ par IHC, sur des coupes de foie injecté, péri-tumoral et reins, des différences non significatives entre le groupe anti-CLA et le groupe contrôle ($n=5$ souris pour chaque groupe). Cependant, nous avons noté une légère diminution de la dissémination dans les reins. Nous avons donc refait cette expérience mais les résultats n'étaient pas similaires ou significatifs (Figure 35).

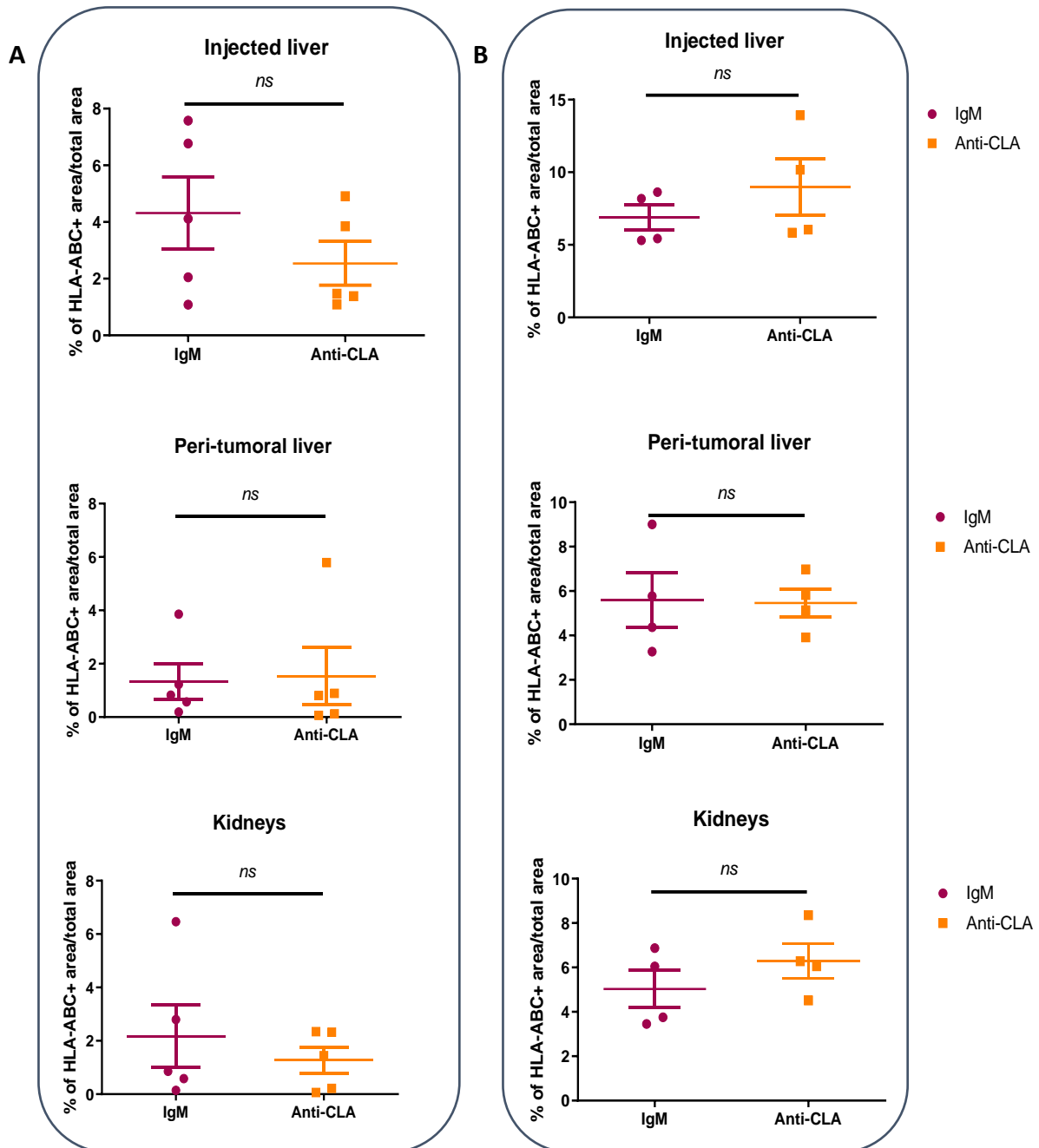


Figure 35 : Rôle de l'anti-CLA sur la prolifération et la dissémination des LTCP dans un modèle de xénogreffe intra-hépatique *in vivo* avec un traitement intra-péritonéal.

Quantification des cellules HLA-ABC+ sur des coupes de foie injecté, péri-tumoral et reins de souris injectées par des cellules My-La puis traitées en intra-péritonéal avec isotype contrôle IgM ou un anticorps anti-CLA (HECA-452) ultra-leaf. Cette expérience a été réalisée 2 fois N°1 (A) et N°2 (B). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Mann-Whitney. ns = non-significatif.

Concernant la deuxième approche par voie sous-cutanée ($n=1$), l'évolution tumorale semblait être similaire dans le groupe traité avec l'anticorps anti-CLA par rapport au groupe contrôle ($n=8$ souris pour chaque groupe). La quantification du pourcentage de cellules HLA-ABC+ par IHC a montré un pourcentage légèrement plus faible mais non significatif au niveau du foie et un pourcentage significativement plus faible au niveau du rein dans le groupe anti-CLA par rapport au groupe contrôle (Figure 36). Les résultats laissent suggérer une diminution de la dissémination des cellules de LTCP lors du ciblage du CLA avec l'anticorps anti-CLA dans ce modèle de xéno greffe par voie sous-cutanée et traitement intra-péritonéal.

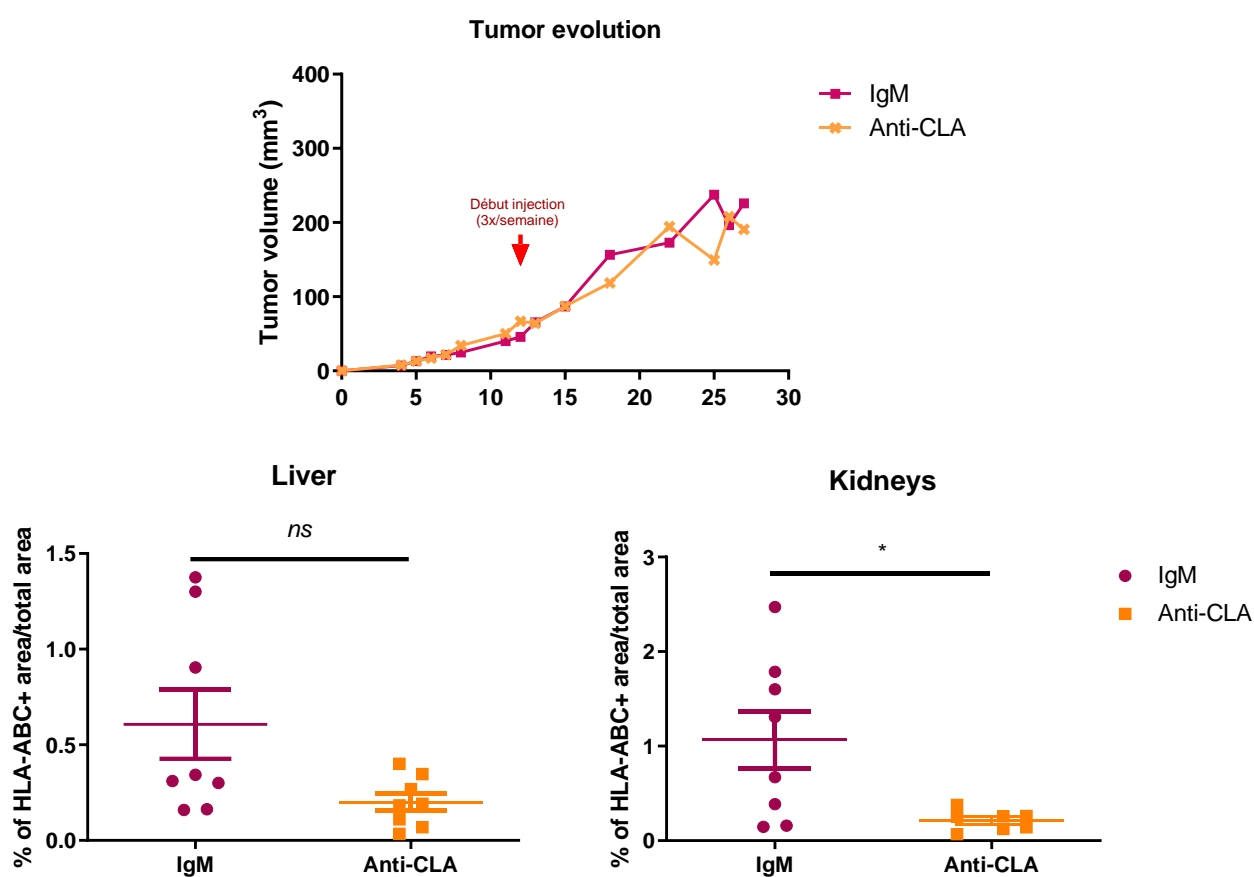


Figure 36 : Rôle de l'anti-CLA sur la tumorigénicité et la dissémination des LTCP dans un modèle de xéno greffe sous-cutané in vivo avec un traitement intra-péritonéal.

Evolution tumorale et quantification des cellules HLA-ABC+ sur des coupes de foie et de reins de souris injectées par des cellules My-La puis traitées en péri-tumoral avec l'isotype contrôle IgM ou un anticorps anti-CLA (HECA-452) ultra-leaf. La quantification de l'aire HLA-ABC+ est réalisée avec le logiciel HALO. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Mann-Whitney. ns = non-significatif ; * $p < 0,05$.

Nous avons prévu de répéter cette dernière expérience de greffe sous-cutanée suivi d'un traitement avec l'anticorps anti-CLA ou l'isotype contrôle. Cependant, l'anticorps anti-CLA ne semble pas avoir d'effet lorsque le traitement est directement administré aux souris dans nos conditions expérimentales (100µg/ souris/ tous les 2 jours). La mise en place de tels modèles nécessite d'ajuster la fréquence, la dose et la durée. Cependant, nous sommes limités par la quantité d'anticorps anti-CLA pour augmenter la dose, la fréquence et la durée du traitement.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de mon projet de thèse était d'étudier le rôle de CLA dans le développement des LTCP et plus particulièrement son implication dans l'agressivité de l'invasion cutanée et/ou la dissémination ainsi que la survie des cellules de LTCP dans les formes avancées de LTCP.

Nos résultats fournissent des preuves sur les rôles biologiques du CLA dans la survie, la prolifération et la migration des cellules de LTCP (Figure 37). Ceci a été possible grâce à l'utilisation de deux stratégies. La première consistait à bloquer son enzyme de maturation, ST3Gal-4. L'inhibition de cette enzyme induit la diminution de l'expression de CLA à la surface des cellules sans modifier celle de PSGL-1, ainsi l'effet obtenu passe au moins en partie par CLA. Cependant il peut également exister d'autres effets indépendants de CLA dont les mécanismes doivent encore être explorés. La deuxième stratégie consistait à cibler directement le CLA avec un anticorps monoclonal sur des cellules de LTCP de patients et des cellules de la lignée cellulaire My-La. Le traitement anti-CLA a altéré à la fois la migration et la survie des cellules de LTCP en induisant l'apoptose. Cette induction semble dépendre du niveau d'expression de CLA à la surface des cellules, épargnant ainsi les LT CD4+ circulants normaux qui l'expriment faiblement d'un effet secondaire. Le CLA, qui est une molécule intervenant dans l'adressage cutané des LT, pourrait donc représenter une nouvelle cible thérapeutique.

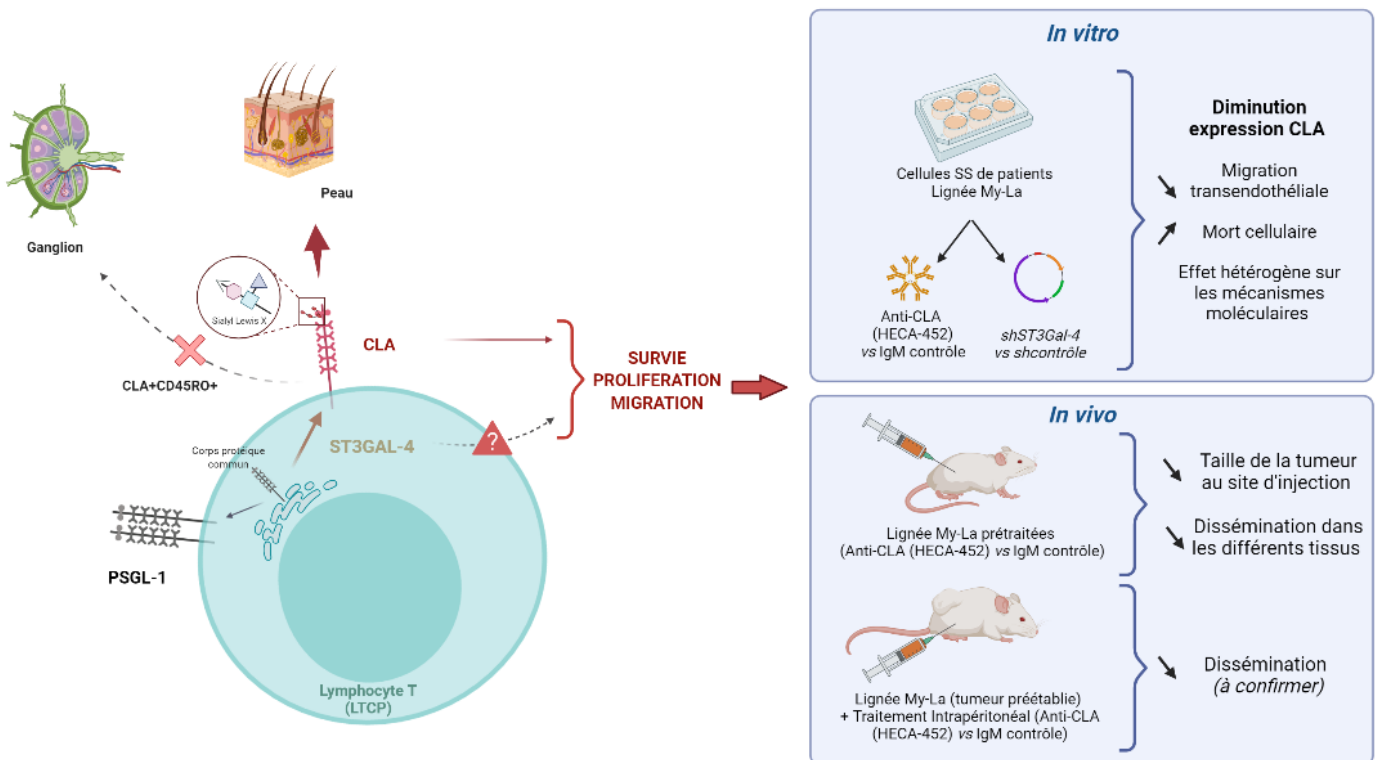


Figure 37 : Rôle de la molécule Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen (CLA) dans le développement des lymphomes T cutanés primitifs

Bien que le CLA soit exprimé par une minorité importante de LT du sang périphérique, le maintien de ces cellules en culture entraîne une perte d'expression, ce qui complique l'analyse de sa structure et de sa fonction. Des méthodes ont été décrites qui inversent partiellement cette inhibition, l'activation des cellules permet de stimuler faiblement son expression mais celles-ci n'entraînent qu'une expression de bas niveau puis une perte de l'expression rapidement (Fuhlbrigge RC et al Nature. 1997 ; Picker LJ et al. 1993 ; Leung DY et al. 1995). Nous avons donc entrepris d'étudier le rôle de CLA sur la lignée My-La (MF-T) dont les cellules sont à 100% positives pour CLA mais également sur les cellules de patients atteints de SS dont la majorité des cellules tumorales expriment le CLA. Néanmoins, il serait intéressant de tenter de faire réexprimer le CLA sur lignées de LTCP qui ne l'expriment pas, comme par exemple HUT78 ou bien d'autres lignées SS dérivant de cellules de Sézary de patients et développées au sein de notre laboratoire (Poglio S et al. 2021). La stratégie de surexpression protéique n'étant pas adaptée car PSGL-1 et CLA ont un corps protéique commun, nous pourrions tenter d'activer les cellules avec des billes CD3/CD28/CD2 et dans différentes conditions de cultures.

Nous avons pu observer après avoir caractérisé l'expression de CLA à la surface des cellules tumorales de LTCP de patients dans le sang et dans la peau qu'il existe une grande hétérogénéité entre les patients. De plus, aucune corrélation n'a été observée entre la quantité de cellules CD3+CLA+ circulantes et résidentes de la peau suggérant une expression de CLA hétérogène entre ces deux compartiments. Néanmoins, les cellules de la peau et du sang semblent avoir un profil d'expression et un statut prolifératif différents qui pourraient expliquer cette absence de corrélation. En effet, la prolifération et l'expression des gènes liés à la progression du cycle cellulaire sont plus élevés dans les LT tumoraux de la peau en comparaison à ceux dérivant du sang (Cristofolletti C et al. 2019 ; Herrera A et al. 2021).

Dans le cas du psoriasis et de la dermatite atopique, des pathologies cutanées inflammatoires, le taux de LT CLA+ circulants peut être un biomarqueur de l'évolution de la maladie. En revanche, l'impact pronostic et/ou diagnostic n'a pas été exploré dans les LTCP. Nous avons pu montrer qu'une faible proportion de cellules CLA+CD45RO+ circulantes chez les patients était de mauvais pronostic. Ce résultat pourrait s'expliquer par l'absence d'adressage cutané d'une partie des cellules de LTCP n'exprimant pas CLA et donc favoriser à terme leur dissémination dans les ganglions.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence comme dans les LT mémoires normaux, l'implication du CLA dans la migration transendothéliale des cellules de LTCP de patients et des cellules de la lignée My-LA et ainsi de leur migration vers la peau. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre le CLA, HECA-452, dans un système de transwell avec des cellules vasculaires humaines a induit une réduction de la migration. La surexpression de la E-sélectine à la surface des cellules microvasculaires augmentant la migration transendothéliale des cellules de LTCP, suggère que l'interaction E-sélectine/CLA est importante dans ce processus. En effet, dans ces conditions, le traitement avec l'anticorps anti-CLA diminue fortement la migration des cellules. Néanmoins, il serait intéressant de confirmer ces résultats en réalisant des tests de migration transendothéliale dans les mêmes conditions avec des cellules de LTCP qui n'expriment pas le CLA. L'utilisation d'une stratégie knock-down shARN afin de diminuer l'expression de l'enzyme responsable de la maturation de CLA, ST3Gal-4, a eu le même effet que l'anticorps HECA-452, suggérant que cet anticorps aurait des fonctions bloquantes, ce qui n'était pas bien établi auparavant (De Boer et al. 1994 ; Kummitha et al. 2012). De plus, comme ce qui a été décrit précédemment dans les cellules myéloïdes, nous avons pu confirmer le rôle de ST3Gal-4 dans la maturation du CLA dans le contexte des LTCP (Mondal N et al. 2015). ST3Gal-4 pourrait également représenter un nouvel outil pour la thérapie ciblée des formes avancées de LTCP. En effet, il pourrait exister d'autres effets indépendants de CLA dont les mécanismes doivent être explorés. Pour cela, il serait intéressant d'approfondir cet aspect-là en utilisant des inhibiteurs de sialyltransférases à large spectre (3F_{ax}-Neu5Ac) (Natoni et al., 2020). Néanmoins, l'étude de telles hypothèses nécessiteraient également de nouveaux traitements. En effet, les inhibiteurs actuels des sialyltransférases ne sont pas spécifiques de ST3Gal-4 et pourraient induire d'autres effets secondaires (Templeton et al., 2021). Ces inhibiteurs à large spectre pourraient avoir des effets opposés inattendus en améliorant la survie des cellules tumorales comme cela a été montré dans le myélome multiple humain (Natoni et al., 2020).

Une étude fonctionnelle récente propose d'utiliser CLA afin d'adresser spécifiquement un agent photoactivable. Dans celle-ci, un anticorps HECA-452 couplé à un colorant photo-absorbant, la phtalocyanine hydrophile IRdye 700DX[®] (IR700) et activable par la lumière proche infrarouge a été utilisé (Silic-Benussi et al., 2021). Néanmoins, cette étude n'a montré aucun effet direct de l'anticorps HECA-452 sur la survie des cellules de LTCP probablement dû à une concentration d'anticorps plus faible par rapport à celle utilisée lors de nos expériences.

En effet, nos résultats montrent clairement que le ciblage de la molécule CLA ou sa diminution à la surface cellulaire impacte la survie des cellules LTCP *in vitro* en induisant un signal apoptotique *via*

l'activation rapide des effecteurs des caspases 3/7, 8 et 9. En revanche, le ciblage de CLA sur les LT CD4+ normaux qui expriment partiellement CLA mais à un niveau plus faible par rapport aux cellules de LTCP n'a pas cet effet. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'état d'activation des voies de signalisation dont la signalisation du TCR ne sont pas similaires entre les cellules T CD4+ normaux et tumoraux. Ce phénomène a déjà été décrit précédemment dans les cellules de LTCP. En effet, au niveau basal et après stimulation, l'activation des voies du TCR est plus faible par rapport aux cellules de donneurs sains (Fargnoli MC et al. 1997 ; Klemke et al., 2009). Ce phénomène confère également une résistance aux cellules de LTCP à la mort cellulaire induite par activation (AICD) en raison de la diminution de l'expression de CD95 (Klemke et al., 2009).

Le rôle de CLA sur les voies de signalisation impliquées dans la migration, la survie et la prolifération cellulaire n'étant pas bien élucidé dans le contexte des LTCP, nous avons supposé que CLA pourrait avoir le même rôle que PSGL-1. En effet, CLA et PSGL-1 appartiennent à la même famille et diffèrent par les modifications post-traductionnelles et les motifs sLe^x qu'elles contiennent. PSGL-1 est connu, entre autres, pour avoir un rôle dans la migration cellulaire et plus particulièrement le recrutement de cellules immunitaires lors de l'inflammation. De récentes études ont également montré son rôle potentiel dans l'inhibition de la fonction des cellules T normales. En induisant la déphosphorylation de ERK et AKT, PSGL-1 est responsable de l'inhibition de la signalisation du TCR (Tinocco et al., 2017). A contrario, nos données suggèrent que le CLA a un effet opposé dans les cellules de LTCP. En effet, l'expression du CLA semble protéger les cellules de l'apoptose. D'après les résultats que nous avons obtenus, CLA n'aurait pas d'effet sur les voies de l'immunité nécessitant l'activation de ZAP70, AKT et ERK. Toutefois, l'effet du ciblage du CLA sur l'activation des caspases étant très rapide, une analyse à court terme en utilisant des phospho kinases array pourrait être nécessaire afin de poursuivre l'éclaircissement des mécanismes moléculaires modulés par CLA.

De plus, un anticorps humanisé anti-PSGL-1 (SelK2) a été développé et est testé cliniquement sur des pathologies telles que l'asthme. D'autres études ont montré que l'inhibition de l'interaction entre les cellules de myélome multiple et les cellules endothéliales et stromales en ciblant PSGL-1 avec l'anticorps SelK2, diminue l'adhésion et la prolifération des cellules de myélome multiple et augmente la sensibilité de ces cellules aux traitements (Muz B et al., 2015). Il serait donc également intéressant d'étudier le lien que CLA pourrait avoir avec PSGL-1 afin d'éventuellement combiner le ciblage de CLA et PSGL-1 lors des traitements.

Nous avons confirmé le rôle biologique *in vivo* du CLA sur la tumorigenèse et la dissémination des cellules de LTCP à l'aide d'un modèle de xéno greffe de souris (Andrique L et al., 2016) après avoir prétraité ces cellules avec l'HECA-452 et en les injectant par voie intra-hépatique dans la souris. Le ciblage de la molécule de CLA a diminué le développement tumoral au niveau du site d'injection probablement dû à la mort cellulaire induite, montrant ainsi la capacité du traitement à altérer l'aptitude des cellules à générer une tumeur *in vivo*.

Afin de pallier le biais que l'effet du prétraitement induit sur les cellules dans le modèle *in vivo* précédent, nous avons tenté de développer un modèle *in vivo* pré-clinique avec des tumeurs pré-établies. Pour cela, nous avons entrepris la production d'un anticorps de grade fonctionnel. Après de nombreuses difficultés, nous avons testé plusieurs modèles *in vivo* pour déterminer celui qui serait le plus adapté pour notre étude et notre anticorps. Le modèle de xéno greffe où les cellules de LTCP sont injectées par voie sous-cutanée puis traitées après l'établissement de la tumeur par voie intra-péritonéale semble être le plus approprié. En effet, les résultats laissent suggérer une diminution de la dissémination des cellules de LTCP lors du ciblage du CLA avec l'anticorps HECA-452. Néanmoins, l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et nécessite d'être répliquée afin de confirmer ces résultats et valider l'effet de CLA.

Les cellules My-La transduites avec le shARN contrôle ou les shARN ciblant ST3Gal-4 ne nous ont pas permis de réaliser des expériences *in vivo*. Ces cellules perdent l'expression du gène rapporteur GFP et du shARN, à long terme 3 semaines après xéno greffe chez la souris. En effet, après la xéno greffe de cellules transduites nous avons vérifié si le shARN était toujours intégré dans le génome de ces cellules et nous avons observé une perte de l'expression de la GFP et donc de l'expression du shARN. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une modification de la méthylation du promoteur U6 et PGK au cours du temps. Pour cela, il serait intéressant de développer des lentivirus contenant les mêmes shARN mais avec des promoteurs inductibles. Cette approche préviendrait le problème de la perte d'expression du gène rapporteur de la GFP et des shARN mais également l'effet apoptotique induit par le traitement des cellules avec l'anticorps HECA-452. Ainsi, la xéno greffe de cellules transduites puis l'induction des shARN *in vivo* nous permettrait d'évaluer l'effet du CLA sur la tumorigenèse et la dissémination des cellules de LTCP.

La démonstration, *in vitro* et *in vivo*, de l'implication de CLA dans la migration et la survie des cellules de LTCP permet d'envisager son utilisation ou celle de son enzyme de maturation, ST3Gal-4, dans le traitement des formes avancées de LTCP.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abdel-Hakeem MS et al. 2017

Abdel-Hakeem MS, Boisvert M, Bruneau J, Soudeyans H, Shoukry NH. 2017. Selective expansion of high functional avidity memory CD8 T cell clonotypes during hepatitis C virus reinfection and clearance. *PLoS Pathog* 13:e1006191.

Abrams JT et al. 1991

Abrams JT, Lessin S, Ghosh SK, Ju W, Vonderheid EC, Nowell P, Murphy G, Efenbein B, DeFreitas E. A clonal CD4-positive T-cell line established from the blood of a patient with Sézary syndrome. *J Invest Dermatol*. 1991 Jan;96(1):31-7.

Adams DH et al. 1997

Adams DH, Yannelli JR, Newman W, et al. Adhesion of tumour-infiltrating lymphocytes to endothelium: a phenotypic and functional analysis. *Br J Cancer*. 1997;75:1421–1431

Agar NS et al. 2010

Agar NS, Wedgeworth E, Crichton S, Mitchell TJ, Cox M, Ferreira S, Robson A, Calonje E, Stefanato CM, Wain EM, Wilkins B, Fields PA, Dean A, Webb K, Scarisbrick J, Morris S, Whittaker SJ. Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sézary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *J Clin Oncol*. 2010 Nov 1;28(31):4730-9.

Ahn CS et al. 2014

Ahn CS, ALSayyah A, Sangüeza OP. Mycosis fungoides: an updated review of clinicopathologic variants. *Am J Dermatopathol*. 2014 Dec;36(12):933-48; quiz 949-51.

Akdis M et al. 1997

Akdis M, Akdis CA, Weigl L, et al. Skin-homing, CLA+ memory T cells are activated in atopic dermatitis and regulate IgE by an IL-13-dominated cytokine pattern: igG4 counter-regulation by CLA-memory T cells. *J Immunol*. 1997;159:4611–4619.

Alam et al. 1996

Alam, S. M., Travers, P. J., Wung, J. L., Nasholds, W., Redpath, S., Jameson, S. C., and Gascoigne, N. R. (1996). T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 381, 616-620.

Albanesi et al. 2005 - Albanesi C, Scarponi C, Giustizieri ML, et al. (2005) Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Current drug targets Inflammation and allergy* 4:329-34.

Alon R et al. 2008

Alon R, Ley K. Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20:525–532.

Andrique L et al. 2016

Andrique L, Poglio S, Prochazkova-Carlotti M, Kadin ME, Giese A, Idrissi Y, et al. Intrahepatic Xenograft of Cutaneous T-Cell Lymphoma Cell Lines: A Useful Model for Rapid Biological and Therapeutic Evaluation. *Am J Pathol*. 2016 Jul;186(7):1775–85.

Aronovich A et al. 2020

Aronovich A, Moyal L, Gorovitz B, Amitay-Laish I, Naveh HP, Forer Y, et al. Cancer-Associated Fibroblasts in Mycosis Fungoides Promote Tumor Cell Migration and Drug Resistance through CXCL12/CXCR4. *J Invest Dermatol*. 2020 Aug 11

Armerding D et al. 2001

Armerding D, Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, et al. Tonsillar B cells do not express PSGL-1, but a significant fraction displays the cutaneous lymphocyte antigen and exhibits effective E- and P-selectin ligand activity. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;126:78–90.

Armstrong F et al. 2009

Armstrong F, Brunet de la Grange P, Gerby B, Rouyez M-C, Calvo J, Fontenay M, et al. NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1730–40.

Arulogun S et al. 2008

Arulogun S, Prince HM, Gambell P, Lade S, Ryan G, Eaton E, et al. Extracorporeal photopheresis for the treatment of Sézary syndrome using a novel treatment protocol. *J Am Acad Dermatol*. 2008 Oct;59(4):589–95.

B

Bagot M et al. 2001

Bagot M, Moretta A, Sivori S, Biassoni R, Cantoni C, Bottino C, Boumsell L, Bensussan A. CD4(+) cutaneous T-cell lymphoma cells express the p140-killer cell immunoglobulin-like receptor. *Blood*. 2001 Mar 1;97(5):1388-91.

Bagot M, 2013

Bagot, Martine. *Les lymphomes cutanés: Sous l'égide du Groupe français d'étude des lymphomes cutanés*. Springer Paris, 2013

Bahler DW et al. 2008

Bahler DW, Hartung L, Hill S, Bowen GM, Vonderheid EC. CD158k/KIR3DL2 is a useful marker for identifying neoplastic T-cells in Sézary syndrome by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008 May;74(3):156-62.

Baker BS et al. 1997

Baker BS, Garioch JJ, Hardman C, et al. Induction of cutaneous lymphocyte-associated antigen expression by group A streptococcal antigens in psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 1997;289:671–676

Balkwill F, 2014

Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol*. 2004 Jun;14(3):171–9.

Barboux S et al. 2010

Barboux S, Poirier O, Pincet F, Hermand P, Tiret L, Deterre P. The adhesion mediated by the P-selectin P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) couple is stronger for shorter PSGL-1 variants. *J Leukoc Biol*. 2010 Apr;87(4):727-34

Barthel SR et al. 2007

Barthel SR, Gavino JD, Descheny L, Dimitroff CJ. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 Nov;11(11):1473-91

Beetz S et al. 2007

Beetz S, Marischen L, Kabelitz D, Wesch D. Human gamma delta T cells: candidates for the development of immunotherapeutic strategies. *Immunol Res*. 2007;37(2):97-111.

Bekkenk MW et al. 2000

Bekkenk MW, Geelen FA, van Voorst Vader PC, Heule F, Geerts ML, van Vloten WA, Meijer CJ, Willemze R. Primary and secondary cutaneous CD30(+) lymphoproliferative disorders: a report from the Dutch Cutaneous Lymphoma Group on the long-term follow-up data of 219 patients and guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 2000 Jun 15;95(12):3653-61.

Benoist and Mathis, 1989

Benoist, C., and Mathis, D. (1989). Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell* 58, 1027-1033

Berg EL et al. 1991

Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK, Picker LJ, Butcher EC. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med*. 1991 Dec 1;174(6):1461-6.

Bernengo MG et al. 2007

Bernengo MG, Quaglino P, Comessatti A, Ortoncelli M, Novelli M, Lisa F, Fierro MT. Low-dose intermittent alemtuzumab in the treatment of Sézary syndrome: clinical and immunologic findings in 14 patients. *Haematologica*. 2007 Jun;92(6):784-94.

Bernimoulin MP et al. 2003

Bernimoulin MP, Zeng XL, Abbal C, Giraud S, Martinez M, Michielin O, Schapira M, Spertini O. Molecular basis of leukocyte rolling on PSGL-1. Predominant role of core-2 O-glycans and of tyrosine sulfate residue 51. *J Biol Chem*. 2003 Jan 3;278(1):37-47

Beylot-Barry M et al. 2010

Beylot-Barry M, Dereure O, Vergier B, Barete S, Laroche L, Machet L, Delfau-Larue MH, D'Incan M, Grange F, Ortonne N, Merlio JP, Bagot M; pour le Groupe français d'étude des lymphomes cutanés (GFELC). *Prise en charge des lymphomes T cutanés : recommandations du Groupe français d'étude des lymphomes cutanés [Management of cutaneous T-cell lymphomas: Recommendations of the French Cutaneous Lymphoma Group]*. *Ann Dermatol Venerol*. 2010 Oct;137(10):611-21. French.

Boguniewicz M et al. 2011

Boguniewicz M, Leung DYM. Atopic dermatitis: A disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev*. 2011;242:233–246

Boonk SE et al. 2016

Boonk SE, Zoutman WH, Marie-Cardine A, van der Fits L, Out-Luiting JJ, Mitchell TJ, Tosi I, Morris SL, Moriarty B, Booken N, Felcht M, Quaglino P, Ponti R, Barberio E, Ram-Wolff C, Jääntti K, Ranki A, Bernengo MG, Klemke CD, Bensussan A, Michel L, Whittaker S, Bagot M, Tensen CP, Willemze R, Vermeer MH. Evaluation of Immunophenotypic and Molecular Biomarkers for Sézary Syndrome Using Standard Operating Procedures: A Multicenter Study of 59 Patients. *J Invest Dermatol*. 2016 Jul;136(7):1364-1372.

Borcherding N et al. 2019 ;

Borcherding N, Voigt AP, Liu V, Link BK, Zhang W, Jabbari A. Single-Cell Profiling of Cutaneous T-Cell Lymphoma Reveals Underlying Heterogeneity Associated with Disease Progression. *Clin Cancer Res*. 2019 May 15;25(10):2996-3005.

Borowitz MJ et al. 1993

Borowitz MJ, Weidner A, Olsen EA, et al. Abnormalities of circulating T-cell subpopulations in patients with cutaneous T-cell lymphoma: cutaneous lymphocyte-associated antigen expression on T cells correlates with extent of disease. *Leukemia*. 1993;7:859–863.

Bouaziz JD et al. 2005

Bouaziz JD, Ortonne N, Giustiniani J, Schiavon V, Huet D, Bagot M, Bensussan A. Circulating natural killer lymphocytes are potential cytotoxic effectors against autologous malignant cells in sezary syndrome patients. *J Invest Dermatol*. 2005 Dec;125(6):1273-8.

Bouaziz JD et al. 2010

Bouaziz JD, Remtoula N, Bensussan A, Marie-Cardine A, Bagot M. Absolute CD3+ CD158k+ lymphocyte count is reliable and more sensitive than cytomorphology to evaluate blood tumour burden in Sézary syndrome. *Br J Dermatol*. 2010 Jan;162(1):123-8.

Bouillet P et al. 2009

Bouillet P, O'Reilly LA. CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2009 Jul;9(7):514-9.

Bradford PT et al. 2009

Bradford PT, Devesa SS, Anderson WF, Toro JR. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases. *Blood*. 2009 May 21;113(21):5064-73.

Breitfeld et al. 2000

Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Forster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXCR5 chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *The Journal of experimental medicine* 192, 1545-1552

Brouet JC et al. 1973

Brouet JC, Flandrin G, Seligmann M. Indications of the thymus-derived nature of the proliferating cells in six patients with Sézary's syndrome. *N Engl J Med*. 1973 Aug 16;289(7):341-4.

Burns et al. 1992

Burns MK, Ellis CN, Cooper KD. Mycosis fungoides--type cutaneous T-cell lymphoma arising before 30 years of age. Immunophenotypic, immunogenotypic and clinicopathologic analysis of nine cases. *J Am Acad Dermatol*. 1992 Dec;27(6 Pt 1):974-8.

Butcher and Picker, 1996

Butcher, E. C., and Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-66.

C

Campbell et al. 1999

Campbell, J. J., Pan, J., and Butcher, E. C. (1999). Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J Immunol* 163, 2353-2357.

Campbell JJ et al. 2010

Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood*. 2010 Aug 5;116(5):767-71.

Campisi J et al. 2014

Campisi J, Robert L. Cell senescence: role in aging and age-related diseases. *Interdiscip Top Gerontol*. 2014;39:45-61.

Caudron A et al. 2012

Caudron A, Marie-Cardine A, Bensussan A, Bagot M. Actualités sur le syndrome de Sézary [New developments in Sézary syndrome]. *Ann Dermatol Venereol*. 2012 Jan;139(1):31-40. French.

- Cerroni L et al. 1992**
Cerroni L, Rieger E, Hödl S, Kerl H. Clinicopathologic and immunologic features associated with transformation of mycosis fungoides to large-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 1992 Jun;16(6):543-52.
- Cerroni L et al. 2002**
Cerroni L, Fink-Puches R, Bäck B, Kerl H. Follicular mucinosis: a critical reappraisal of clinicopathologic features and association with mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Arch Dermatol.* 2002 Feb;138(2):182-9.
- Chakraborty AK et al. 2014**
Chakraborty, A. K. & Weiss, A. Insights into the initiation of TCR signaling. *Nat. Immunol.* **15**, 798–807 (2014).
- Chang S-E et al. 2003**
Chang S-E, Kim M-J, Lee W-S, et al. Natural killer cells in human peripheral blood and primary cutaneous natural killer cell lymphomas may express cutaneous lymphocyte antigen. *Acta Derm Venereol.* 2003;83:162–166.
- Chang DK et al. 2012**
Chang DK, Sui J, Geng S, Muvaffak A, Bai M, Fuhlbrigge RC, Lo A, Yammanuru A, Hubbard L, Sheehan J, Campbell JJ, Zhu Q, Kupper TS, Marasco WA. Humanization of an anti-CCR4 antibody that kills cutaneous T-cell lymphoma cells and abrogates suppression by T-regulatory cells. *Mol Cancer Ther.* 2012 Nov;11(11):2451-61.
- Chen L, 2013**
L. Chen and DB. *Flies Nat Rev Immunol.* 2013 April ; 13(4): 227–242.
- Chen SC et al. 2004**
Chen SC, Huang CC, Chien CL, Jeng CJ, Su HT, Chiang E, Liu MR, Wu CH, Chang CN, Lin RH. La réticulation du ligand-1 de la glycoprotéine P-sélectine induit la mort des lymphocytes T activés. *Sang.* 2004 Nov 15;104(10):3233-42.
- Chevret E and Merlio JP, 2016**
Chevret E, Merlio JP. Sézary Syndrome: Translating Genetic Diversity into Personalized Medicine. *J Invest Dermatol.* 2016 Jul;136(7):1319-1324.
- Choi J et al. 2015**
Choi J, Goh G, Walradt T, Hong BS, Bunick CG, Chen K, Bjornson RD, Maman Y, Wang T, Tordoff J, Carlson K, Overton JD, Liu KJ, Lewis JM, Devine L, Barbarotta L, Foss FM, Subtil A, Vonderheid EC, Edelson RL, Schatz DG, Boggon TJ, Girardi M, Lifton RP. Genomic landscape of cutaneous T cell lymphoma. *Nat Genet.* 2015 Sep;47(9):1011-9.
- Chong BF et al. 2008**
Chong BF, Wilson AJ, Gibson HM, Hafner MS, Luo Y, Hedgcock CJ, Wong HK. Immune function abnormalities in peripheral blood mononuclear cell cytokine expression differentiates stages of cutaneous T-cell lymphoma/mycosis fungoides. *Clin Cancer Res.* 2008 Feb 1;14(3):646-53.
- Ciofani M et al. 2006**
Ciofani M, Knowles GC, Wiest DL, von Boehmer H, Zúñiga-Pflücker JC. Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation. *Immunity.* 2006 Jul;25(1):105-16.
- Clark RA, 2010**
Clark RA (2010) Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *The Journal of investigative dermatology* 130:362-70
- Clark RA et al. 2012**
Clark RA, Watanabe R, Teague JE, Schlapbach C, Tawa MC, Adams N, Dorosario AA, Chaney KS, Cutler CS, Leboeuf NR, Carter JB, Fisher DC, Kupper TS. Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. *Sci Transl Med.* 2012 Jan 18;4(117):117ra7.
- Clark WHJ et al. 1969**
Clark WHJ, From L, Bernardino EA, et al. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969;29:705–727.
- Clemente CG et al. 1996**
Clemente CG, Mihm MCJ, Bufalino R, et al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 1996;77:1303–1310.
- Coppé JP et al. 2010**
Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:99-118.
- Criscione VD et al. 2007**
Criscione VD, Weinstock MA. Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002. *Arch Dermatol.* 2007 Jul;143(7):854-9.
- Cristofolletti C et al. 2019**
Cristofolletti C, Bresin A, Picozza M, et al. Blood and skin-derived Sezary cells: differences in proliferation-index, activation of PI3K/AKT/mTORC1 pathway and its prognostic relevance. *Leukemia.* 2019;33(5):1231–1242.

Cuda CM et al. 2016

Cuda CM, Pope RM, Perlman H. The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Aug 23;12(9):543-58.

Cummings RD, 1999

Cummings RD. Structure and function of the selectin ligand PSGL-1. *Braz J Med Biol Res*. 1999 May;32(5):519-28.

Czarnowicki T et al. 2014

Czarnowicki T, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Skin barrier and immune dysregulation in atopic dermatitis: an evolving story with important clinical implications. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2014;2:371–379

Czarnowicki T et al. 2015a

Czarnowicki T, Malajian D, Shemer A, et al. Skin-homing and systemic T-cell subsets show higher activation in atopic dermatitis versus psoriasis. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:208–211

Czarnowicki T et al. 2015b

Czarnowicki T, Esaki H, Gonzalez J, et al. Early pediatric atopic dermatitis shows only a cutaneous lymphocyte antigen (CLA)(+) TH2/TH1 cell imbalance, whereas adults acquire CLA(+) TH22/TC22 cell subsets. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:941–951.e3.

Czarnowicki T et al. 2017

Czarnowicki T, Santamaria-Babí LF, Guttman-Yassky E. Circulating CLA+ T cells in atopic dermatitis and their possible role as peripheral biomarkers. *Allergy*. 2017;72:366–372.

Czarnowicki T et al. 2018

Czarnowicki T, He HY, Wen HC, et al. Alopecia areata is characterized by expansion of circulating Th2/Tc2/Th22, within the skin-homing and systemic T-cell populations. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2018;73:713–723

Czarnowicki T et al. 2019

Czarnowicki T, He H, Leonard A, et al. Blood endotyping distinguishes the profile of vitiligo from that of other inflammatory and autoimmune skin diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143:2095–2107

Czarnowicki T et al. 2020

Czarnowicki T, He H, Canter T, Han J, Lefferdink R, Erickson T, Rangel S, Kameyama N, Kim HJ, Pavel AB, Estrada Y, Krueger JG, Paller AS, Guttman-Yassky E. Evolution of pathologic T-cell subsets in patients with atopic dermatitis from infancy to adulthood. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Jan;145(1):215-228.

D

D'Ambrosio D et al. 2000

D'Ambrosio D, Iellem A, Colantonio L, et al. Localization of Th-cell subsets in inflammation: differential thresholds for extravasation of Th1 and Th2 cells. *Immunol Today*. 2000;21:183–186

da Costa Martins P et al. 2007

da Costa Martins P, García-Vallejo JJ, van Thienen JV, Fernandez-Borja M, van Gils JM, Beckers C, Horrevoets AJ, Hordijk PL, Zwaginga JJ. P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 May;27(5):1023-9

da Silva Almeida AC et al. 2015

da Silva Almeida AC, Abate F, Khiabani H, Martinez-Escala E, Guitart J, Tensen CP, Vermeer MH, Rabadan R, Ferrando A, Palomero T. The mutational landscape of cutaneous T cell lymphoma and Sézary syndrome. *Nat Genet*. 2015 Dec;47(12):1465-70.

de Masson A et al. 2014

de Masson A, Beylot-Barry M, Bouaziz JD, Peffault de Latour R, Aubin F, Garcia S, d'Incan M, Dereure O, Dalle S, Domp Martin A, Suarez F, Battistella M, Vignon-Pennamen MD, Rivet J, Adamski H, Brice P, François S, Lissandre S, Turlure P, Wierzbicka-Hainaut E, Brissot E, Dulery R, Servais S, Ravinet A, Tabrizi R, Ingen-Housz-Oro S, Joly P, Socié G, Bagot M; French Study Group on Cutaneous Lymphomas and Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire. Allogeneic stem cell transplantation for advanced cutaneous T-cell lymphomas: a study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and French Study Group on Cutaneous Lymphomas. *Haematologica*. 2014 Mar;99(3):527-34.

Davison SC et al. 2001

Davison SC, Ballsdon A, Allen MH, et al. Early migration of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) positive T cells into evolving psoriatic plaques. *Exp Dermatol*. 2001;10:280–285.

De Boer OJ et al. 1994

De Boer OJ, Horst E, Pals ST, Bos JD, Das PK. Functional evidence that the HECA-452 antigen is involved in the adhesion of human neutrophils and lymphocytes to tumour necrosis factor-alpha-stimulated endothelial cells. *Immunology*. 1994 Mar;81(3):359–65.

de Jesús-Gil C et al. 2020

de Jesús-Gil C, Ruiz-Romeu E, Ferran M, Sagristà M, Chiriach A, García P, Celada A, Pujol RM, Santamaria-Babí LF. IL-15 and IL-23 synergize to trigger Th17 response by CLA⁺ T cells in psoriasis. *Exp Dermatol*. 2020 May 31.

de Jesús-Gil C et al. 2021

de Jesús-Gil C, Sans-de SanNicolàs L, García-Jiménez I, Ferran M, Celada A, Chiriach A, Pujol RM, Santamaria-Babí LF. The Translational Relevance of Human Circulating Memory Cutaneous Lymphocyte-Associated Antigen Positive T Cells in Inflammatory Skin Disorders. *Front Immunol*. 2021 Mar 23;12:652613.

Delfau-Larue MH et al. 2000

Delfau-Larue MH, Laroche L, Wechsler J, Lepage E, Lahet C, Asso-Bonnet M, Bagot M, Farcet JP. Diagnostic value of dominant T-cell clones in peripheral blood in 363 patients presenting consecutively with a clinical suspicion of cutaneous lymphoma. *Blood*. 2000 Nov 1;96(9):2987-92.

Dereure O et al. 2000

Dereure O, Portales P, Clot J, Guilhou JJ. Decreased expression of Fas (APO-1/CD95) on peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol*. 2000 Dec;143(6):1205-10.

Di Raimondo C et al. 2020

Di Raimondo C, Parekh V, Song JY, Rosen ST, Querfeld C, Zain J, Martinez XU, Abdulla FR. Primary Cutaneous CD30⁺ Lymphoproliferative Disorders: a Comprehensive Review. *Curr Hematol Malig Rep*. 2020 Aug;15(4):333-342.

Diamandidou E et al. 1998

Diamandidou E, Colome-Grimmer M, Fayad L, Duvic M, Kurzrock R. Transformation de la mycose fongicoïde/syndrome de Sézary: caractéristiques cliniques et pronostic. *Sang*. 15 août 1998;92(4):1150-9.

Diridollou S et al. 2001

Diridollou S, Vabre V, Berson M, Vaillant L, Black D, Lagarde JM, Grégoire JM, Gall Y, Patat F. Skin ageing: changes of physical properties of human skin in vivo. *Int J Cosmet Sci*. 2001 Dec;23(6):353-62.

Dobos G et al. 2021

Dobos G, de Masson A, Ram-Wolff C, Beylot-Barry M, Pham-Ledard A, Ortonne N, Ingen-Housz-Oro S, Battistella M, d'Incan M, Rouanet J, Franck F, Vignon-Pennamen MD, Franck N, Carlotti A, Boulinguez S, Lamant L, Petrella T, Dalac S, Joly P, Courville P, Rivet J, Dereure O, Amatore F, Taix S, Grange F, Durlach A, Quéreux G, Josselin N, Moulouguet I, Mortier L, Dubois R, Maubec E, Laroche L, Michel L, Templier I, Barete S, Nardin C, Augereau O, Vergier B, Bagot M; Français Groupe d'étude sur les lymphomes cutanés (GFELC). Changements épidémiologiques dans les lymphomes cutanés: une analyse de 8593 patients du registre des Français des lymphomes cutanés. *Fr J Dermatol*. Juin 2021;184(6):1059-1067.

Doebbeling U, 2010

Doebbeling U. Un modèle murin pour le syndrome de Sézary. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010 Fév 11;29(1):11

Driskell RR et al. 2015

Driskell RR, Watt FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends Cell Biol*. 2015 Feb;25(2):92-9.

Dugas-Breit S et al. 2014

Dugas-Breit S, Schulze H-J, Hallermann C. New and established treatment options for mycosis fungoides and Sézary syndrome - an update. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG*. 2014

Dulmage BO et al. 2019

Dulmage BO, Akilov O, Vu JR, Falo LD, Geskin LJ. Dysregulation of the TOX-RUNX3 pathway in cutaneous T-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2019 May 3;10(33):3104-3113.

Duncan SC et al. 1978

Duncan SC, Winkelmann RK. Circulating Sézary cells in hospitalized dermatology patients. *Br J Dermatol*. 1978 Aug;99(2):171-8.

E

Echchakir H et al. 2000

Echchakir H, Bagot M, Dorothée G, Martinvalet D, Le Gouvello S, Boumsell L, Chouaib S, Bensussan A, Mami-Chouaib F. Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4⁺ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis. *J Invest Dermatol*. 2000 Jul;115(1):74-80.

Egawa and Kabashima, 2011

Egawa G, Kabashima K (2011) Skin as a peripheral lymphoid organ: revisiting the concept of skin-associated lymphoid tissues. *The Journal of investigative dermatology* 131:2178-85.

Etzioni A, 1996

Etzioni A. Adhesion molecules--their role in health and disease. *Pediatr Res*. 1996 Feb;39(2):191-8.

Evans KG et al. 2011

Evans KG, Troxel AB, DeNardo BJ, Introcaso CE, Rook AH, Kim EJ. Validity assessment of the cutaneous T-cell lymphoma severity index to predict prognosis in advanced mycosis fungoides/Sézary syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 2011 Apr;64(4):682-9.

F**Fane M et al. 2019**

Fane M, Weeraratna AT. How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2020 Feb;20(2):89-106.

Fargnoli MC et al. 1997

Fargnoli MC, Edelson RL, Berger CL, Chimenti S, Couture C, Mustelin T, Halaban R. Diminished TCR signaling in cutaneous T cell lymphoma is associated with decreased activities of Zap70, Syk and membrane-associated Csk. *Leukemia*. 1997 Aug;11(8):1338-46.

Ferran M et al. 2013

Ferran M, Romeu ER, Rincón C, Sagristà M, Giménez Arnau AM, Celada A, Pujol RM, Holló P, Jókai H, Santamaria-Babí LF. Circulating CLA+ T lymphocytes as peripheral cell biomarkers in T-cell-mediated skin diseases. *Exp Dermatol*. 2013 Jul;22(7):439-42.

Fink-Puches R et al. 2002

Fink-Puches R, Zenahlik P, Bäck B, Smolle J, Kerl H, Cerroni L. Primary cutaneous lymphomas: applicability of current classification schemes (European Organization for Research and Treatment of Cancer, World Health Organization) based on clinicopathologic features observed in a large group of patients. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):800-5.

Fisher GJ et al. 2002

Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*. 2002 Nov;138(11):1462-70.

Fischer TC et al. 2004

Fischer TC, Gellrich S, Muche JM, Sherev T, Audring H, Neitzel H, Walden P, Sterry W, Tönnies H. Genomic aberrations and survival in cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol*. 2004 Mar;122(3):579-86.

Foster et al. 1999

Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23-33

Frenette PS et al. 2000

Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med*. 2000 Apr 17;191(8):1413-22.

Fuhlbrigge RC et al. 1997

Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature*. 1997 Oct 30;389(6654):978-81.

G**Gallo and Nakatsuji, 2011**

Gallo RL, Nakatsuji T (2011) Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *The Journal of investigative dermatology* 131:1974-80

Gasper DJ et al. 2014

Gasper DJ, Tejera MM, Suresh M. 2014. CD4 T-cell memory generation and maintenance. *Crit Rev Immunol* 34:121-146.

Gattinoni et al. 2011

Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu Z, Carpenito C, Wang E, Douek DC, Price DA, June CH, Marincola FM, Roederer M, Restifo NP. 2011. A human memory T cell subset with stem cell like properties. *Nat Med* 17:1290-1297.

Gattinoni et al. 2017

Gattinoni L, Speiser DE, Lichterfeld M, Bonini C. T memory stem cells in health and disease. *Nat Med.* 2017 Jan 6;23(1):18-27.).

Gelb AB et al. 1993

Gelb AB, Smoller BR, Warnke RA, et al. Lymphocytes infiltrating primary cutaneous neoplasms selectively express the cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA). *Am J Pathol.* 1993;142:1556–1564

Gerami P et al. 2008

Gerami P, Rosen S, Kuzel T, Boone SL, Guitart J. Folliculotropic mycosis fungoides: an aggressive variant of cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol.* 2008 Jun;144(6):738-46.

Germain, 2002

Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2, 309-322

Gittler JK et al. 2012

Gittler JK, Shemer A, Suárez-Fariñas M, et al. Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130:1344–1354

Goldrath and Bevan, 1999

Goldrath, A. W., and Bevan, M. J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, 255-262

Grange F, 2009

Grange F. Le mycosis fongoïde de stade précoce est-il un cancer? [Should early-stage mycosis fungoides be considered as cancer?]. *Ann Dermatol Venereol.* 2009 Mar;136(3):238-40. French.

Grob JJ, 2005

Grob JJ. Epidémiologie du mycosis fongoïde [Epidemiology of mycosis fungoides]. *Ann Dermatol Venereol.* 2005 Sep;132 Spec No 2:5S11-2. French.

Gros A et al. 2017

Gros A, Laharanne E, Vergier M, Prochazkova-Carlotti M, Pham-Ledard A, Bandres T, Poglio S, Berhouet S, Vergier B, Vial JP, Chevret E, Beylot-Barry M, Merlio JP. TP53 alterations in primary and secondary Sézary syndrome: A diagnostic tool for the assessment of malignancy in patients with erythroderma. *PLoS One.* 2017 Mar 16;12(3):e0173171.

H

Haghighi B et al. 2000

Haghighi B, Smoller BR, LeBoit PE, Warnke RA, Sander CA, Kohler S. Pagetoid reticulosis (Woringer-Kolopp disease): an immunophenotypic, molecular, and clinicopathologic study. *Mod Pathol.* 2000 May;13(5):502-10.

Haider A et al. 2016

Haider A, Steininger A, Ullmann R, Hummel M, Dimitrova L, Beyer M, Vandersee S, Lenze D, Sterry W, Assaf C, Möbs M. Inactivation of RUNX3/p46 Promotes Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Invest Dermatol.* 2016 Nov;136(11):2287-2296.

Hall BM, 2015

Hall BM. T Cells: Soldiers and Spies--The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015 Nov 6;10(11):2050-64.

Hawkes JE et al. 2017

Hawkes JE, Chan TC, Krueger JG. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. *J Allergy Clin Immunol Mosby Inc.* 2017;140:645–653.

He S et al. 2017

He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell.* 2017 Jun 1;169(6):1000-1011.

Heald PW et al. 1993

Heald PW, Yan SL, Edelson RL, et al. Skin-selective lymphocyte homing mechanisms in the pathogenesis of leukemic cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 1993;101:222–226

Herrera A et al 2021

Herrera A, Cheng A, Mimitou EP, Seffens A, George DD, Bar-Natan M, et al. Multimodal single-cell analysis of cutaneous T cell lymphoma reveals distinct sub-clonal tissue-dependent signatures. *Blood.* 2021 Jul 7: blood.2020009346.

Homey et al. 2002

Homey B, Alenius H, Muller A, et al. (2002) CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nature medicine* 8:157-65.

Horna P et al. 2019

Horna P, Moscinski LC, Sokol L, Shao H. Naïve/memory T-cell phenotypes in leukemic cutaneous T-cell lymphoma: Putative cell of origin overlaps disease classification. *Cytometry B Clin Cytom.* 2019 May;96(3):234-241.

Horna P et al. 2020

Horna P, Wang SA, Wolniak KL, Psarra K, Almeida J, Illingworth AJ, Johansson U, Craig FE, Torres R. Flow cytometric evaluation of peripheral blood for suspected Sézary syndrome or mycosis fungoides: International guidelines for assay characteristics. *Cytometry B Clin Cytom.* 2021 Mar;100(2):142-155.

Hosokawa H et al. 2021

Hosokawa H, Rothenberg EV. How transcription factors drive choice of the T cell fate. *Nat Rev Immunol.* 2021 Mar;21(3):162-176.

Hristov AC et al. 2019

Hristov AC, Tejasvi T, Wilcox RA. Mycosis fungoides and Sézary syndrome: 2019 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2019 Sep;94(9):1027-1041.

Huang Y et al. 2015

Huang Y, Su MW, Jiang X, Zhou Y. Evidence of an oncogenic role of aberrant TOX activation in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 2015 Feb 26;125(9):1435-43.

Hui YF et al. 1997

Hui YF, Reitz J. Gemcitabine: a cytidine analogue active against solid tumors. *Am J Health-Syst Pharm AJHP Off J Am Soc Health-Syst Pharm.* 1997 Jan 15;54(2):162-70; quiz 197-8.

Hwang ST et al. 2008

Hwang ST, Janik JE, Jaffe ES, Wilson WH. Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Lancet.* 2008 Mar 15;371(9616):945-57.

I**Iqbal J et al. 2019**

Iqbal J, Amador C, McKeithan TW, Chan WC. Molecular and Genomic Landscape of Peripheral T-Cell Lymphoma. *Cancer Treat Res.* 2019;176:31-68.

Infante-Duarte et al. en 2000

Infante-Duarte, C., Horton, H. F., Byrne, M. C., and Kamradt, T. (2000). Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *Journal of immunology* 165, 6107- 6115.

Ishida T et al. 2004

Ishida T, Iida S, Akatsuka Y, Ishii T, Miyazaki M, Komatsu H, Inagaki H, Okada N, Fujita T, Shitara K, Akinaga S, Takahashi T, Utsunomiya A, Ueda R. The CC chemokine receptor 4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-Cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Nov 15;10(22):7529-39.

Islam et al. 2011

Islam SA, Chang DS, Colvin RA, et al. (2011) Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting IL-5+ T(H)2 cells. *Nature immunology* 12:167-77

Islam SA et al. 2012

Islam SA, Luster AD. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med.* 2012 May 4;18(5):705-15.

Ivanov et al. 2006

Ivanov, I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., and Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.

J**Janeway CA et al. 2009**

Janeway, C.A., K. Murphy, P. Travers, P.L. Masson, et M. Walport. *Immunobiologie.* De Boeck Supérieur, 2009.

Jenkins MK et al. 2001

Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, Itano A, Pape KA. 2001. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol* 19:23-45

Jidar K et al. 2009

Jidar K, Ingen-Housz-Oro S, Beylot-Barry M, Paul C, Chaoui D, Sigal-Grinberg M, et al. Gemcitabine treatment in cutaneous T-cell lymphoma: a multicentre study of 23 cases. *Br J Dermatol.* 2009 Sep 1;161(3):660–3.

Jung T et al. 2003

Jung T, Schulz S, Zachmann K, et al. Expansion and proliferation of skin-homing T cells in atopic dermatitis as assessed at the single cell level. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003;130:143–149

K

Kaltoft K et al. 1987

Kaltoft K, Bisballe S, Rasmussen HF, Thestrup-Pedersen K, Thomsen K, Sterry W. A continuous T-cell line from a patient with Sézary syndrome. *Arch Dermatol Res.* 1987;279(5):293-8

Kaltoft K et al. 1992

Kaltoft K, Bisballe S, Dyrberg T, Boel E, Rasmussen PB, Thestrup-Pedersen K. Establishment of two continuous T-cell strains from a single plaque of a patient with mycosis fungoides. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1992 Mar;28A(3 Pt 1):161-7

Kamarashev J et al. 1998

Kamarashev J, Burg G, Kempf W, Hess Schmid M, Dummer R. Comparative analysis of histological and immunohistological features in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *J Cutan Pathol.* 1998 Sep;25(8):407-12.

Kamijo H et al. 2018

Kamijo H, Miyagaki T, Shishido-Takahashi N, Nakajima R, Oka T, Suga H, Sugaya M, Sato S. Aberrant CD137 ligand expression induced by GATA6 overexpression promotes tumor progression in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 2018 Nov 1;132(18):1922-1935.

Kamijo H et al. 2019

Kamijo H, Sugaya M. Two distinct variants of mycosis fungoides (MF): Folliculotropic MF and erythrodermic MF. *J Dermatol.* 2019 Dec;46(12):1136-1140.

Kantele A et al. 2003

Kantele A, Savilahti E, Tiimonen H, et al. Cutaneous lymphocyte antigen expression on human effector B cells depends on the site and on the nature of antigen encounter. *Eur J Immunol.* 2003;33:3275–3283.

Kaplanski G et al. 1994

Kaplanski G., Farnarier C., Benoliel A. M. , Foa C., Kaplanski S. & Bongrand P. (1994) A novel role for E- and P-selectins . *J. Cell Sci.* 107 : 2449-2457

Kapsenberg ML, 2003

Kapsenberg ML (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature reviews Immunology* 3:984-93

Karjalainen JM et al. 2000

Karjalainen JM, Tammi RH, Tammi MI, Eskelinen MJ, Agren UM, Parkkinen JJ, Alhava EM, Kosma VM. Reduced level of CD44 and hyaluronan associated with unfavorable prognosis in clinical stage I cutaneous melanoma. *Am J Pathol.* 2000 Sep;157(3):957-65.

Kasamon YL et al. 2019

Kasamon YL, Chen H, de Claro RA, Nie L, Ye J, Blumenthal GM et al. FDA Approval Summary: Mogamulizumab-kpkc for Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Clin Cancer Res.* 2019 Dec 15;25(24):7275-7280.

Kashyap MK et al. 2016

Kashyap MK, Kumar D, Jones H, Amaya-Chanaga CI, Choi MY, Melo-Cardenas J, et al. Ulocuplumab (BMS-936564 / MDX1338): a fully human anti-CXCR4 antibody induces cell death in chronic lymphocytic leukemia mediated through a reactive oxygen species-dependent pathway. *Oncotarget.* 2016 Jan 19;7(3):2809–22

Keehn CA et al. 2007

Keehn CA, Belongie IP, Shistik G, Fenske NA, Glass LF. The diagnosis, staging, and treatment options for mycosis fungoides. *Cancer Control.* 2007 Apr;14(2):102-11.

Keene and Forman, 1982

Keene, J. A., and Forman, J. (1982). Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 155, 768-782

Kelemen K et al. 2008

Kelemen K, Guitart J, Kuzel TM, Goolsby CL, Peterson LC. The usefulness of CD26 in flow cytometric analysis of peripheral blood in Sézary syndrome. *Am J Clin Pathol.* 2008 Jan;129(1):146-56.

Kieffer JD et al. 2001

Kieffer JD, Fuhlbrigge RC, Armerding D, et al. Neutrophils, monocytes, and dendritic cells express the same specialized form of PSGL-1 as do skin-homing memory T cells: cutaneous lymphocyte antigen. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285:577–587.

Kiel MJ et al. 2015

Kiel MJ, Sahasrabudhe AA, Rolland DCM, Velusamy T, Chung F, Schaller M, Bailey NG, Betz BL, Miranda RN, Porcu P, Byrd JC, Medeiros LJ, Kunkel SL, Bahler DW, Lim MS, Elenitoba-Johnson KSJ. Genomic analyses reveal recurrent mutations in epigenetic modifiers and the JAK-STAT pathway in Sézary syndrome. *Nat Commun.* 2015 Sep 29;6:8470.

Kim et al. 1998

Kim, C. H., Rott, L. S., Clark-Lewis, I., Campbell, D. J., Wu, L., and Butcher, E. C. (2001). Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med* 193, 1373-1381.

Kim EJ et al. 2005

Kim EJ, Hess S, Richardson SK, Newton S, Showe LC, Benoit BM, Ubriani R, Vittorio CC, Junkins-Hopkins JM, Wysocka M, Rook AH. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest.* 2005 Apr;115(4):798-812.

Kim YH et al. 2018

Kim YH, Bagot M, Pinter-Brown L, Rook AH, Porcu P, Horwitz SM, Whittaker S, Tokura Y, Vermeer M, Zinzani PL, Sokol L, Morris S, Kim EJ, Ortiz-Romero PL, Eradat H, Scarisbrick J, Tsianakas A, Elmets C, Dalle S, Fisher DC, Halwani A, Poligone B, Greer J, Fierro MT, Khot A, Moskowitz AJ, Musiek A, Shustov A, Pro B, Geskin LJ, Dwyer K, Moriya J, Leoni M, Humphrey JS, Hudgens S, Grebennik DO, Tobinai K, Duvic M; MAVORIC Investigators. Mogamulizumab versus vorinostat in previously treated cutaneous T-cell lymphoma (MAVORIC): an international, open-label, randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018 Sep;19(9):1192-1204.

Kirsch IR et al. 2015

Kirsch IR, Watanabe R, O'Malley JT, Williamson DW, Scott LL, Elco CP, Teague JE, Gehad A, Lowry EL, LeBoeuf NR, Krueger JG, Robins HS, Kupper TS, Clark RA. TCR sequencing facilitates diagnosis and identifies mature T cells as the cell of origin in CTCL. *Sci Transl Med.* 2015 Oct 7;7(308):308ra158.

Kishimoto TK et al. 1994

Kishimoto TK, Rothlein R. Integrins, ICAMs, and selectins: role and regulation of adhesion molecules in neutrophil recruitment to inflammatory sites. *Adv Pharmacol.* 1994;25:117–169

Klemke CD et al. 2008

Klemke CD, Brade J, Weckesser S, Sachse MM, Booken N, Neumaier M, Goerdts S, Nebe TC. The diagnosis of Sézary syndrome on peripheral blood by flow cytometry requires the use of multiple markers. *Br J Dermatol.* 2008 Sep;159(4):871-80.

Klemke CD et al. 2009

Klemke CD, Brenner D, Weiß E-M, Schmidt M, Leverkus M, Gülow K, et al. Lack of T-Cell Receptor-Induced Signaling Is Crucial for CD95 Ligand Up-regulation and Protects Cutaneous T-Cell Lymphoma Cells from Activation-Induced Cell Death. *Cancer Res.* 2009 May 15;69(10):4175–83.

Klemke CD et al. 2015

Klemke CD, Booken N, Weiss C, Nicolay JP, Goerdts S, Felcht M, Géraud C, Kempf W, Assaf C, Ortonne N, Battistella M, Bagot M, Knobler R, Quaglino P, Arheiliger B, Santucci M, Jansen P, Vermeer MH, Willemze R. Histopathological and immunophenotypical criteria for the diagnosis of Sézary syndrome in differentiation from other erythrodermic skin diseases: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Cutaneous Lymphoma Task Force Study of 97 cases. *Br J Dermatol.* 2015 Jul;173(1):93-105.

Knobler R et al. 2009

Knobler R, Barr ML, Couriel DR, Ferrara JL, French LE, Jaksch P, Reinisch W, Rook AH, Schwarz T, Greinix H. Extracorporeal photopheresis: past, present, and future. *J Am Acad Dermatol.* 2009 Oct;61(4):652-65.

Kobayashi H et al. 2020

Kobayashi H, Griffiths GL, Choyke PL. Near-Infrared Photoimmunotherapy: Photoactivatable Antibody-Drug Conjugates (ADCs). *Bioconjug Chem.* 2020 Jan 15;31(1):28-36.

Kobayashi H et al. 2021

Kobayashi H, Furusawa A, Rosenberg A, Choyke PL. Near-infrared photoimmunotherapy of cancer: a new approach that kills cancer cells and enhances anti-cancer host immunity. *Int Immunol.* 2021 Jan 1;33(1):7-15

Krejsgaard T et al. 2010

Krejsgaard T, Kopp K, Ralfkiaer E, Willumsgaard AE, Eriksen KW, Labuda T, Rasmussen S, Mathiesen AM, Geisler C, Lauenborg B, Becker JC, Zhang Q, Wasik MA, Odum N, Woetmann A. A novel xenograft model of cutaneous T-cell lymphoma. *Exp Dermatol.* 2010 Dec;19(12):1096-102.

Kremer KN et al. 2003

Kremer KN, Humphreys TD, Kumar A, Qian N-X, Hedin KE. Distinct role of ZAP-70 and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa in the prolonged activation of extracellular signal-regulated protein kinase by the stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCL12 chemokine. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2003 Jul 1;171(1):360–7.

Krieg C et al. 2009

Krieg C, Boyman O. The role of chemokines in cancer immune surveillance by the adaptive immune system. *Semin Cancer Biol.* 2009;19:76–83

Krueger JG, 2002

Krueger JG. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol.* 2002;46:1–6. // Nograles KE et al. 2010 - Nograles KE, Davidovici B, Krueger JG. New insights in the immunologic basis of psoriasis. *Semin Cutan Med Surg.* 2010;29:3–9

Kumar A et al. 2006

Kumar A, Humphreys TD, Kremer KN, Bramati PS, Bradfield L, Edgar CE, Hedin KE. CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells. *Immunity.* 2006 Aug;25(2):213-24.

Kummitha CM et al. 2012

Kummitha CM, Shirure VS, Delgadillo LF, Deosarkar SP, Tees DFJ, Burdick MM, et al. HECA-452 is a non-function blocking antibody for isolated sialyl Lewis x adhesion to endothelial expressed E-selectin under flow conditions. *J Immunol Methods.* 2012 Oct;384(1–2):43–50.

L**Laharanne E et al. 2010**

Laharanne E, Oumouhou N, Bonnet F, Carlotti M, Gentil C, Chevret E, Jouary T, Longy M, Vergier B, Beylot-Barry M, Merlio JP. Genome-wide analysis of cutaneous T-cell lymphomas identifies three clinically relevant classes. *J Invest Dermatol.* 2010 Jun;130(6):1707-18.

Lamprecht B et al. 2012

Lamprecht B, Kreher S, Möbs M, Sterry W, Dörken B, Janz M, Assaf C, Mathas S. The tumour suppressor p53 is frequently nonfunctional in Sézary syndrome. *Br J Dermatol.* 2012 Aug;167(2):240-6.

Langrish CL et al. 2005

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005;201:233–240

Laribi K et al. 2017

Laribi K, Lemaire P, Sandrini J, Baugier de Materre A. Advances in the understanding and management of T-cell prolymphocytic leukemia. *Oncotarget.* 2017 Nov 1;8(61):104664-104686.

Larocca C et al. 2019

Larocca C, Kupper T. Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: An Update. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2019 Feb;33(1):103-120.

Law H et al. 2020

Law H, Venturi V, Kelleher A, Munier CML. Tfh Cells in Health and Immunity: Potential Targets for Systems Biology Approaches to Vaccination. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 12;21(22):8524.

Lee BN et al. 1999

Lee BN, Duvic M, Tang CK, Bueso-Ramos C, Estrov Z, Reuben JM. Dysregulated synthesis of intracellular type 1 and type 2 cytokines by T cells of patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999 Jan;6(1):79-84.

Lee HO et al. 2011

Lee HO, Mullins SR, Franco-Barraza J, Valianou M, Cukierman E, Cheng JD. FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. *BMC Cancer.* 2011 Jun 13;11:245.

Leung DY et al. 1995

Leung DY, Gately M, Trumble A, Ferguson-Darnell B, Schlievert PM, Picker LJ. Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen, via stimulation of interleukin 12 production. *J Exp Med.* 1995 Feb 1;181(2):747-53.

Lévesque JP et al. 1999

Lévesque JP, Zannettino AC, Pudney M, Niutta S, Haylock DN, Snapp KR, Kansas GS, Berndt MC, Simmons PJ. PSGL-1-mediated adhesion of human hematopoietic progenitors to P-selectin results in suppression of hematopoiesis. *Immunity.* 1999 Sep;11(3):369-78.

Ley K et al. 2004

Ley K, Kansas GS. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2004 May;4(5):325-35.

Litvinov IV et al. 2017

Litvinov IV, Tetzlaff MT, Thibault P, Gangar P, Moreau L, Watters AK, Netchiporouk E, Pehr K, Prieto VG, Rahme E, Provost N, Gilbert M, Sasseville D, Duvic M. Gene expression analysis in Cutaneous T-Cell Lymphomas (CTCL) highlights disease heterogeneity and potential diagnostic and prognostic indicators. *Oncoimmunology.* 2017 Mar 17;6(5):e1306618.

Lu D et al. 2001

Lu D, Duvic M, Medeiros LJ, et al. The T-cell chemokine receptor CXCR3 is expressed highly in low-grade mycosis fungoides. *Am J Clin Pathol.* 2001;115:413–421

Luckheeram RV et al 2012

Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. 2012. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* 2012:925135.

M

Magro CM et al. 2001

Magro CM, Dyrsen ME. Cutaneous lymphocyte antigen expression in benign and neoplastic cutaneous B- and T-cell lymphoid infiltrates. *J Cutan Pathol.* 2008;35:1040–1049.

Magro CM et al. 2008

Magro CM, Dyrsen ME. Cutaneous lymphocyte antigen expression in benign and neoplastic cutaneous B- and T-cell lymphoid infiltrates. *J Cutan Pathol.* 2008;35:1040–1049

Maj J et al. 2015

Maj J, Jankowska-Konsur AM, Hałoń A, Woźniak Z, Plomer-Niezgoda E, Reich A. Expression of CXCR4 and CXCL12 and their correlations to the cell proliferation and angiogenesis in mycosis fungoides. *Adv Dermatol Allergol Postepy Dermatol Alergol.* 2015 Dec;32(6):437

Mann DL et al. 1989

Mann DL, O'Brien SJ, Gilbert DA, Reid Y, Popovic M, Read-Connole E, Gallo RC, Gazdar AF. Origin of the HIV-susceptible human CD4+ cell line H9. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1989 Jun;5(3):253-5.

Mao X et al. 2002

Mao X, Lillington D, Scarisbrick JJ, Mitchell T, Czepulkowski B, Russell-Jones R, Young B, Whittaker SJ. Molecular cytogenetic analysis of cutaneous T-cell lymphomas: identification of common genetic alterations in Sézary syndrome and mycosis fungoides. *Br J Dermatol.* 2002 Sep;147(3):464-75.

Mao X et al. 2011

Mao X, Chaplin T, Young BD. Integrated genomic analysis of sézary syndrome. *Genet Res Int.* 2011;2011:980150.

Marcos-Garcés V et al. 2014

Marcos-Garcés V, Molina Aguilar P, Bea Serrano C, García Bustos V, Benavent Seguí J, Ferrández Izquierdo A, Ruiz-Saurí A. Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing - a morphometric and comparative study. *J Anat.* 2014 Jul;225(1):98-108.

Masopust, D et al. 2001

Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L. & Lefrançois, L. Pillars article: preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science.* 2001. 291: 2413-2417. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **192**, 845–849 (2014).

Maverakis E et al. 2015

Maverakis E, Kim K, Shimoda M, Gershwin ME, Patel F, Wilken R, Raychaudhuri S, Ruhaak LR, Lebrilla CB. Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: a critical review. *J Autoimmun.* 2015 Feb;57:1-13

Michel L et al. 2013

Michel L, Jean-Louis F, Begue E, Bensussan A, Bagot M. Use of PLS3, Twist, CD158k/KIR3DL2, and NKp46 gene expression combination for reliable Sézary syndrome diagnosis. *Blood.* 2013 Feb 21;121(8):1477-8.

Mishra A et al. 2016

Mishra A, La Perle K, Kwiatkowski S, Sullivan LA, Sams GH, Johns J, Curphey DP, Wen J, McConnell K, Qi J, Wong H, Russo G, Zhang J, Marcucci G, Bradner JE, Porcu P, Caligiuri MA. Mechanism, Consequences, and Therapeutic Targeting of Abnormal IL15 Signaling in Cutaneous T-cell Lymphoma. *Cancer Discov.* 2016 Sep;6(9):986-1005.

Mistry N et al. 2015

Mistry N, Gupta A, Alavi A, Sibbald RG. A review of the diagnosis and management of erythroderma (generalized red skin). *Adv Skin Wound Care*. 2015 May;28(5):228-36; quiz 237-8.

Moins-Teisserenc H et al. 2015

Moins-Teisserenc H, Daubord M, Clave E, Douay C, Félix J, Marie-Cardine A, Ram-Wolff C, Maki G, Beldjord K, Homyrda L, Michel L, Bensussan A, Toubert A, Bagot M. CD158k is a reliable marker for diagnosis of Sézary syndrome and reveals an unprecedented heterogeneity of circulating malignant cells. *J Invest Dermatol*. 2015 Jan;135(1):247-257. doi: 10.1038/jid.2014.356. Epub 2014 Aug 26. PMID: 25158034.

Mondal N et al. 2015

Mondal N, Buffone A Jr, Stolfa G, Antonopoulos A, Lau JT, Haslam SM, Dell A, Neelamegham S. ST3Gal-4 is the primary sialyltransferase regulating the synthesis of E-, P-, and L-selectin ligands on human myeloid leukocytes. *Blood*. 2015 Jan 22;125(4):687-96.

Morales Suárez-Varela MM et al. 2000

Morales Suárez-Varela MM, Llopis González A, Marquina Vila A, Bell J. Mycosis fungoides: review of epidemiological observations. *Dermatology*. 2000;201(1):21-8.

Moser, B et al. 2001

Moser, B. & Loetscher, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.* **2**, 123–128 (2001).

Mullins IM et al. 2004

Mullins IM, Slingluff CL, Lee JK, et al. CXC chemokine receptor 3 expression by activated CD8+ T cells is associated with survival in melanoma patients with stage III disease. *Cancer Res*. 2004;64:7697–7701

Muniesa C et al. 2010

Muniesa C, Estrach T, Pujol RM, Gallardo F, Garcia-Muret P, Climent J, Servitje O. Folliculotropic mycosis fungoides: clinicopathological features and outcome in a series of 20 cases. *J Am Acad Dermatol*. 2010 Mar;62(3):418-26.

Muz B et al. 2015

Muz B, Azab F, de la Puente P, Rollins S, Alvarez R, Kawar Z, Azab AK. Inhibition of P-Selectin and PSGL-1 Using Humanized Monoclonal Antibodies Increases the Sensitivity of Multiple Myeloma Cells to Bortezomib. *Biomed Res Int*. 2015;2015:417586.

N

Nagler AR et al. 2012

Nagler AR, Samimi S, Schaffer A, Vittorio CC, Kim EJ, Rook AH. Peripheral blood findings in erythrodermic patients: importance for the differential diagnosis of Sézary syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Mar;66(3):503-8.

Najidh S et al. 2021

Najidh S, Tensen CP, van der Sluijs-Gelling AJ, Teodosio C, Cats D, Mei H, Kuipers TB, Out-Luijting JJ, Zoutman WH, van Hall T, Orfao A, Almeida J, van Dongen JJM, Vermeer MH. Improved Sézary cell detection and novel insights into immunophenotypic and molecular heterogeneity in Sézary syndrome. *Blood*. 2021 Dec 16;138(24):2539-2554.

Narducci MG et al. 2006

Narducci MG, Scala E, Bresin A, Caprini E, Picchio MC, Remotti D, et al. Skin homing of Sézary cells involves SDF-1-CXCR4 signaling and down-regulation of CD26/dipeptidylpeptidase IV. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):1108–15

Narducci MG et al. 2011

Narducci MG, Arcelli D, Picchio MC, Lazzeri C, Pagani E, Sampogna F, Scala E, Fadda P, Cristofolletti C, Facchiano A, Frontani M, Monopoli A, Ferracin M, Negrini M, Lombardo GA, Caprini E, Russo G. MicroRNA profiling reveals that miR-21, miR486 and miR-214 are upregulated and involved in cell survival in Sézary syndrome. *Cell Death Dis*. 2011 Apr 28;2(4):e151.

Nashan D et al. 2007

Nashan D, Faulhaber D, Ständer S, Luger TA, Stadler R. Mycosis fungoides: a dermatological masquerader. *Br J Dermatol*. 2007 Jan;156(1):1-10.

Natoni A et al. 2020

Natoni A, Farrell ML, Harris S, Falank C, Kirkham-McCarthy L, Macauley MS, et al. Sialyltransferase inhibition leads to inhibition of tumor cell interactions with E-selectin, VCAM1, and MADCAM1, and improves survival in a human multiple myeloma mouse model. *Haematologica*. 2020 Jan 31;105(2):457-467.

Nestle et al. 2009

Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, et al. (2009) Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews Immunology* 9:679-91.

Netea MG et al. 2007

Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe*. 2019 Jan 9;25(1):13-26.

Ni Z et al. 2007

Ni Z, Walcheck B. Varied levels of reactivity by different E-selectin/Fc constructs with cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)(+) CD4(+) T cells. *Immunol Lett*. 2007 Feb 15;108(2):179-82.)

Ni Z et al. 2009

Ni Z, Walcheck B. Cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) T cells up-regulate P-selectin ligand expression upon their activation. *Clin Immunol*. 2009 Nov;133(2):257-64.

Nooijen PT et al. 1998

Nooijen PT, Westphal JR, Eggermont AM, et al. Endothelial P-selectin expression is reduced in advanced primary melanoma and melanoma metastasis. *Am J Pathol*. 1998;152:679-682

Nuñez-Andrade N et al. 2011

Nuñez-Andrade N, Lamana A, Sancho D, Gisbert JP, Gonzalez-Amaro R, Sanchez-Madrid F, Urzainqui A. P-selectin glycoprotein ligand-1 modulates immune inflammatory responses in the enteric lamina propria. *J Pathol*. 2011 Jun;224(2):212-21.

O

Okazaki T et al. 2013

Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol*. 2013 Dec;14(12):1212-8.

Olsen E et al. 2007

Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, Zackheim H, Duvic M, Estrach T, Lamberg S, Wood G, Dummer R, Ranki A, Burg G, Heald P, Pittelkow M, Bernengo MG, Sterry W, Laroche L, Trautinger F, Whittaker S; ISCL/EORTC. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*. 2007 Sep 15;110(6):1713-22.

Olsen EA et al. 2011

Olsen EA, Whittaker S, Kim YH, Duvic M, Prince HM, Lessin SR, Wood GS, Willemze R, Demierre MF, Pimpinelli N, Bernengo MG, Ortiz-Romero PL, Bagot M, Estrach T, Guitart J, Knobler R, Sanches JA, Iwatsuki K, Sugaya M, Dummer R, Pittelkow M, Hoppe R, Parker S, Geskin L, Pinter-Brown L, Girardi M, Burg G, Ranki A, Vermeer M, Horwitz S, Heald P, Rosen S, Cerroni L, Dreno B, Vonderheid EC; International Society for Cutaneous Lymphomas; United States Cutaneous Lymphoma Consortium; Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. Clinical end points and response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome: a consensus statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Jun 20;29(18):2598-607.

Ortonne N et al. 2006

Ortonne N, Huet D, Gaudez C, Marie-Cardine A, Schiavon V, Bagot M, Musette P, Bensussan A. Significance of circulating T-cell clones in Sezary syndrome. *Blood*. 2006 May 15;107(10):4030-8.

Ortonne N et al. 2008

Ortonne N, Le Gouvello S, Mansour H, Poillet C, Martin N, Delfau-Larue MH, Leroy K, Farcet JP, Bagot M, Bensussan A. CD158K/KIR3DL2 transcript detection in lesional skin of patients with erythroderma is a tool for the diagnosis of Sézary syndrome. *J Invest Dermatol*. 2008 Feb;128(2):465-72.

P

Pasparakis et al. 2014

Pasparakis M, Haase I, Nestle FO (2014) Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature reviews Immunology* 14:289-301

Passaro D et al. 2015

Passaro D, Irigoyen M, Catherinet C, Gachet S, Da Costa De Jesus C, Lasgi C, et al. CXCR4 Is Required for Leukemia-Initiating Cell Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2015 Jun 8;27(6):769–79.

Phyo ZH et al. 2020

Phyo ZH, Shanbhag S, Rozati S. Update on Biology of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Front Oncol*. 2020 May 12;10:765.

Picker LJ et al. 1993

Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Bergstresser PR, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells. *J Immunol*. 1993 Feb 1;150(3):1122-36

Piepenbrink KH et al. 2013

Piepenbrink KH, Blevins SJ, Scott DR, Baker BM. The basis for limited specificity and MHC restriction in a T cell receptor interface. *Nat Commun*. 2013;4:1948.

Pimpinelli N et al. 2005

Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, Vonderheid E, Haeffner AC, Stevens S, Burg G, Cerroni L, Dreno B, Glusac E, Guitart J, Heald PW, Kempf W, Knobler R, Lessin S, Sander C, Smoller BS, Telang G, Whittaker S, Iwatsuki K, Obitz E, Takigawa M, Turner ML, Wood GS; International Society for Cutaneous Lymphoma. Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol*. 2005 Dec;53(6):1053-63.

Pitzalis C et al. 2002

Pitzalis C, Pipitone N, Perretti M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Jun;966:108-18.

Poglio S et al. 2021

Poglio S, Prochazkova-Carlotti M, Cherrier F, Gros A, Laharanne E, Pham-Ledard A, Beylot-Barry M, Merlio JP. Xenograft and cell culture models of Sézary syndrome reveal cell of origin diversity and subclonal heterogeneity. *Leukemia*. 2021 Jun;35(6):1696-1709.

Pope E et al. 2010

Pope E, Weitzman S, Ngan B, Walsh S, Morel K, Williams J, Stein S, Garzon M, Knobler E, Lieber C, Turchan K, Wargon O, Tsuchiya A. Mycosis fungoides in the pediatric population: report from an international Childhood Registry of Cutaneous Lymphoma. *J Cutan Med Surg*. 2010 Jan-Feb;14(1):1-6.

Poszepczynska-Guigné E et al. 2004

Poszepczynska-Guigné E, Schiavon V, D'Incan M, Echchakir H, Musette P, Ortonne N, Boumsell L, Moretta A, Bensussan A, Bagot M. CD158k/KIR3DL2 is a new phenotypic marker of Sezary cells: relevance for the diagnosis and follow-up of Sezary syndrome. *J Invest Dermatol*. 2004 Mar;122(3):820-3.

Prasad A et al. 2016

Prasad A, Rabionet R, Espinet B, Zapata L, Puiggros A, Melero C, Puig A, Sarria-Trujillo Y, Ossowski S, Garcia-Muret MP, Estrach T, Servitje O, Lopez-Lerma I, Gallardo F, Pujol RM, Estivill X. Identification of Gene Mutations and Fusion Genes in Patients with Sézary Syndrome. *J Invest Dermatol*. 2016 Jul;136(7):1490-1499.

Prince HM et al. 2018

Prince HM, Querfeld C. Integrating novel systemic therapies for the treatment of mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2018 Sep;31(3):322-335.

Prochazkova M et al. 2007

Prochazkova M, Chevret E, Mainhaguet G, Sobotka J, Vergier B, Belaud-Rotureau MA, Beylot-Barry M, Merlio JP. Common chromosomal abnormalities in mycosis fungoides transformation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007 Sep;46(9):828-38.

Purwar R et al. 2012

Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, Kang HS, Elyaman W, Jiang X, Jetten AM, Khoury SJ, Fuhlbrigge RC, Kuchroo VK, Clark RA, Kupper TS. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med*. 2012 Aug;18(8):1248-53.

R

Ramelyte E et al. 2019

Ramelyte E, Dummer R, Guenova E. Investigative drugs for the treatment of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL): an update. *Expert Opin Investig Drugs*. 2019 Sep;28(9):799-809.

Rappl G et al. 2002

Rappl G, Abken H, Muche JM, Sterry W, Tilgen W, André S, Kaltner H, Ugurel S, Gabius HJ, Reinhold U. CD4+CD7-leukemic T cells from patients with Sézary syndrome are protected from galectin-1-triggered T cell death. *Leukemia*. 2002 May;16(5):840-5.

Rassek et al., 2020 ;

Rassek K, Iżykowska K. Single-Cell Heterogeneity of Cutaneous T-Cell Lymphomas Revealed Using RNA-Seq Technologies. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 31;12(8):2129.

Ratajczak W et al. 2018

Ratajczak W, Niedźwiedzka-Rystwej P, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. Immunological memory cells. *Cent Eur J Immunol*. 2018;43(2):194-203.

Raulet et al. 1985

Raulet, D. H., Garman, R. D., Saito, H., and Tonegawa, S. (1985). Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature* 314, 103-107

Richardson SK et al. 2007

Richardson SK, Newton SB, Bach TL, Budgin JB, Benoit BM, Lin JH, et al. Bexarotene blunts malignant T-cell chemotaxis in Sezary syndrome: Reduction of chemokine receptor 4-positive lymphocytes and decreased chemotaxis to thymus and activation-regulated chemokine. *Am J Hematol*. 2007 Sep 1;82(9):792–7.

Rivino L et al. 2004

Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J. 2004. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J Exp Med* 200:725-735

Roche PA et al. 2015

Roche PA, Furuta K. 2015. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 15:203-216.

Rodgers SD et al. 2001

Rodgers SD, Camphausen RT, Hammer DA. Tyrosine sulfation enhances but is not required for PSGL-1 rolling adhesion on P-selectin. *Biophys J*. 2001 Oct;81(4):2001-9

Roelens M et al. et al. 2017

Roelens M, Delord M, Ram-Wolff C, Marie-Cardine A, Alberdi A, Maki G, Homyrda L, Bensussan A, Bagot M, Toubert A, Moins-Teisserenc H. Circulating and skin-derived Sézary cells: clonal but with phenotypic plasticity. *Blood*. 2017 Sep 21;130(12):1468-1471.

Rohde D et al. 1992

Rohde D, Schluter-Wigger W, Mielke V, et al. Infiltration of both T cells and neutrophils in the skin is accompanied by the expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1): an immunohistochemical and ultrastructural study. *J Invest Dermatol*. 1992;98:794–799

Ruiz-Romeu E et al. 2016

Ruiz-Romeu E, Ferran M, Sagristà M, Gómez J, Giménez-Arnau A, Herszenyi K, Hólo P, Celada A, Pujol R, Santamaria-Babí LF. Streptococcus pyogenes-induced cutaneous lymphocyte antigen-positive T cell-dependent epidermal cell activation triggers TH17 responses in patients with guttate psoriasis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Aug;138(2):491-499.e6.

Ruiz-Romeu E et al. 2018

Ruiz-Romeu E, Ferran M, de Jesus-gil C, et al. Microbe-dependent induction of IL-9 by CLA(+) T cells in psoriasis and relationship with IL-17A. *J Invest Dermatol*. 2018;138:580–587

S

Saint-Ruf et al. 1994

Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H. J., and von Boehmer, H. (1994). Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 266, 1208-1212.

Sallusto F et al. 1999

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–712 (1999).

Sallusto F et al. 2004

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.

Sansom DM, 2000

Sansom, D. M. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology* **101**, 169– 177 (2000).

Santamaria LF et al. 1995

Santamaria LF, Perez Soler MT, Hauser C, et al. Allergen specificity and endothelial transmigration of T cells in allergic contact dermatitis and atopic dermatitis are associated with the cutaneous lymphocyte antigen. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;107:359–362.

Saulite I et al. 2016

Saulite I, Hoetzenecker W, Weidinger S, Cozzio A, Guenova E, Wehkamp U. Sézary Syndrome and Atopic Dermatitis: Comparison of Immunological Aspects and Targets. *Biomed Res Int.* 2016;2016:9717530.

Scharf P et al. 2020

Scharf P, Broering MF, Oliveira da Rocha GH, Farsky SHP. Cellular and Molecular Mechanisms of Environmental Pollutants on Hematopoiesis. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 23;21(19):6996.

Scarlsbrick JJ et al. 2008

Scarlsbrick JJ, Taylor P, Holtick U, Makar Y, Douglas K, Berlin G, Juvonen E, Marshall S; Photopheresis Expert Group. U.K. consensus statement on the use of extracorporeal photopheresis for treatment of cutaneous T-cell lymphoma and chronic graft-versus-host disease. *Br J Dermatol.* 2008 Apr;158(4):659-78.

Scarlsbrick JJ et al. 2015

Scarlsbrick JJ, Prince HM, Vermeer MH, Quaglino P, Horwitz S, Porcu P, Stadler R, Wood GS, Beylot-Barry M, Pham-Ledard A, Foss F, Girardi M, Bagot M, Michel L, Battistella M, Guitart J, Kuzel TM, Martinez-Escala ME, Estrach T, Papadavid E, Antoniou C, Rigopoulos D, Nikolaou V, Sugaya M, Miyagaki T, Gniadecki R, Sanches JA, Cury-Martins J, Miyashiro D, Servitje O, Muniesa C, Berti E, Onida F, Corti L, Hodak E, Amitay-Laish I, Ortiz-Romero PL, Rodríguez-Peralto JL, Knobler R, Porkert S, Bauer W, Pimpinelli N, Grandi V, Cowan R, Rook A, Kim E, Pileri A, Patrizi A, Pujol RM, Wong H, Tyler K, Stranzenbach R, Querfeld C, Fava P, Maule M, Willemze R, Evison F, Morris S, Twigger R, Talpur R, Kim J, Ognibene G, Li S, Tavallaee M, Hoppe RT, Duvic M, Whittaker SJ, Kim YH. Cutaneous Lymphoma International Consortium Study of Outcome in Advanced Stages of Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Effect of Specific Prognostic Markers on Survival and Development of a Prognostic Model. *J Clin Oncol.* 2015 Nov 10;33(32):3766-73.

Scarlsbrick JJ et al. 2018

Scarlsbrick JJ, Hodak E, Bagot M, Stranzenbach R, Stadler R, Ortiz-Romero PL, Papadavid E, Evison F, Knobler R, Quaglino P, Vermeer MH. Blood classification and blood response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome using flow cytometry: recommendations from the EORTC cutaneous lymphoma task force. *Eur J Cancer.* 2018 Apr;93:47-56.

Schadendorf D et al. 1995

Schadendorf D, Heidel J, Gawlik C, et al. Association with clinical outcome of expression of VLA-4 in primary cutaneous malignant melanoma as well as P-selectin and E-selectin on intratumoral vessels. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:366-371.

Schaerli et al. 2000

Schaerli, P., Willmann, K., Lang, A. B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *The Journal of experimental medicine* 192, 1553-1562.

Schlapbach C et al. 2014

Schlapbach C, Gehad A, Yang C, et al. Human TH9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity. *Sci Transl Med.* 2014;6:219ra8

Sciammas R et al. 1994

Sciammas R, Tatsumi Y, Sperling AI, Arunan K, Bluestone JA. Cellules delta gamma TCR : cellules mystérieuses du système immunitaire. *Immunol Res.* 1994;13(4):268-79.

Scimone et al. 2006

Scimone, M. L., Aifantis, I., Apostolou, I., von Boehmer, H., and von Andrian, U. H. (2006). A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7006-7011.

Scollay et al. 1980

Goldrath, A. W., and Bevan, M. J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, 255-262

Sekulic A et al. 2015

Sekulic A, Liang WS, Tembe W, Izatt T, Kruglyak S, Kiefer JA, Cuyugan L, Zismann V, Legendre C, Pittelkow MR, Gohmann JJ, De Castro FR, Trent J, Carpten J, Craig DW, McDaniel TK. Personalized treatment of Sézary syndrome by targeting a novel CTLA4:CD28 fusion. *Mol Genet Genomic Med.* 2015 Mar;3(2):130-6.

Sernicola A et al. 2020

Sernicola A, Russo I, Silic-Benussi M, Ciminale V, Alaibac M. Targeting the cutaneous lymphocyte antigen (CLA) in inflammatory and neoplastic skin conditions. *Expert Opin Biol Ther.* 2020 Mar;20(3):275-282.

Seto AG et al. 2018

Seto AG, Beatty X, Lynch JM, Hermreck M, Tetzlaff M, Duvic M, Jackson AL. Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2018 Nov;183(3):428-444.

Shakeri A. 2018

Shakeri A. Albert Sézary-The Man, the Cell, and the Syndrome. *JAMA Dermatol.* 2018 Apr 1;154(4):496-497.

Silic-Benussia M et al. 2021

Silic-Benussi M, Saponeri A, Michelotto A, Russo I, Colombo A, Pelizzo MG, Ciminale V, Alaibac M. Near infrared photoimmunotherapy targeting the cutaneous lymphocyte antigen for mycosis fungoides. *Expert Opin Biol Ther.* 2021 Jul;21(7):977-981.

Singer et al. 2008

Singer, A., Adoro, S., and Park, J. H. (2008). Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol* 8, 788-801.

Singer and Bosselut, 2004

Singer, A., and Bosselut, R. (2004). CD4/CD8 coreceptors in thymocyte development, selection, and lineage commitment: analysis of the CD4/CD8 lineage decision. *Adv Immunol* 83, 91-131).

Singh et al. 2008

Singh SP, Zhang HH, Foley JF, et al. (2008) Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *Journal of immunology* 180:214-21.

Sison EAR et al. 2015

Sison EAR, Magoon D, Li L, Annesley CE, Romagnoli B, Douglas GJ, et al. POL5551, a novel and potent CXCR4 antagonist, enhances sensitivity to chemotherapy in pediatric ALL. *Oncotarget.* 2015 Oct 13;6(31):30902–18)

Sixt et al. 2005

Sixt, M., Kanazawa, N., Selg, M., Samson, T., Roos, G., Reinhardt, D. P., Pabst, R., Lutz, M. B., and Sorokin, L. (2005). The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* 22, 19-29.

Spender LC et al. 2016

Spender LC, Inman GJ. Fatal attractions? Correlations of CXCL12–CXCR4–CXCR7 expression with disease progression in melanoma and Kaposi sarcoma. *Br J Dermatol.* 2016;175(6):1140–1

Snapp KR et al. 2001

Snapp KR, Heitzig CE, Ellies LG, Marth JD, Kansas GS. Differential requirements for the O-linked branching enzyme core 2 beta1-6-N-glucosaminyltransferase in biosynthesis of ligands for E-selectin and P-selectin. *Blood.* 2001 Jun 15;97(12):3806-11.

Soumelis V et al. 2002

Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol.* 2002;3:673–680 ; Czarnowicki T et al. 2015

Staal FJ et al. 2016

Staal FJ, Wiekmeijer AS, Brugman MH, Pike-Overzet K. The functional relationship between hematopoietic stem cells and developing T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2016 Apr;1370(1):36-44.

Streilein, 1983

Streilein JW (1983) Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *The Journal of investigative dermatology* 80 Suppl:12s-6s

Sun and Bevan, 2003

Sun, J. C., and Bevan, M. J. (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300, 339-342

Suzuki Y et al. 2001

Suzuki Y, Rahman M, Mitsuya H. Diverse transcriptional response of CD4+ T cells to stromal cell-derived factor SDF-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4+ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2001 Sep 15;167(6):3064–73

Swain SL et al. 2012

Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. 2012. Expandin

T

Taswell HF et al. 1961

Taswell HF, Winkelmann RK. Sezary syndrome--a malignant reticulemic erythroderma. *JAMA.* 1961 Aug 19;177:465-72.

Tay et al. 2014

Tay SS, Roediger B, Tong PL, et al. (2014) The Skin-Resident Immune Network. *Current dermatology reports* 3:13-22

Templeton K et al. 2021

Templeton K, Ramos M, Rose J, Le B, Zhou Q, Cressman A, et al. Mesenchymal Stromal Cells Regulate Sialylations of N-Glycans, Affecting Cell Migration and Survival. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 26;22(13):6868.

Teraki Y et al. 2000

Teraki Y, Hotta T, Shiohara T. Increased circulating skin-homing cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)+ type 2 cytokine-producing cells, and decreased CLA+ type 1 cytokine-producing cells in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2000;143:373–378

Thelen M et al. 2008

Thelen M, Stein JV. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol.* 2008;9:953–959.

Thorleifsdottir RH et al. 2016

Thorleifsdottir RH, Eysteinsdóttir JH, Olafsson JH, Sigurdsson MI, Johnston A, Valdimarsson H, Sigurgeirsson B. Throat Infections are Associated with Exacerbation in a Substantial Proportion of Patients with Chronic Plaque Psoriasis. *Acta Derm Venereol.* 2016 Aug 23;96(6):788-91

Thulabandu V et al. 2018

Thulabandu V, Chen D, Atit RP. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2018 Mar;7(2):10.1002/wdev.307

Tinoco R et al. 2016

Tinoco R, Carrette F, Barraza ML, Otero DC, Magaña J, Bosenberg MW, Swain SL, Bradley LM. PSGL-1 Is an Immune Checkpoint Regulator that Promotes T Cell Exhaustion. *Immunity.* 2016 May 17;44(5):1190-203.

Tinoco R et al. 2017

Tinoco R, Otero DC, Takahashi AA, Bradley LM. PSGL-1: A New Player in the Immune Checkpoint Landscape. *Trends Immunol.* 2017 May;38(5):323-335.

Townsend EC et al. 2016

Townsend EC, Murakami MA, Christodoulou A, Christie AL, Köster J, DeSouza TA, Morgan EA, Kallgren SP, Liu H, Wu SC, Plana O, Montero J, Stevenson KE, Rao P, Vadhi R, Andreeff M, Armand P, Ballen KK, Barzaghi-Rinaudo P, Cahill S, Clark RA, Cooke VG, Davids MS, DeAngelo DJ, Dorfman DM, Eaton H, Ebert BL, Etchin J, Firestone B, Fisher DC, Freedman AS, Galinsky IA, Gao H, Garcia JS, Garnache-Ottou F, Graubert TA, Gutierrez A, Halilovic E, Harris MH, Herbert ZT, Horwitz SM, Inghirami G, Intlekofer AM, Ito M, Izraeli S, Jacobsen ED, Jacobson CA, Jeay S, Jeremias I, Kelliher MA, Koch R, Konopleva M, Kopp N, Kornblau SM, Kung AL, Kupper TS, LeBoeuf NR, LaCasce AS, Lees E, Li LS, Look AT, Murakami M, Muschen M, Neuberg D, Ng SY, Odejide OO, Orkin SH, Paquette RR, Place AE, Roderick JE, Ryan JA, Sallan SE, Shoji B, Silverman LB, Soiffer RJ, Steensma DP, Stegmaier K, Stone RM, Tamburini J, Thorner AR, van Hummelen P, Wadleigh M, Wiesmann M, Weng AP, Wuerthner JU, Williams DA, Wollison BM, Lane AA, Letai A, Bertagnolli MM, Ritz J, Brown M, Long H, Aster JC, Shipp MA, Griffin JD, Weinstock DM. The Public Repository of Xenografts Enables Discovery and Randomized Phase II-like Trials in Mice. *Cancer Cell.* 2016 Apr 11;29(4):574-586.

Trautinger F et al. 2017

Trautinger F, Eder J, Assaf C, Bagot M, Cozzio A, Dummer R, Gniadecki R, Klemke CD, Ortiz-Romero PL, Papadavid E, Pimpinelli N, Quaglino P, Ranki A, Scarisbrick J, Stadler R, Väkevä L, Vermeer MH, Whittaker S, Willemze R, Knobler R. European Organisation for Research and Treatment of Cancer consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome - Update 2017. *Eur J Cancer.* 2017 May;77:57-74.

Trinchieri G et al. 2003

Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19:641- 644.

Tsuchiyama J et al. 2002

Tsuchiyama J, Yoshino T, Toba K, et al. Induction and characterization of cutaneous lymphocyte antigen on natural killer cells. *Br J Haematol.* 2002;118:654–662

Turner SJ et al. 2006

Turner SJ, Doherty PC, McCluskey J, Rossjohn J. 2006. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat Rev Immunol* 6:883-894.

Tuthill RJ et al. 2002

Tuthill RJ, Unger JM, Liu PY, et al. Risk assessment in localized primary cutaneous melanoma: a Southwest Oncology Group study evaluating nine factors and a test of the Clark logistic regression prediction model. *Am J Clin Pathol.* 2002;118:504–51

U

Urzainqui A et al. 2007

Urzainqui A, Martínez del Hoyo G, Lamana A, de la Fuente H, Barreiro O, Olazabal IM, Martin P, Wild MK, Vestweber D, González-Amaro R, Sánchez-Madrid F. Functional role of P-selectin glycoprotein ligand 1/P-selectin interaction in the generation of tolerogenic dendritic cells. *J Immunol.* 2007 Dec 1;179(11):7457-65.

V

Valdimarsson H et al. 2009

Valdimarsson H, Thorleifsdottir RH, Sigurdardottir SL, et al. Psoriasis—as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends Immunol.* 2009;30:494–501

van der Burg M et al. 2014

van der Burg M, van Zelm MC. Clinical Spectrum of SCID: The Key is in the Thymus? *Front Immunol.* 2014 Mar 19;5:111.

van der Fits L et al. 2012

van der Fits L, Rebel HG, Out-Luiting JJ, Pouw SM, Smit F, Vermeer KG, van Zijl L, Tensen CP, Weijer K, Vermeer MH. Un nouveau modèle murin pour le syndrome de Sézary utilisant la xénotransplantation de cellules de Sézary en souris immunodéficientes RAG2(-/-) γ c(-/-). *Exp Dermatol.* 2012 Sept;21(9):706-9

van Dongen JJ et al. 2003

van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. 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 Dec;17(12):2257-317.

van Doorn R et al. 2009

van Doorn R, van Kester MS, Dijkman R, Vermeer MH, Mulder AA, Szuhai K, Knijnenburg J, Boer JM, Willemze R, Tensen CP. Oncogenomic analysis of mycosis fungoides reveals major differences with Sezary syndrome. *Blood.* 2009 Jan 1;113(1):127-36.

Vaqué JP et al. 2014

Vaqué JP, Gómez-López G, Monsálvez V, Varela I, Martínez N, Pérez C, Domínguez O, Graña O, Rodríguez-Peralto JL, Rodríguez-Pinilla SM, González-Vela C, Rubio-Camarillo M, Martín-Sánchez E, Pisano DG, Papadavid E, Papadaki T, Requena L, García-Marco JA, Méndez M, Provencio M, Hospital M, Suárez-Massa D, Postigo C, San Segundo D, López-Hoyos M, Ortiz-Romero PL, Piris MA, Sánchez-Beato M. PLCG1 mutations in cutaneous T-cell lymphomas. *Blood.* 2014 Mar 27;123(13):2034-43.

Veldman GM et al. 1995

Veldman GM, Bean KM, Cumming DA, Eddy RL, Sait SN, Shows TB. Genomic organization and chromosomal localization of the gene encoding human P-selectin glycoprotein ligand. *J Biol Chem.* 1995 Jul 7;270(27):16470-5.

Vergier B et al. 1996

Vergier B, Beylot-Barry M, Beylot C, de Mascarel A, Delaunay M, de Muret A, Vaillant L, Tortel MC, Grange F, Bagot M, Laroche L, Wecshler J. Pilotropic cutaneous T-cell lymphoma without mucinosis. A variant of mycosis fungoides? French Study Group of Cutaneous Lymphomas. *Arch Dermatol.* 1996 Jun;132(6):683-7.

Vergier B et al. 2000

Vergier B, de Muret A, Beylot-Barry M, Vaillant L, Ekouevi D, Chene G, Carlotti A, Franck N, Dechelotte P, Souteyrand P, Courville P, Joly P, Delaunay M, Bagot M, Grange F, Fraitag S, Bosq J, Petrella T, Durlach A, De Mascarel A, Merlio JP, Wechsler J. Transformation of mycosis fungoides: clinicopathological and prognostic features of 45 cases. French Study Group of Cutaneous Lymphomas. *Blood.* 2000 Apr 1;95(7):2212-8.

Vermeer MH et al. 2008

Vermeer MH, van Doorn R, Dijkman R, Mao X, Whittaker S, van Voorst Vader PC, Gerritsen MJ, Geerts ML, Gellrich S, Söderberg O, Leuchowius KJ, Landegren U, Out-Luiting JJ, Knijnenburg J, Ijszenga M, Szuhai K, Willemze R, Tensen CP. Novel and highly recurrent chromosomal alterations in Sézary syndrome. *Cancer Res.* 2008 Apr 15;68(8):2689-98.

Vissers WHPM et al. 2004

Vissers WHPM, Arndtz CHM, Muys L, et al. Memory effector (CD45RO+) and cytotoxic (CD8+) T cells appear early in the margin zone of spreading psoriatic lesions in contrast to cells expressing natural killer receptors, which appear late. *Br J Dermatol.* 2004;150:852–859

von Boehmer, 2005

von Boehmer, H. (2005). Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol* 5, 571-577.

Vowels BR et al. 1992

Vowels BR, Cassin M, Vonderheid EC, Rook AH. Aberrant cytokine production by Sezary syndrome patients: cytokine secretion pattern resembles murine Th2 cells. *J Invest Dermatol.* 1992 Jul;99(1):90-4.

W

Wang L et al. 2015

Wang L, Ni X, Covington KR, Yang BY, Shiu J, Zhang X, Xi L, Meng Q, Langridge T, Drummond J, Donehower LA, Doddapaneni H, Muzny DM, Gibbs RA, Wheeler DA, Duvic M. Genomic profiling of Sézary syndrome identifies alterations of key T cell signaling and differentiation genes. *Nat Genet.* 2015 Dec;47(12):1426-34.

Watanabe et al. 2015

Watanabe R, Gehad A, Yang C, et al. (2015) Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. *Science translational medicine* 7:279ra39

Weishaupt C et al. 2007

Weishaupt C, Munoz KN, Buzney E, et al. T-cell distribution and adhesion receptor expression in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13:2549–2556.

Welchsler J et al. 2003

Wechsler J, Bagot M, Nikolova M, Parolini S, Martin-Garcia N, Boumsell L, Moretta A, Bensussan A. Killer cell immunoglobulin-like receptor expression delineates in situ Sézary syndrome lymphocytes. *J Pathol.* 2003 Jan;199(1):77-83.

Weninger W et al. 2001

Weninger, W., Crowley, M. A., Manjunath, N. & von Andrian, U. H. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* **194**, 953–966 (2001).

Wilcox RA, 2014

Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2014 Aug;89(8):837-51.

Wilcox RA, 2017

Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2017 Oct;92(10):1085-1102.

Willemze R et al. 2005

Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, Ralfkiaer E, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Duncan LM, Grange F, Harris NL, Kempf W, Kerl H, Kurrer M, Knobler R, Pimpinelli N, Sander C, Santucci M, Sterry W, Vermeer MH, Wechsler J, Whittaker S, Meijer CJ. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood.* 2005 May 15;105(10):3768-85.

Willemze R et al. 2009

Willemze R, Dreyling M; ESMO Guidelines Working Group. Primary cutaneous lymphoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2009 May;20 Suppl 4:115-8.

Willemze R et al. 2019

Willemze R, Cerroni L, Kempf W, Berti E, Facchetti F, Swerdlow SH, Jaffe ES. The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood.* 2019 Apr 18;133(16):1703-1714.

Witt et al. 2005

Witt, C. M., Raychaudhuri, S., Schaefer, B., Chakraborty, A. K., and Robey, E. A. (2005). Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS Biol* 3, e160.

Wong HK, 2013

Wong HK. Novel biomarkers, dysregulated epigenetics, and therapy in cutaneous T-cell lymphoma. *Discov Med.* 2013 Sep;16(87):71-8.

Wood GS et al. 1993

Wood GS, Bahler DW, Hoppe RT, Warnke RA, Sklar JL, Levy R. Transformation of mycosis fungoides: T-cell receptor beta gene analysis demonstrates a common clonal origin for plaque-type mycosis fungoides and CD30+ large-cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 1993 Sep;101(3):296-300.

Wood GS et al. 2003

Wood GS, Greenberg HL. Diagnosis, staging, and monitoring of cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Ther.* 2003;16(4):269-75. doi: 10.1111/j.1396-0296.2003.01637.x. PMID: 14686968.

Woodland DL et al. 2009

Woodland DL, Kohlmeier JE. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:153–161.

Wu CH et al. 2021

Wu CH, Yang CY, Wang L, Gao HX, Rakhshandehroo T, Afghani S, Pincus L, Balassanian R, Rubenstein J, Gill R, Bandyopadhyay S, McCormick F, Moasser M, Ai WZ. Cutaneous T-Cell Lymphoma PDX Drug Screening Platform Identifies Cooperation between Inhibitions of PI3K α/δ and HDAC. *J Invest Dermatol.* 2021 Feb;141(2):364-373.

Wu X et al. 2011

Wu X, Sells RE, Hwang ST. Upregulation of inflammatory cytokines and oncogenic signal pathways preceding tumor formation in a murine model of T-cell lymphoma in skin. *J Invest Dermatol.* 2011 Aug;131(8):1727-34

Wysocka et al. 2002

Wysocka M, Zaki MH, French LE, Chehimi J, Shapiro M, Everetts SE, McGinnis KS, Montaner L, Rook AH. Sézary syndrome patients demonstrate a defect in dendritic cell populations: effects of CD40 ligand and treatment with GM-CSF on dendritic cell numbers and the production of cytokines. *Blood*. 2002 Nov 1;100(9):3287-94.

X**Xiong N et al. 2012**

Xiong N, Fu Y, Hu S, Xia M, Yang J. CCR10 and its ligands in regulation of epithelial immunity and diseases. *Protein Cell*. 2012 Aug;3(8):571-80.

Y**Yamamoto K et al. 2010**

Yamamoto K, Utsunomiya A, Tobinai K, Tsukasaki K, Uike N, Uozumi K, Yamaguchi K, Yamada Y, Hanada S, Tamura K, Nakamura S, Inagaki H, Ohshima K, Kiyoi H, Ishida T, Matsushima K, Akinaga S, Ogura M, Tomonaga M, Ueda R. Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 20;28(9):1591-8.

Yin and Li, 2006

Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1195-201.

Yoshino T et al. 1999

Yoshino T, Okano M, Chen HL, et al. Cutaneous lymphocyte antigen is expressed on memory/effector B cells in the peripheral blood and monocytoid B cells in the lymphoid tissues. *Cell Immunol*. 1999;197:39-45.

Yoshino T et al. 2002

Yoshino T, Nakamura S, Suzumiya J, et al. Expression of cutaneous lymphocyte antigen is associated with a poor outcome of nasal-type natural killer-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2002;118:482-487

Z**Zackheim HS et al. 2003**

Zackheim HS, Kashani-Sabet M, McMillan A. Low-dose methotrexate to treat mycosis fungoides: a retrospective study in 69 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2003 Nov;49(5):873-8.

Zhang C et al. 2005

Zhang C, Richon V, Ni X, Talpur R, Duvic M. Selective induction of apoptosis by histone deacetylase inhibitor SAHA in cutaneous T-cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action. *J Invest Dermatol*. 2005 Nov;125(5):1045-52.

ANNEXES

I) Matériel et Méthodes

A) Cellules de Sézary de patients

Les prélèvements sanguins ont été obtenus grâce au service d'onco-dermatologie du CHU de Bordeaux. Les patients ont donné leur consentement conformément à la déclaration d'Helsinki et aux règles éthiques nationales. Le comité d'examen institutionnel a approuvé les manipulations des échantillons du patient Sézary (DC-2008-412).

B) Préparation des cellules de patients

Les échantillons de sang de patients ont été préparés après dilution de 15 ml de sang avec un volume égal de tampon phosphate salin (PBS). Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées après ajout du mélange précédent sur gradient de densité dans un tube Falcon Pancoll (PAN BIOTECHTM, Aidenbach, Allemagne) et centrifugation 15 min à 850g. L'anneau du milieu, contenant les cellules mononucléées, a été prélevé et lavé avec du PBS. Les cellules ont été centrifugées 5 min à 180 g puis comptées. Les cellules ont été congelées à raison de 5 à 10 millions dans 1 mL de Sérum Foetal Bovin (FBS) additionné de 10 % de Diméthylsulfoxyde (DMSO).

C) Culture

1) Des cellules de patients

Les cellules de Sézary de patients purifiées et triées par cytométrie de flux, comme décrit ci-dessous, ont été cultivées comme décrit précédemment (Armstrong F et al., 2009 ; Poglio S et al., 2021). En bref, les SC ont été cultivées dans un milieu de lymphome à cellules T composé de milieu alpha-MEM, 10 % de FBS, 10 % de sérum AB humain (Institut de biotechnologie Jacques Boy, Reims, France), de *Stem Cell Factor* humain (hSCF) à 50 ng/mL, *Fms-like tyrosine kinase-3* humain (hFLT-3) à 20 ng/mL, Interleukine-7 (IL-7) à 20 ng/ml, insuline à 20 nM et 1% de pénicilline/streptomycine. Les cellules de Sézary ont été maintenues à 37°C, dans une atmosphère à 5% de CO₂, dans un incubateur.

2) Des lignées de lymphomes T cutanés primitifs

La lignée cellulaire My-La dérivant d'un MF-T a été gracieusement offerte par le Dr Kaltof (Université d'Aarhus, Danemark). Les cellules ont été cultivées dans du milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (avec 10 % de FBS et 1 % de pénicilline/streptomycine) et maintenues à une concentration minimale de 5×10^5 cellules/mL à 37 °C, dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂, dans un incubateur.

3) Des cellules endothéliales

Nous avons utilisé des HMVEC dérivés du derme et des HUVEC dérivés de veine ombilicale (LONZA, Bale, Suisse). Les cellules ont été cultivées dans une flasque à $1,25 \times 10^5$ cellules/25 cm² dans 5 ml de milieu *Endothelium Cell Basal Medium-2* (EBM-2), contenant 2 % de FBS, 0,04 % d'hydrocortisone, 0,4 % *Fibroblast Growth Factor-B* humain (hFGF-B), et 0,1 % *Vascular Endothelium Growth Factor* (VEGF), acide ascorbique, *Recombinant long R Insulin-like Growth Factor-1* (R3-IGF-1), facteur de croissance épidermique *Epidermal Growth Factor* humain (hEGF) et *Gentamicin Sulfate Amphotericin-B* (GA-1000). Lorsque les cellules étaient à 70 % de confluence, elles ont été décollées avec de la trypsine/EDTA (0,025%) préchauffées à 37°C, puis centrifugées et réensemencées. Elles ont été maintenues à 37°C, dans une atmosphère à 5% de CO₂, dans un incubateur. Tous les composés utilisés pour maintenir les cellules étaient ceux recommandés par le fournisseur de lignées cellulaires (LONZA, Bale, Suisse).

D)Caractérisation du clone TCRV β (cytométrie en flux)

Le clone de cellules T a été caractérisé par le réarrangement V β du du TCR. Le TCR V β Repertory Kit a été utilisé pour détecter le clone dominant dans les cellules de patients. Il est composé de 8 tubes contenant 3 anticorps couplés fluorochrome (FITC-PE). La coloration et les contrôles ont été effectués selon les recommandations du fournisseur avec 1 μ L d'anticorps anti-CD8-PE-Cy7 (RPA-T8), anti-CD4-BV421 (RPA-T4) et anti-CD3-APC-H7 (SK7). 2×10^5 cellules ont été marquées avec les anticorps dans 100 μ L de PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺. Après une incubation de 30 min dans l'obscurité à 4°C, les cellules ont été lavées avec 1 ml de PBS pour éliminer les anticorps non fixés. Après centrifugation pendant 5 min à 180g, les cellules ont été reprises dans 500 μ L de PBS afin d'être analysées par cytométrie de flux. Les analyses ont été réalisées avec un FACS Canto II (BD, Biosciences, New Jersey, USA) sur la plateforme UB'Facility (TBM Core, Bordeaux). Le logiciel BD FACSDiva™ (BD, Biosciences, New Jersey, USA) a été utilisé pour l'interprétation des données.

E) Quantification de l'expression de CLA

Pour les cellules SS de patients, un blocage des monocytes et des lymphocytes B a été réalisé en traitant les cellules avec une protéine recombinante qui mime le fragment Fc des anticorps (BD Fc Block humain, BD Biosciences, New Jersey, USA) pendant 10 min à 4°C. Cela permet d'éviter la fixation d'anticorps fluorescents sur ces sites et donc d'éviter la détection de faux positifs lors de l'acquisition. Les anticorps utilisés ici étaient anti-CLA-APC (HECA-452), anti-TCRVβ-PE (clone dominant), anti-CD45RO-FITC (UCHL1) et anti-CD3-APC-H7 (SK7). L'acquisition et l'analyse ont été effectuées comme indiqué précédemment. Le pourcentage de cellules CLA+ ou de cellules CD45RO+CLA+ a été quantifié par cytométrie de flux parmi les cellules TCRVβ+CD3+ et son RFI (Ratio Fluorescence Intensity) mesuré.

F) Tri des cellules de patients et des My-La

Pour les cellules SS de patients, 1×10^6 cellules ont été préalablement marquées dans 100 μL de PBS avec des anticorps anti-TCRVβ-PE, anti-CD8-PE-Cy7, anti-CD4-BV421 et anti-CD3-APC-H7, comme mentionné ci-dessus. Après centrifugation, les cellules ont été réhomogénéisées avec 500 μL de PBS et 2 % de FBS + HEPES/EDTA. Les cellules ont été triées à l'aide de BDFACSAria™, disponible à la plateforme UB'Facility (TBM Core, Bordeaux), afin de sélectionner la population cellulaire clonale. Les cellules TCRVβ+ ont été sélectionnées parmi les cellules CD3+, CD4+ et CD8- et un test de pureté a été réalisé pour confirmer que seulement les cellules des patients SS ont été sélectionnées. Pour les cellules My-La transduites, les cellules transduites étaient positives pour la GFP. Les cellules ont été triées en sélectionnant les cellules GFP+.

G) Transduction des cellules My-La

Des vecteurs pLKO.1-U6-GFP contenant un gène rapporteur Green Fluorescent Protein (GFP) et un shARN Contrôle ou shARN ST3Gal-4 exon5 ou exon8 ont été produits dans notre laboratoire grâce au Dr David Cappellen et Yamina Idrissi. La production des lentivirus a été réalisée par la plateforme de Vectorologie TBMCORE de Bordeaux. La lignée My-La a été transduite à raison de 10^5 cellules par puits de plaques 24 puits dans 500 L de milieu RPMI + 10% SVF. Les virus ont été ajoutés à la culture avec une Multiplicité D'Infection (MOI) de 10. Après 3 jours à 37°C avec 5% de CO₂, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et reprises dans du nouveau milieu de culture.

H) Migration trans-endothéliale

1) Des cellules triées de patients et de la lignée cellulaire My-La

Des plaques 24 puits contenant des transwells poreux de 5 µm ont été utilisées pour les cellules de patients SS et des plaques 12 puits contenant des transwells poreux de 8 µm (ThinCert™, Greiner Bio-one) ont été utilisées pour la lignée cellulaire My-La. Les Transwells ont été revêtus, 2 jours avant le test de migration, de 200 µL de solution de gélatine à 0,2 %. Après 1h à 37°C, le liquide en excès a été prélevé et des cellules HMVECs ou HUVECs ont étéensemencées dans des transwells avec une quantité de $1,5 \times 10^5$ cellules dans 150 µL de milieu. Après 2 jours, le milieu des cellules endothéliales a été soigneusement aspiré. Différentes conditions de chimio-attractants ont été ajoutées dans les chambres inférieures : 100 ng/mL du chimio-attractif SDF-1, 100 ng/mL de CCL19/21, dilué dans le milieu (400 µL par puits en plaques 24 puits ou 750 µL par puits dans des plaques 12 puits). 5×10^5 cellules de patients SS triées ou cellules My-La ont été pré-traitées avec 30 ou 15 µg/mL de mAb anti-CLA (HECA-452, Biolegend) ou son isotype contrôle (RTK2118) ou non traité (condition contrôle), et mis dans chaque chambre supérieure dans 150 ou 400 µL de milieu, respectivement.

2) Évaluation du pourcentage de cellules migrantes

Après 3h d'incubation à 37°C, les transwells ont été retirés et le milieu contenant les cellules migrantes dans les chambres inférieures a été prélevé. Les cellules migrantes ont été comptées avec des cellules KOVA (HYCORE BioMedical, USA). Le pourcentage de cellules migrantes a été calculé avec la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de cellules migrantes} = \frac{\text{Nombre de cellules migrantes (chambre inférieure)}}{\text{Nombre de cellules déposées (chambre supérieure)}} \times 100$$

I) Évaluation de la prolifération

Les tests de prolifération ont été effectués à l'aide de *CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester* (Cell Trace CFSE Proliferation kit, Molecular Probes) marqué sur la lignée cellulaire My-La selon les recommandations du fabricant. Les cellules transduites My-La shControl, shST3Gal-4 ex5 ou shST3Gal-4 ex8 ont été cultivées dans leur milieu pendant 3 jours et l'acquisition a été réalisée avec un cytomètre Canto II (BD, Biosciences, New Jersey, USA) à la plateforme UB'Facility (TBM Core, Bordeaux). Le logiciel FlowJo (BD, Biosciences, New Jersey, USA) a été utilisé pour l'interprétation des données.

J) Evaluation de la mort cellulaire

Le test d'apoptose-nécrose a été réalisé sur des cellules SS de patients, une lignée cellulaire My-La ou des cellules T CD4+ de donneurs sains. 1×10^5 cellules ont été cultivées en plaque 24 puits dans leur milieu et traitées avec un mAb anti-CLA ou son contrôle isotypique (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivement) pendant 3 ou 72 heures avec un traitement toutes les 24h. Le pourcentage de cellules mortes totales a été évalué par FACS après coloration à l'Annexine V (APC) et Hoechst comme recommandé par le fournisseur. Les cellules ont été lavées avec 1 mL de PBS froid, centrifugées à 180 g pendant 5 min et réhomogénéisées dans 100 μL de solution de *Binding Buffer Annexin V* (1x). 3 μL d'Annexine V-APC ont été ajoutés en suspension cellulaire et les cellules ont été incubées 15 min, à température ambiante, dans l'obscurité. Ensuite, 300 μL de *Binding Buffer Annexin V* (1x) et 100 μL de solution Hoechst 33342 (0,25 %) ont été ajoutés à la suspension cellulaire juste avant l'acquisition. Les cellules Annexine V- Hoechst + ont été considérées comme des cellules nécrotiques, les cellules apoptotiques précoces étaient Annexine V+ et Hoechst-, et les cellules apoptotiques tardives étaient Annexine V+ et Hoechst+. L'apoptose a également été évaluée en mesurant les activités des caspases-3/7, caspase-8, caspase-9 par FACS en utilisant le kit de détection FAM-FLICA selon les recommandations du fabricant (Biorad). L'apoptose a aussi été détectée par la perte du potentiel de la membrane mitochondriale à l'aide d'un colorant à base de *Tetramethylrhodamine methyl ester* (TMRM). Après traitement, les cellules ont été incubées avec 200 nM de TMRM pendant 30 minutes à 37°C et la fluorescence mesurée par cytométrie en flux comme décrit ci-dessus. La perte de la fluorescence correspond à une augmentation de la perméabilité des mitochondries puisque le TMRM est un cation lipophile fluorescent capable de s'accumuler dans les mitochondries actives avec des potentiels membranaires intacts.

K)RTqPCR

1) RTqPCR assay

1×10^6 cellules SS de patients par puits ont été cultivées en milieu LTC et traitées avec un mAb anti-CLA ou son contrôle isotypique (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivement) pendant 3 heures. Les cellules ont été ensuite récoltées et l'ARN total a été extrait à l'aide du Direct-zol RNA MiniPrep (ZYMO Research, Ozyme) tel que recommandé par le fabricant. La RT (kit de synthèse d'ADNc iScript, BioRad) et la qPCR (SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix) ont été effectuées sur une plaque personnalisée

contenant des amorces de différents gènes impliqués dans la signalisation, la survie et le cycle cellulaire du TCR, comme recommandé par le fabricant.

2) RTqPCR ST3Gal-4

L'ARN total des cellules transduites par shControl, shST3Gal-4 ex5 et ex8 a été extrait à l'aide du Direct-zol RNA MiniPrep (ZYMO Research, Ozyme) tel que recommandé par le fabricant. 200 ng d'ARN ont été utilisés pour générer de l'ADNc en utilisant le kit de transcriptase inverse SuperScript II (Invitrogen, France). La qPCR sur le gène ST3Gal4 a été réalisée en utilisant Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dttP Blue (Eurogentec, France) avec les amorces suivantes, sens *forward* : 5'-CAAGACGCCATCTGCTTACGA-3', et *reverse* : 5'-GCACCTGAGGCTCTGGATGTT-3'. Le Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, USA) a été utilisé pour effectuer la RTqPCR. L'expression génique a été normalisée à l'expression du gène de ménage TBP (TATA-Box Binding Protein) (amorce *forward* : 5'-CACGAACCACGGCACTGATT-3' et amorce *inverse* : 5'-TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGA-3'). L'expression relative des gènes a été calculée en utilisant le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ selon la méthode décrite par Livak et Schmittgen (2001).

L) Modèles murins

Les cellules ont été xéno greffées par voie intrahépatique (IH) ou en sous-cutané (SC) chez des souris immunodéficientes en NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) mâles âgées de 8 à 12 semaines sous anesthésie à l'isoflurane à 2,5% (Belamont, Piramal Healthcare, Northumberland, UK), comme décrit précédemment (Andrique et al., 2016). Les souris ont été suivies cliniquement pendant 2 semaines pour le modèle IH et 3-4 semaines pour les modèles SC avec une surveillance globale de la santé animale (cf schémas expérimentaux partie Résultats). Après la prise de greffe, les souris ont été sacrifiées, les poids corporels et hépatiques ont été mesurés, et le rapport foie/corps a ensuite été déterminé. Le foie et les reins ont été fixés dans du formaldéhyde à 4% (MERCK Millipore, VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France) pour l'immunohistochimie (IHC).

M) Immunohistochimie (IHC)

Les IHC anti-Human leukocyte antigen (HLA-ABC - 1:100 de l'Anticorps 70328; Abcam, Paris, France) et anti-CLA (HECA-452, 1:100 de l'Anticorps; Biolegend) ont été effectués sur des coupes d'organes de biopsie cutanée de patients SS (3 µm d'épaisseur d'organes fixés au formol et inclus en paraffine).

Un kit anti-souris ImmPRESS marqué à la *horseradish peroxidase* (HRP) (laboratoires Vector) et le système chromogène de substrat liquide DAB+ (Dako) ont été utilisés pour révéler les cellules HLA-ABC-positives. Les lames ont été analysées à l'aide du logiciel Panoramic Scan (3DHISTECH, Budapest, Hongrie) et du logiciel Panoramic Viewer version 1.15.4 (3DHISTECH) ou à l'aide du microscope LEICA DMR couplé à une caméra NIKON DS-F12 et du logiciel d'imagerie NIS BR version 4.0 (Nikon, Champigny sur Marne, La France). L'évaluation quantitative du marquage HLA-ABC a été réalisée à l'aide du logiciel d'analyse d'images ImageJ version 1.48 (Java) ou du logiciel d'analyse d'images HALO (Indica Labs).

N) Immunofluorescence (IF)

Les IF ont été réalisées sur des coupes de biopsies cutanées de patients SS (3 µm d'épaisseur d'organes fixés au formol et inclus en paraffine). Après le blocage, les coupes ont été incubées avec un anticorps anti-CD3 de lapin (polyclonal, 1:200, A0452, Agilent) et un anticorps anti-CLA de rat (HECA-452, 1:50 of Antibody; Biolegend) et avec un secondaire anti-lapin couplé à l'Alexa-594 (chèvre, 1:400, A32740, Thermo Fischer Scientific) et anti-rat couplé à l'Alexa-488 (chèvre, 1:400, A11006, Thermo Fischer Scientific). Les lamelles ont été montées sur des lames de verre en utilisant un milieu de montage anti-décoloration avec DAPI (VECTASHIELD®, Vector Laboratories). Les images et les scans ont été réalisés à l'aide d'un microscope ZEISS AxioImager couplé au logiciel d'imagerie MetaSystems ou de scan Metafer (MetaSystems, Altlußheim, Allemagne). L'évaluation quantitative du marquage CLA+CD3+ a été réalisée en utilisant le logiciel d'analyse d'images HALO (Indica Labs).

O) Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism (GraphPad Software V9, Inc, La Jolla, CA, USA). Le test de Mann-Whitney non apparié a été utilisé pour analyser les tests de migration et de survie avec le test de corrélation de Spearman. La signification a été définie comme *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

II) Publications annexes

A) Publication en préparation issue d'un projet en parallèle du projet de thèse (Co-premier AUTEUR) : *Involvement of CXCR4 chemoreceptor in Sézary cell homing and dissemination in preclinical model of Sézary Syndrome*

Involvement of CXCR4 chemoreceptor in Sézary cell homing and dissemination in preclinical model of Sézary Syndrome

Authors and affiliations :

Julie CASTAGNA¹ / Sara PERU¹, Martina PROCHAZKOVA-CARLOTTI¹, Floriane CHERRIER¹, Elodie RICHARD, Anne PHAM-LEDARD^{1,2}, Marie BEYLOT-BARRY^{1,2}, Jean-Philippe MERLIO^{1,3}, Sandrine POGGIO^{1*}

¹ INSERM U1053, Team 3-Oncogenesis of Cutaneous Lymphoma, Bordeaux University, F-33000 Bordeaux, France.

² Dermatology Department, Bordeaux University Hospital, F-33000 Bordeaux, France

³ Tumor Bank and Tumor Biology Laboratory, Bordeaux University Hospital, F-33600 Pessac, France

Address correspondence:

*Sandrine Poggio, INSERM U1053-BaRITOn-Team Oncogenesis of cutaneous lymphoma, Bat 3B, 2ème étage- 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux, France, (phone: 33-5-57-57-10-87; FAX: 33-5-57-57-10-32, email: sandrine.poggio@u-bordeaux.fr).

Author's disclosure statement: The authors declare no relevant or material financial interests that relate to the research described in this paper.

Key-words: cutaneous T-cell lymphomas, CXCR4, cell migration, cell survival

Running/Short title: Role of the chemoreceptor CXCR4 in SCs dissemination

Abstract:

Sézary Syndrome (SS) is an aggressive form of cutaneous T-cell lymphomas with an abnormal proliferation of T cells primarily invading the skin with a predominant circulating clone of T-cell population. The mechanisms controlling the homing and dissemination between blood and skin compartments deserve further characterization. The percentage of CXCR4⁺ circulating Sézary cells (SC) was determined by flow cytometry. The role of CXCR4 in the SDF-1 (CXCR4 ligand) induced migration was studied using a trans-endothelial migration system with purified patient's SC and SC lines treated with AMD3100 (CXCR4 antagonist) or an anti-CXCR4 mAb. The function of CXCR4, *in vitro and in vivo*, in the dissemination of SC was studied using an adhesion assay and a xenograft model. Expression of CXCR4 was detected in all patient samples and was stable along the disease (N=21, median = 96.9%±9.6). *In vitro*, AMD3100 and anti-CXCR4 mAb significantly blocked SDF-1-induced trans-endothelial migration of SC and adhesion on SS Fibroblasts. The treatment with an anti-CXCR4 mAb on a SC line increased the establishment of the tumor and its dissemination in different tissues. CXCR4 is expressed and functional on SC surface and plays a key role in their homing and dissemination *in vivo*.

Introduction:

Sézary Syndrome (SS) is an epidermotropic CTCL with erythroderma, palmoplantar hyperkeratosis and pruritis and also exhibits a malignant T-cell population with superficial lymphadenopathies (1). Diagnosis criteria also requires an absolute count of Sézary cells (SC) over 1000/ μ L in blood, with a CD4/CD8 ratio over 10 and a circulating TCR clone identical to skin (2). The 5-year survival rate is ranging from 24% to 40% (3,4) and numerous treatments used (extracorporeal photophoresis, monoclonal antibodies, histone deacetylases (HDAC) inhibitors, immunomodulators, systemic chemotherapies...) are not curative excepted bone marrow transplantation (5).

Previous analyses of receptors and adhesion molecules on SC surface led to a better recognition of malignant T-cell origin and differentiation. It has been shown that SS cells express chemoreceptors and molecules involved in lymph nodes migration and recirculation (CCR7 and CD62L), high level of CXCR4 and CCR4, but lower and variable levels of other skin addressing molecules (CLA, CCR10 and CCR6) (6–8). Based on these characterizations, new targeted therapies were developed (anti-CCR4, anti-CD158k, anti-CD70...) which may act either directly or through immune response (9–11).

Among the chemoreceptors expressed by SC, CXCR4 is a seven-transmembrane domain receptor that associates with heterodimeric G proteins (7). It is activated by a unique ligand, SDF-1 (Stroma cell-Derived Factor-1), also called CXCL12. SDF-1 can also bind the chemoreceptor CXCR7 whose functions are controversial and expression not reported in CTCL (12). Interestingly, CXCR4 expression has been reported in at least 23 different epithelial, mesenchymal and hematopoietic cancers (13). It appears to be involved in migration of cancer cells to the site of metastasis and in their survival. Preliminary data from animal models suggest that CXCR4 might be an important therapeutic target in a large range of cancers ((13) and references therein). In Mycosis Fungoides (MF), which is the most common CTCL characterized by an epidermotropic CD4+ T-cell proliferation in the skin (1), cancer-associated-fibroblasts-derived CXCL12 and CXCR4 provide a chemoprotective niche for

those CXCR4-overexpressing cells and plays a functional role in the skin infiltrating and circulating of tumor cells (14). Its ligand, SDF-1, has been detected in skin biopsies of Mycosis Fungoides (MF) and SS patients (7,15).

Based on these results, we first characterized the expression of the chemoreceptor CXCR4 on patients' circulating SC and compared the results with clinical data. Then, we validated CXCR4 function on SC migration and adhesion properties in patient cells *in vitro* and using a preclinical model of PDX.

Materials and methods:

Patients' SC

Blood samples were obtained thanks to the Oncodermatology Department (Bordeaux, France, Pr Beylot-Barry, Pr Pham-Ledard) (Table S1). Patients provided informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and national ethics rules. The institutional review board of our institution approved the manipulations of Sézary samples (DC-2008–412). Tumor cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Pancoll centrifugation and characterized as mentioned in Supplemental data and previous work (16).

Tumor clone characterization

The T-cell clone was characterized by the dominant T-cell receptor (TCR) V β rearrangement in combination with different surface markers. The detection of the dominant clone was performed with IOtest® Beta Mark TCRV β Repertoire Kit (Beckman Coulter, Villepinte, France). (see (16) and Supplemental data).

Analyses were performed with FACS CantoII (BD, Biosciences, New Jersey, USA) in the cytometry platform TBM Core (Bordeaux). The BD FACSDiva™ software (BD, Biosciences, New Jersey, USA) was used for data interpretation.

Flow cytometry

Patients' SC and SC lines, L1 and L7 cell line (derived from SS (16)) were characterized by flow cytometry. The percentage of CXCR4⁺ cells was quantified among TCRV β +CD3⁺ cells, and its Ratio Fluorescence Intensity (RFI) measured. For the *in vivo* analysis, the detection of L1 cells in different tissues was quantified by flow cytometry among TCRV β 2+CD3⁺ cells. Acquisition and analysis were performed as reported above.

Chemotaxis and trans-endothelial migration assays

Patients' SC, previously sorted by flow cytometry, L1, L2 and L7 SC lines were used to perform chemotaxis assays *in vitro*. Experiments were conducted using a system of trans-endothelial migration through transwells previously coated with *Human Micro Vascular Endothelial Cells* (HMVECs) or *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) or SS GFP+ skin fibroblasts. The chemoattractant SDF-1 (80 ng/mL) was added in the medium in the lower chamber. Cells were seeded in the upper chamber after treatment with AMD3100 (1 µg/mL) (R&D System) or with anti-CXCR4 monoclonal antibody (mAb) (50 µg/mL) (clone 12G5, eBioscience) or its control isotype. 3h after, migrating cells were counted in the lower chamber and the percentage of migrating cells calculated as mentioned in Supplemental data.

Apoptosis-necrosis analyses

Apoptosis-necrosis test was performed on L1 and L7 SC lines after 48 hours of treatment with AMD3100 (50 µg/mL), or anti-CXCR4 mAb (50 µg/mL, clone 12G5), or its isotype control. The percentage of dead cells was evaluated by flow cytometry after staining with Annexin V (APC) and Hoechst as recommended by the manufacturer.

Adhesion assay

SS GFP+ skin fibroblasts were previously seeded on 12-wells plate or on glass coverslips. After 48h, L1 cells were pre-treated or not 1 hour with AMD3100 (50 µg/mL), or anti-CXCR4 mAb (50 µg/mL, clone 12G5), or its isotype control. Then, L1 cells were co-cultured with SS GFP+ skin fibroblasts and 1 hours later, cells were processed for fluorescent staining or were harvested and counted by flow cytometry with beads Precision Count Beads™ (Biolegend) as recommended by the manufacturer.

PDX experiments

L1 cells were pre-treated for 2 hours with an anti-CXCR4 mAb (50 µg/mL, clone 12G5) or its isotype control. These cells were then injected subcutaneously (1×10^6 cells/mouse) in immunodeficient NOD.Cg-Prkdc (scid)Il2rg(tm1Wjll)/SzJ (NSG) mice (from the Jackson

Laboratory). The monitoring of mice engraftment and tissue analyses are described in the Supplementary materials and methods

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry staining were performed as described (17) and Supplemental data.

Immunofluorescence

Co-culture L1 cells and GFP⁺ skin fibroblasts were fixed in 4% paraformaldehyde solution and permeabilized in 0.2% Triton solution. After blocking, cells were incubated with a primary anti-CD3 antibody (rabbit, polyclonal, 1:200, A0452, Agilent) and with a fluorescent-labelled secondary anti-rabbit Alexa-594-labelled (goat, 1:400, A32740, Thermo Fischer Scientific) in order to detect L1 cells. The coverslips were mounted on glass slides using an antifade mounting medium with DAPI (VECTASHIELD®, Vector Laboratories). Images were taken using a microscope LEICA DMR coupled with a camera NIKON DS-FI2 and NIS BR imaging software version 4.0 (Nikon, Champigny sur Marne, France).

Statistical analysis

The Prism software was used for statistical analysis (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA). The unpaired Mann-Whitney test was employed to analyze migration and survival assays with Spearman correlation test. Significance was defined as *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Results:

Homogenous expression of CXCR4 on circulating patient SC surface

Twenty-one patients were included in the study. All the patients' characteristics are available (Table S1). For all patients, we analyzed the expression of CXCR4 among TCRV β ⁺ and CD3⁺ circulating SC isolated from blood samples by flow cytometry (Figure 1A and Supp Table S1). CXCR4 is expressed in 100% of patient samples in the majority of the tumor cells (68-99.8%) (Figure 1A and Supp Table S1). The level of expression on the cell surface is heterogeneous with a median of RFI from 31 to 4059 (Figure 1A, Supp Table S1). Proportion of CXCR4⁺ cells and expression level was independent from patients' features and main prognostic factors (data not shown). CXCR4 expression in patients 1, 4, 7 and 10 was stable in the sequential samples for the 4 patients tested (Figure 1B).

Altogether, CXCR4 is expressed in all patient SS samples and is stable along the disease.

CXCR4 chemoreceptor is functional in patient SCs

We explored the function of CXCR4 receptor in SC migration by *in vitro* functional assays. Chemotaxis assay of SCs from 6 fresh patient samples were performed. The migration in response to SDF-1 that is the CXCR4 ligand was measured after 3 hours of incubation and compared to other chemoattractants: CCL19/21 (ligands of CCR7) and CCL17/22 (ligands of CCR4). The percentage of migration in response to SDF-1 compared to the other chemoattractants was higher for patients 1 and 7 (respectively 54% and 68%) and similar for the patient 2, 6, 9 and 10 (17.7%; 7.8%; 28.5% and 38%) (mean 37.2% \pm 21.2) (Figure 2A and S2). This result could be explained by the difference in the chemoreceptor expression (Figure 2A and S2E). Altogether, for all the patients, the migration was significantly higher in response to SDF-1 compared to CCL19/21. And even if no significant difference was observed between SDF-1 and CCL17/22, no significant difference was observed either between the ligands of CCR7 and CCR4 (Figure S2D).

To better mimic the migration of SC from blood to skin through the dermis, we set up a trans-endothelial migration assay through transwells pre-coated with HMVECs/HUVECs cells. Patients' SC previously sorted by flow cytometry (Supp Figure S1) were treated with AMD3100. After 3 hours, the treatment with AMD3100 decreased significantly their migration with a mean inhibition rate of $90.6\% \pm 5.6$ compared to the control condition ($n=3$ patients, $p < 0.05$) (Figure 2B).

Due to the limited number of fresh patient cells, we used our newly developed SC lines (L1 and L2 from patient 2 and L7 cell line derived from patient 10) (16). L1 and L7 cell lines express high level of CXCR4 compared to L2 cell lines (Supp Table S2). Using trans-endothelial migration system, we showed that the treatment with AMD3100 and anti-CXCR4 mAb decreased significantly the migration of L1 and L7 cell lines with an inhibition rate of, 96.2 ± 1 and 83.94 ± 1 and 91.2 ± 2 and 82.78 ± 1 , respectively (Figure 3A and S3A). This effect on migration is specific to the CXCR4 expression as L2 cells which exhibit a low level of CXCR4 expression had a low level of migration in response to CXCR4 ligand (1.85 ± 0.4 – Figure S3B).

In vitro migration of SC in response to SDF-1, and its blockage with AMD3100 and anti-CXCR4 mAb, confirmed the functional role of CXCR4 in SC migration in fresh patient samples and new SC lines.

CXCR4 is not involved in SC survival

In addition to playing a role in T-cell migration, it has been shown that CXCR4 is implicated in cell proliferation and survival of tumor cells in other cancers as T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) (18). To evaluate the role of CXCR4 on SC survival, we performed an apoptosis-necrosis assay on L1 and L7 SC lines after treatment with AMD3100 or anti-CXCR4 mAb. Flow cytometry was used to determine the percentage of dead cells. FACS analysis (Figure 3B) showed that the percentage of dead cells did not increase after treatment with AMD3100 or anti-CXCR4 mAb in comparison with the untreated or isotype control condition after 48 hours of treatment (Figure 3C; $N=4$, *ns*). This

suggests that the effect of CXCR4 inhibition on cell migration is not due to an increase of cell death in our treatment conditions.

CXCR4 is involved in SC nesting and dissemination of SC *in* PDX model

To study the effect of the anti-CXCR4 mAb on the SC nesting and dissemination *in vivo*, we used a xenograft model where L1 cells were pre-treated for 2 hours with an anti-CXCR4 mAb or with the corresponding control isotype or AMD3100 and PBS. Then we injected subcutaneously the cells in immunodeficient mice to evaluate whether the SS tumor are able to develop. Macroscopic analysis (Figure 4A, C and E) showed a significant increase of the tumor volume at the site of injection in the mice injected with L1 cells pre-treated with anti-CXCR4 or AMD3100 compared to the control group. We also observed a significant increase of the spleen and liver weight in the anti-CXCR4 group compared to the control as well as a low but no significant increase was noticed for the kidney (Figure S4E, F and G).

We analyzed by flow cytometry the percentage of TCRV β 2+CD3+ L1 cells present in different tissues such as blood, bone marrow, spleen, kidney and liver (Figure 4D and F; S4A-D; S5A-D). FACS analysis showed a significant increase of the percentage of L1 cells pre-treated with the anti-CXCR4 mAb in the different organs. We also performed an immunohistochemistry (IHC) using an anti-HLA-ABC antibody, a marker of human cells, on injected skin and kidney sections confirming the increase number of L1 SC cells in the anti-CXCR4 group compared to the control (Figure 4B). These results show that the treatment with an anti-CXCR4 mAb on L1 cells have a pro-survival effect and increases the establishment of the tumor *in situ* and its dissemination in different tissues compared to the control group.

SS cell homing *via* patient skin fibroblasts and their nesting needs the CXCR4/SDF-1 axis

To study if the effect of anti-CXCR4 Ab could be explained by the SCs homing and nesting in the skin niches and particularly if the skin fibroblasts could interact with SCs through CXCR4/SDF-1 axis, we performed an adhesion assay. L1 cells pre-treated with AMD3100 or anti-CXCR4 mAb or its isotype control were co-cultured with SS GFP⁺ skin fibroblasts. After 1 hour, adherent cells were harvested and counted by flow cytometry or processed for fluorescent staining. Counting FACS analysis showed that the treatment with AMD3100 and anti-CXCR4 mAb decreased significantly the number of adherent cells, respectively 1.3 and 0.4-fold decrease (Figure 5A; N=4). We obtained also the same result in immunofluorescence where we assessed a number of adherent cells decreasing when L1 cells were pre-treated with anti-CXCR4 mAb or AMD3100 (Figure 5B). We then performed a chemotaxis assays of L1 cells pre-treated or not with AMD3100 (1 µg/mL) through transwells where SDF-1 (80 ng/mL) or SS GFP⁺ skin fibroblast was added or seeded in the lower chamber. After 3 hours, cell counting in the lower chamber showed that the SS GFP⁺ skin fibroblasts induces a significant migration whereas the pre-treatment with AMD3100 decreased this migration (Figure 5C; 12.7 ± 1.8 vs $0.8 \pm 0,1$; N=2; quadruplet).

Discussion

Our study performed on a 22 patient cohort shows that patient SCs express CXCR4 along the disease. The trans-endothelial migration assay allows us to get close to the physiological migration of SC in the dermis and show that the inhibition of CXCR4 blocks patients' SC migration. Our study provides the first evidence of CXCR4 functions in preclinical PDX model and the role of patient skin fibroblasts in SC homing. Indeed, blocking CXCR4 on SCs surface increases tumorigenesis and dissemination *in vivo*. CXCR4 is expressed and functional on SC surface and plays a key role in their homing and dissemination *in vivo*.

Several chemoreceptors have been described on CTCL cell surface and are generally known to be involved in the regulation of tissue homing, metastasis, proliferation and survival (16). We focused on CXCR4 because the SDF-1/CXCR4 axis is involved in the metastasis of several solid cancers (14,17), as well as several types of leukemia and lymphomas (18–21). We showed that the SC in all patients express CXCR4 and this expression is heterogeneous among patients. CXCR4 expression on SC surface was investigated in one single report on a cohort of 12 patients, showing a much lower percentage of CXCR4+ SC (average of 64%, *versus* 96.9% in our study) and heterogeneity between patients (7). We also performed sequential analyses for 4 patients, which has never been performed. Interestingly, we observed that CXCR4 expression was constant for a same patient independently of the treatment or the evolution of the disease suggesting that CXCR4 could be target all along the disease.

Contrary to breast, ovarian, lung and other cancers (22,23) where CXCR4 expression was reported to be more heterogeneous, we found no correlation between CXCR4 expression on SC surface and the clinical features or prognostic factors.

Another group already showed the implication of SDF-1 in SC migration using chemotaxis assays, but did not address the functional role of CXCR4 by its specific inhibition (7). In this study, we demonstrate that CXCR4 is functional in patients' SC surface. Indeed, SCs were found to migrate in

response to SDF-1, while inhibition of CXCR4 blocked this migration. Then, these migration properties of SC seem independent of the other chemoreceptor binding SDF-1, CXCR7, because of the specific inhibition obtained here with CXCR4 inhibitors. Also, a very low expression of CXCR7 was found on our SC lines even after addition of SDF-1 (data not shown). For *Narducci et al.*, this difference is due to the expression of CD26 on cell surface (7). CD26 is a membrane-bound protease that has proved to be able to inactivate SDF-1 by proteolytic cleavage *in vitro* (24). The lack of CD26 on the cell surface has been reported as a hallmark of circulating SC. However, we observed a high expression of CD26 in L7 SC line derived from patient 10, which was shown to display migration properties that does not support that CD26 expression could inhibit migration properties.

The anti-CXCR4 mAb here used for flow cytometry and functional assays is the 12G5 clone, and the most common used to study CXCR4 expression. It is a conformation-dependent mAb that recognizes a determinant in the first and second extracellular loops of CXCR4. According to the literature, there are several conformational forms of CXCR4 molecules. Its structure may vary because of post-translational modifications, conformational fluctuations, or receptor oligomerization. For *Baribaud and al.*, the 12G5 clone may recognize only a subpopulation of CXCR4 molecules present on T cells or freshly isolated B cells (25). The conformational forms of CXCR4 molecules are in equilibrium on cell surface and no cell type specific (26). The conformational heterogeneity of CXCR4 could account for the cell-type-dependent ability of SDF-1 to induce migration and to anti-CXCR4 mAb to inhibit it. Indeed, SDF-1 may not bind CXCR4 as effectively in SC line than in patients' circulating SC, due to possible different conformations of CXCR4. This could also explain the variability in the different migration rates.

Interestingly, both AMD3100 and anti-CXCR4 mAb blocked the migration of SC without any effect on SC death. Both AMD3100 and the 12G5 clone bind partially the same site on the second extracellular loops of CXCR4 (27), which might be an important domain in CXCR4 migratory

function. According to the literature in CLL (20) the treatment by a fully human anti-CXCR4 mAb (Ulocuplumab), but not AMD3100, induce cell death through production of reactive oxygen species independently of caspase activation. We did not observe any direct induction of apoptosis or necrosis after treatment with AMD3100 or anti-CXCR4 mAb on our SC. The study of indirect effects of CXCR4 on the SCs survival via the ADCC (27) using PBMC and NK cells did not show any significant effects (data not shown).

In MF, the SDF-1/CXCR4 axis provides a chemoprotective niche for CXCR4-overexpressing cells (14). In our preclinical model we showed that CXCR4 blockage before cells engraftment increases the dissemination of SCs in different tissues.

Concerning the molecular mechanisms of CXCR4 signaling in T cells, we already know that SDF-1 signaling *via* CXCR4 results in T-cell adhesion, chemotaxis and gene expression involved in the regulation of cell-cycle progression and apoptosis, in particular by prolonging activation of ERK-1 and ERK-2 (28,29). *Kumar et al.* have shown that CXCR4 is physically associates with the TCR after stimulation by SDF-1, and utilizes the ZAP-70 binding ITAM domains of the TCR for signal transduction. It contributes to enhance the stimulation of AP-1-dependent transcriptional activity in normal T cells (30). In our SC, after a treatment with PHA or an activation of the TCR with anti-CD3/CD28 beads, P-ERK was activated but we did not observe any increase or decrease of P-ERK after treatment with SDF-1 or AMD3100 and anti-CXCR4 mAb.

Our study demonstrates the function of CXCR4 receptor on patient samples and the importance of CXCR4/SDF-1 axis in their homing and dissemination *in vivo*.

Acknowledgments

The authors would like to thank the donors for agreeing to have their cells used for research and the clinical teams from Bordeaux Hospital for their dedicated aid in collecting samples. Mouse experiments were greatly facilitated by Benoît Rousseau and Julien Izotte from the A2 Animal facility at Bordeaux University. We thank Atika Zouine and Vincent Pitard for technical assistance at the Flow cytometry facility, CNRS UMS3427, INSERM UMS005. Thomas Bandres helped for the bioinformatics analyses. We also thank the Pathology, Hematology, Tumor Biology and Tumor Bank Department of Bordeaux University Hospital and especially Pr Béatrice Vergier and Dr Jean-Philippe Vial for providing routine diagnostic data.

This work was supported by INSERM, Bordeaux University, the Ligue Régionale Contre le Cancer (Gironde and Charentes) and the Société Française de Dermatologie (SFD).

Author contributions

SP1, JC and SP2 designed the experimental research. JC, SP1, SP2, MC, FC and ER performed experiments and analyzed data. JC, SP1, SP2 and JPM wrote the paper. MBB and APL conducted the clinical research reviewing diagnosis, providing patient samples with clinical data, participated to discussion and reviewed the paper.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Bibliography

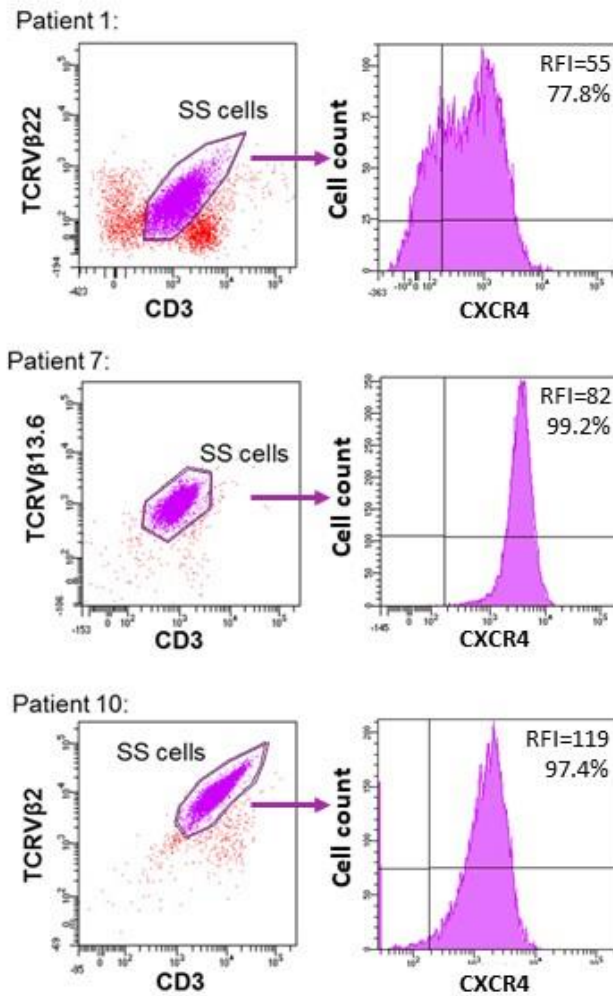
1. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*. 2007 Sep 15;110(6):1713–22.
2. Scarisbrick JJ, Hodak E, Bagot M, Stranzenbach R, Stadler R, Ortiz-Romero PL, et al. Blood classification and blood response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome using flow cytometry: recommendations from the EORTC cutaneous lymphoma task force. *Eur J Cancer*. 2018 Apr;93:47–56.
3. Fink-Puches R, Zenahlik P, Bäck B, Smolle J, Kerl H, Cerroni L. Primary cutaneous lymphomas: applicability of current classification schemes (European Organization for Research and Treatment of Cancer, World Health Organization) based on clinicopathologic features observed in a large group of patients. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):800–5.
4. Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management: Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Am J Hematol*. 2016 Jan;91(1):151–65.
5. de Masson A, Beylot-Barry M, Bouaziz J-D, de Latour RP, Aubin F, Garciaz S, et al. Allogeneic stem cell transplantation for advanced cutaneous T-cell lymphomas: a study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and French Study Group on Cutaneous Lymphomas. *Haematologica*. 2014 Mar 1;99(3):527–34.
6. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood*. 2010 Aug 5;116(5):767–71.
7. Narducci MG, Scala E, Bresin A, Caprini E, Picchio MC, Remotti D, et al. Skin homing of Sézary cells involves SDF-1-CXCR4 signaling and down-regulation of CD26/dipeptidylpeptidase IV. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):1108–15.
8. Roelens M, Delord M, Ram-Wolff C, Marie-Cardine A, Alberdi A, Maki G, et al. Circulating and skin-derived Sézary cells: clonal but with phenotypic plasticity. *Blood*. 2017 Sep 21;130(12):1468–71.
9. Ogura M, Ishida T, Hatake K, Taniwaki M, Ando K, Tobinai K, et al. Multicenter Phase II Study of Mogamulizumab (KW-0761), a Defucosylated Anti-CC Chemokine Receptor 4 Antibody, in Patients With Relapsed Peripheral T-Cell Lymphoma and Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2014 Apr 10;32(11):1157–63.
10. Grewal IS. CD70 as a therapeutic target in human malignancies. *Expert Opin Ther Targets*. 2008 Mar;12(3):341–51.
11. Bagot M, Porcu P, Marie-Cardine A, Battistella M, William BM, Vermeer M, et al. IPH4102, a first-in-class anti-KIR3DL2 monoclonal antibody, in patients with relapsed or refractory cutaneous T-cell lymphoma: an international, first-in-human, open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol*. 2019 Aug;20(8):1160–70.

12. Spender LC, Inman GJ. Fatal attractions? Correlations of CXCL12–CXCR4–CXCR7 expression with disease progression in melanoma and Kaposi sarcoma. *Br J Dermatol*. 2016;175(6):1140–1.
13. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol*. 2004 Jun;14(3):171–9.
14. Aronovich A, Moyal L, Gorovitz B, Amitay-Laish I, Naveh HP, Forer Y, et al. Cancer-Associated Fibroblasts in Mycosis Fungoides Promote Tumor Cell Migration and Drug Resistance through CXCL12/CXCR4. *J Invest Dermatol*. 2020 Aug 11;
15. Maj J, Jankowska-Konsur AM, Hałoń A, Woźniak Z, Plomer-Niezgoda E, Reich A. Expression of CXCR4 and CXCL12 and their correlations to the cell proliferation and angiogenesis in mycosis fungoides. *Adv Dermatol Allergol Postepy Dermatol Alergol*. 2015 Dec;32(6):437.
16. Poglio S, Prochazkova-Carlotti M, Cherrier F, Gros A, Laharanne E, Pham-Ledard A, et al. Xenograft and cell culture models of Sézary syndrome reveal cell of origin diversity and subclonal heterogeneity. *Leukemia* [Internet]. 2020 Oct 26 [cited 2021 Jan 11]; Available from: <http://www.nature.com/articles/s41375-020-01068-2>
17. Andrique L, Poglio S, Prochazkova-Carlotti M, Kadin ME, Giese A, Idrissi Y, et al. Intrahepatic Xenograft of Cutaneous T-Cell Lymphoma Cell Lines: A Useful Model for Rapid Biological and Therapeutic Evaluation. *Am J Pathol*. 2016 Jul;186(7):1775–85.
18. Passaro D, Irigoyen M, Catherinet C, Gachet S, Da Costa De Jesus C, Lasgi C, et al. CXCR4 Is Required for Leukemia-Initiating Cell Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2015 Jun 8;27(6):769–79.
19. Ishida T, Iida S, Akatsuka Y, Ishii T, Miyazaki M, Komatsu H, et al. The CC chemokine receptor 4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-Cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Nov 15;10(22):7529–39.
20. Kashyap MK, Kumar D, Jones H, Amaya-Chanaga CI, Choi MY, Melo-Cardenas J, et al. Ulocuplumab (BMS-936564 / MDX1338): a fully human anti-CXCR4 antibody induces cell death in chronic lymphocytic leukemia mediated through a reactive oxygen species-dependent pathway. *Oncotarget*. 2016 Jan 19;7(3):2809–22.
21. Sison EAR, Magoon D, Li L, Annesley CE, Romagnoli B, Douglas GJ, et al. POL5551, a novel and potent CXCR4 antagonist, enhances sensitivity to chemotherapy in pediatric ALL. *Oncotarget*. 2015 Oct 13;6(31):30902–18.
22. Ramsey DM, McAlpine SR. Halting metastasis through CXCR4 inhibition. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013 Jan 1;23(1):20–5.
23. Otsuka S, Bebb G. The CXCR4/SDF-1 chemokine receptor axis: a new target therapeutic for non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2008 Dec;3(12):1379–83.
24. Lambeir AM, Proost P, Durinx C, Bal G, Senten K, Augustyns K, et al. Kinetic investigation of chemokine truncation by CD26/dipeptidyl peptidase IV reveals a striking selectivity within the chemokine family. *J Biol Chem*. 2001 Aug 10;276(32):29839–45.
25. Baribaud F, Edwards TG, Sharron M, BreLOT A, Heveker N, Price K, et al. Antigenically distinct conformations of CXCR4. *J Virol*. 2001 Oct;75(19):8957–67.

26. Carnec X, Quan L, Olson WC, Hazan U, Dragic T. Anti-CXCR4 monoclonal antibodies recognizing overlapping epitopes differ significantly in their ability to inhibit entry of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2005 Feb;79(3):1930–3.
27. Chang D-K, Sui J, Geng S, Muvaffak A, Bai M, Fuhlbrigge RC, et al. Humanization of an Anti-CCR4 Antibody That Kills Cutaneous T-Cell Lymphoma Cells and Abrogates Suppression by T-Regulatory Cells. *Mol Cancer Ther.* 2012 Nov 1;11(11):2451–61.
28. Suzuki Y, Rahman M, Mitsuya H. Diverse transcriptional response of CD4+ T cells to stromal cell-derived factor SDF-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4+ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2001 Sep 15;167(6):3064–73.
29. Kremer KN, Humphreys TD, Kumar A, Qian N-X, Hedin KE. Distinct role of ZAP-70 and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa in the prolonged activation of extracellular signal-regulated protein kinase by the stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCL12 chemokine. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2003 Jul 1;171(1):360–7.
30. Kumar A, Humphreys TD, Kremer KN, Bramati PS, Bradfield L, Edgar CE, et al. CXCR4 Physically Associates with the T Cell Receptor to Signal in T Cells. *Immunity.* 2006 Aug;25(2):213–24.

Figure 1

A



B

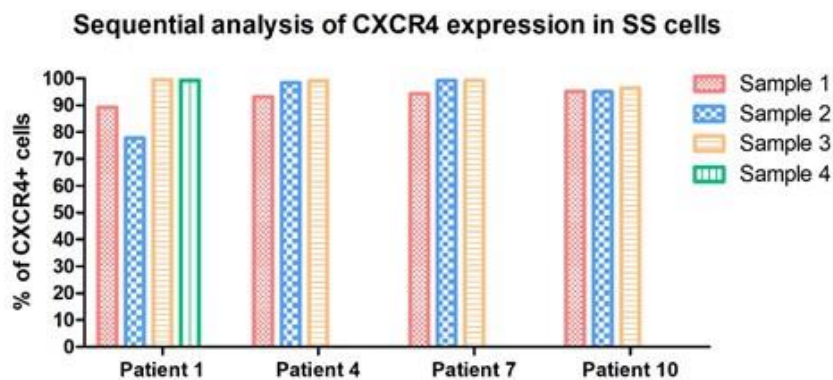


Figure 1: Percentage of CXCR4+ cells in patients' circulating SC by flow cytometry.

A) Examples of results for patients 1, 7 and 10. SC were analyzed by flow cytometry for surface expression of CD3, CD4, TCRVβ and CXCR4. Percentage of CXCR4+ cells was calculated among CD3+ and TCRVβ22+ (patient 1), TCRVβ13.6+ (patient 7) and TCRVβ2+ (patient 10) cells. The Ratio Fluorescence Intensity (RFI) of CXCR4 expression was quantified in SC.

B) Sequential analysis of CXCR4 expression in patients' SC for patients 1, 4, 7 and 10 by flow cytometry. SC = Sézary cells.

Figure 2

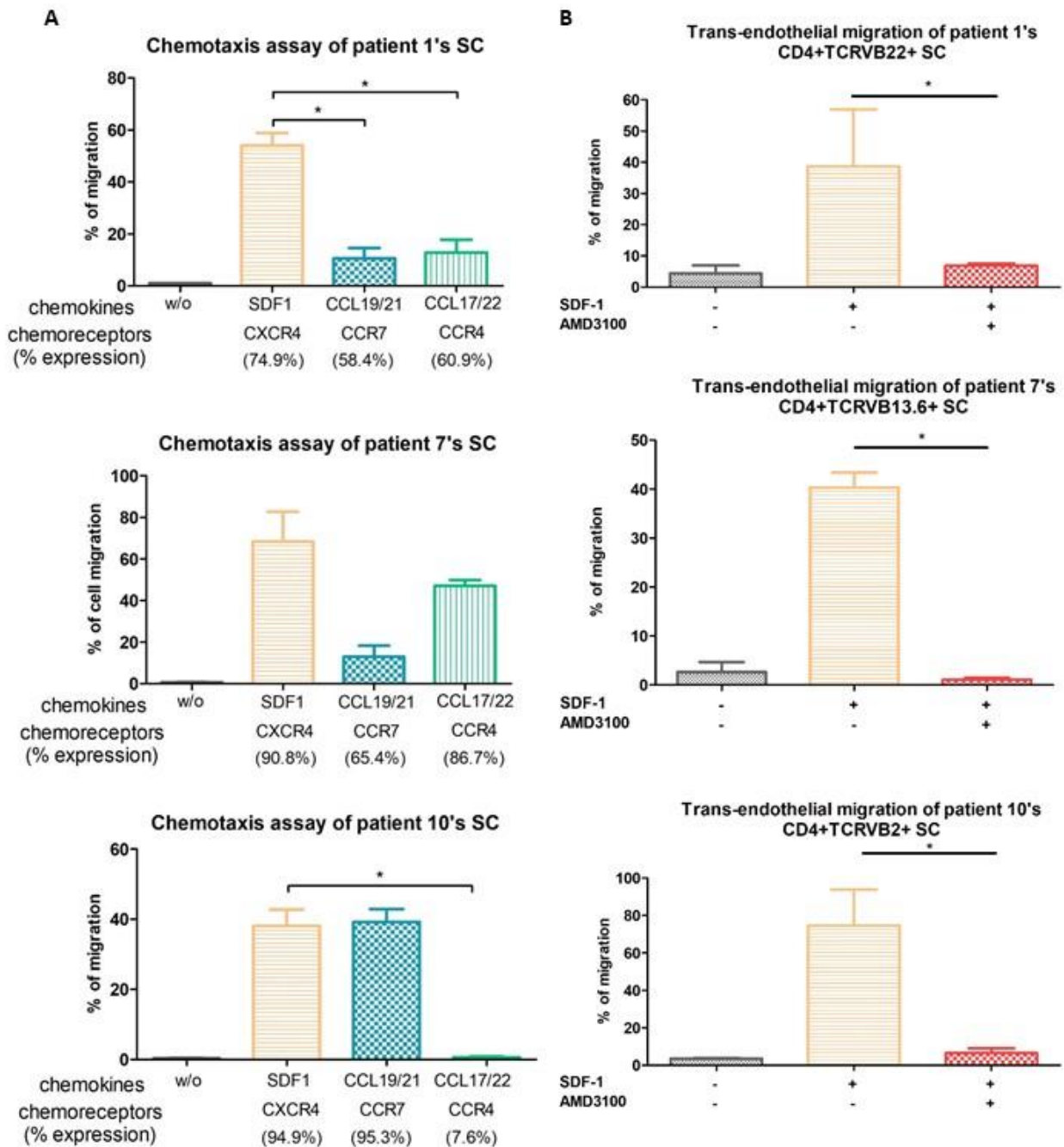


Figure 2: Chemotaxis and trans-endothelial migration properties of SC.

A) *In vitro* chemotaxis assay of patients' SC through transwells with different chemokines added in the lower chamber : CCL19/21 (50/100 ng/mL) (CCR7 chemoattractant), SDF-1 (80 ng/mL) (CXCR4 chemoattractant), CCL17/22 (10/100 ng/mL) (CCR4 chemoattractant). The percentage of migrating cells was evaluated after 3 hours. The percentage of expression of the different chemoreceptors, previously measured by flow cytometry on SC surface, is mentioned under each condition.

B) Trans-endothelial migration of patients 1, 7 and 10' SC through transwells previously coated with a layer of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HMVECs). SDF-1 (80 ng/mL) was added in the lower chamber. Cells were sorted and treated or not with AMD3100 (1 μ g/mL). The percentage of migrating cells was evaluated after 3 hours. Statistical analysis was performed using unpaired Mann-Whitney test. * = $p < 0.05$.

SC = Sézary cells.

Figure 3

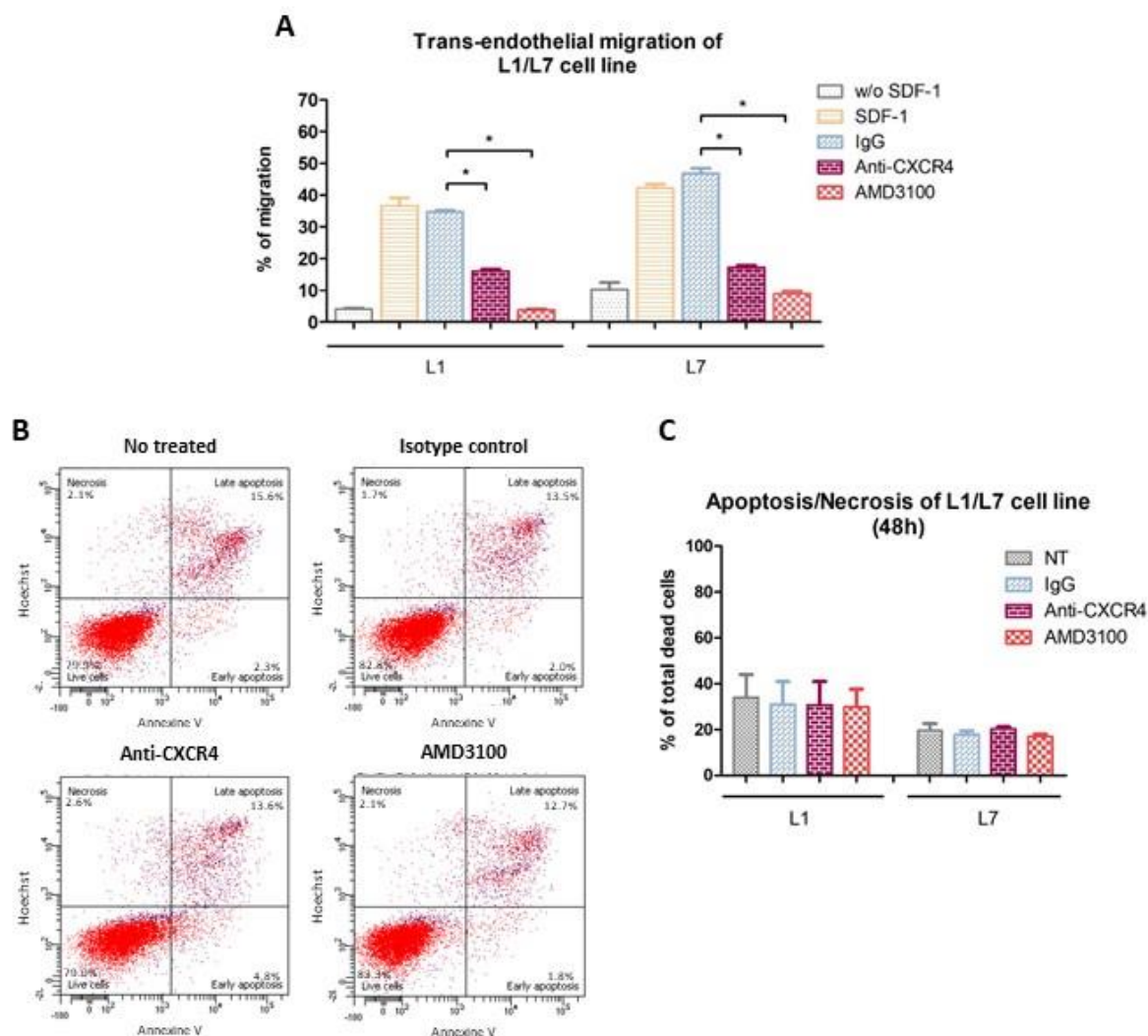


Figure 3: Trans-endothelial migration and evaluation of cell death of cell line derived SC after treatment with AMD3100 or anti-CXCR4 mAb.

A) Quantification of trans-endothelial migration of derived SC L1/L7 cells through transwells previously coated with HUVECs. SDF-1 (80 ng/mL) was added in the lower chamber. Cells were treated with isotype or anti-CXCR4 mAb (50µg/mL) or AMD3100 (1µg/mL) and 3 hours later, migrating cells were harvested and counted.

B) and C). L1/L7 cells were incubated with an isotype or anti-CXCR4 mAb (50µg/mL) or AMD3100 (50µg/mL) for 48h. Percentage of apoptotic cells (Annexin V+) and necrotic cells (Hoechst+, Annexin V-) were studied by flow cytometry **(B)**. Quantification of L1/L7 cell death (% of apoptotic and necrotic cells) **(C)**.

Statistical analysis was performed using unpaired Mann-Whitney test. * = p<0.05. SC = Sézary cells

Figure 4

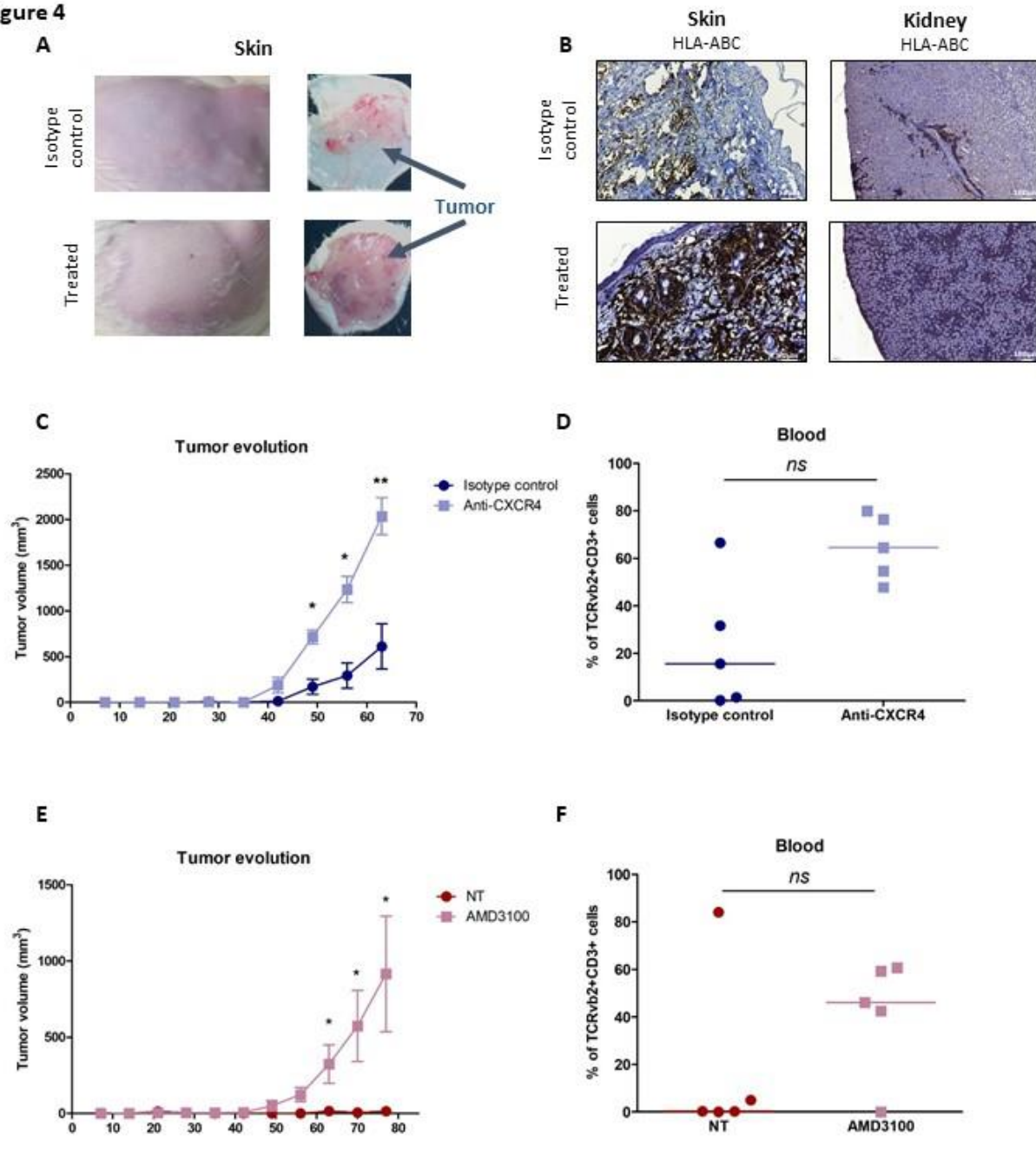


Figure 4: Effect of anti-CXCR4 antibody or the AMD3100 treatment on the survival and dissemination of CTCL cell *in vivo*

A) and B) Skin of mice of the control or the anti-CXCR4 group. Pictures of mice skin injected with L1 cells pre-treated with a control isotype or with an anti-CXCR4 antibody where we can assess the tumor (N=5 for each group) **(A)** and Example of Immunohistochemistry using anti-HLA-ABC on skin (left) or kidney (right) sections of mice injected with cells treated with an isotype control or anti-CXCR4 antibody **(B)** . **C) and D)** Tumor size evolution **(C)** and percentage of TCRvβ2+CD3+ L1 human cells in the blood in the isotype control or the anti-CXCR4 group **(D)**

E) and F) Tumor size evolution **(E)** and percentage of TCRvβ2+CD3+ L1 human cells in the blood in the non treated or the AMD3100 treated group **(F)**

Figure 5

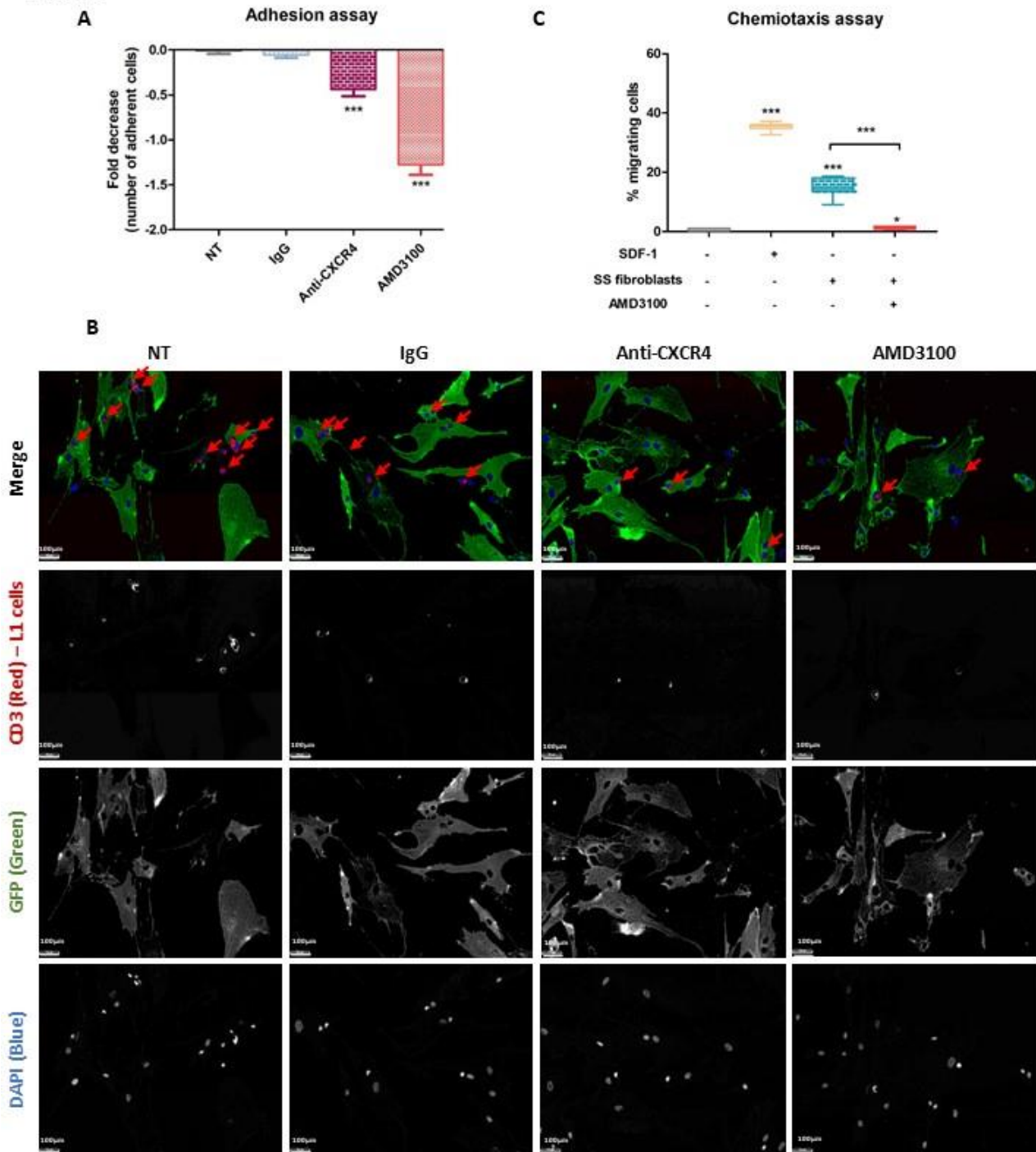


Figure 5 : Evaluation of adherent cells of cell line derived SC after treatment with AMD3100 or anti-CXCR4 mAb.

A) and B) Quantification of adherent derived SC L1 cells on SS derived GFP+ fibroblast. L1 cells were pre-treated or not with isotype or anti-CXCR4 mAb or AMD3100 (50µg/mL). 1h hours after L1 cells were co-cultured with SS GFP+ fibroblast and 1 hours later, adherent cells were harvested and counted by flow cytometry with beads (A) or processed for fluorescent staining with DAPI to detect the nucleus (blue), anti-CD3 to detect L1 cells (Red) and GFP to detect fibroblast GFP+ (Green) (B). The red arrows indicate L1 adherent cells. **C)** *In vitro* chemotaxis assay of L1 cells pre-treated or not with AMD3100 (1µg/mL) through transwells where SDF-1 (80 ng/mL) or SS GFP+ skin fibroblast was added in the lower chamber (CXCR4 chemoattractant). The percentage of migrating cells was evaluated after 3 hours. Statistical analysis was performed using unpaired Mann-Whitney test. *** = p<0.001. SC = Sézary cells

Supplemental data

Table S1

N° Patient	Gender	Age at diagnosis (years)	Stage at diagnosis	current status	Follow-up (months)	Stage at analysis	Treatment	% of CXCR4 expression	RFI CXCR4 (median)
1	M	44	T4N0M0 B2	CR	30	T4N0M0 B2	Vorinostat	89.3	159
					32	T4N0M0 B2	Vorinostat	77.8	55
					39	T4N3M1 B2	Chemotherapy (CHOEP)	99.6	301
					42	T2N0M0 B1	No treatment	99.3	209
2	F	48	T4N1M0 B2	D	11	T4N+M0 B2	Chlorambucil	96.6	56
3	M	63	T4N0M0 B2	AWD	47	T4N0M0 B2	EP, Bexarotene and Chlorambucil	99.2	320
4	M	66	T4N1M0 B2	D	24	T4N3M0 B2	Chlorambucil	93.1	2662
					38.5	T4N3M0 B2	Electrontherapy	98.4	134
					39	T4N3M0 B2	No treatment	99.1	216
5	F	72	T4N0M0 B2	D	16	T4N0M0 B2	EP and Methotrexate	74.4	32
6	F	77	T4N3M0 B2	D	3	T4N3M0 B2	No treatment	68	53
7	F	79	T4N0M0 B2	D	40	T4N0M0 B2	Chlorambucil	94.3	82
					49	T4N0M0 B2	Gemcitabine	99.2	82
					56	T4N0M0 B2	Cyclophosphamide	99.2	228
8	F	73	T4N0M0 B2	AWD	10	T4N0M0 B2	EP	98.6	226
9	M	64	T4N0M0 B2	AWD	12	T4N0M0 B2	EP and Bexarotene	99.8	225
10	F	60	T4N1M0 B2	D	38	T4N1M0 B2	Interferon	95.1	177
					46	T4N1M0 B2	Romidepsin	95	58
					47	T4N1M0 B2	No treatment (infection)	94.6	119
12	F	57	T4N0M0 B2	AWD	146	T4N0M0 B2	Chlorambucil	96.9	4059
13	F	76	T4N0M0 B1	AWD	10	T4N0M0 B2	EP	93.7	31
14	M	51	T4N0M0 B2	AWD	140	T4N0M0 B1b	EP and Vorinostat	98.7	110
15	F	89	T4N0M0 B1	AWD	At diagnosis	T4N0M0 B1	EP	99.4	562
16	M	82	T4N1M0 B2	AWD	14	T4N1M0 B2	Bexarotene	97.6	196
17	M	57	T4N0M0 B2	AWD	1	T4N0M0 B2	Methotrexate	97.1	276
18	F	77	T2N0M0 B1	AWD	19	T2N0M0 B1	EP	90.8	64
19	F	64	T4N0M0 B2	CR	41	T4N0M0 B1	Mogamulizumab	99.4	499
20	F	81	T4N0M0 B1	AWD	At diagnosis	T4N0M0 B1	Methotrexate	97.8	606
21	F	70	T2bN0M0 B2	AWD	At diagnosis	T2bN0M0 B2	Methotrexate	70.6	111
22	F	87	T4N0M0 B2	AWD	At diagnosis	T4N0M0 B2	No treatment	99.7	328

Table S2

Cell line	Derived from patient N°	% of CXCR4 expression	RFI CXCR4 (median)
L1	2	95.2	51
L2	2	38.7	3
L7	10	99.7	157

Table S1: Patients' characteristics and Percentage of CXCR4 expression on patients' circulating SS cell surface and RFI

MF = Mycosis Fungoides, M = Male, F = Female, CR = Complete Remission, D = Dead, AWD = Alive With Disease, NA = Not Available, EP = Extracorporeal Photopheresis

For patients 1, 4 and 10, a sequential analysis was possible.

Table S2: SC lines' characteristics and Percentage of CXCR4 expression and RFI

RFI = Ratio Fluorescence Intensity.

Figure S1

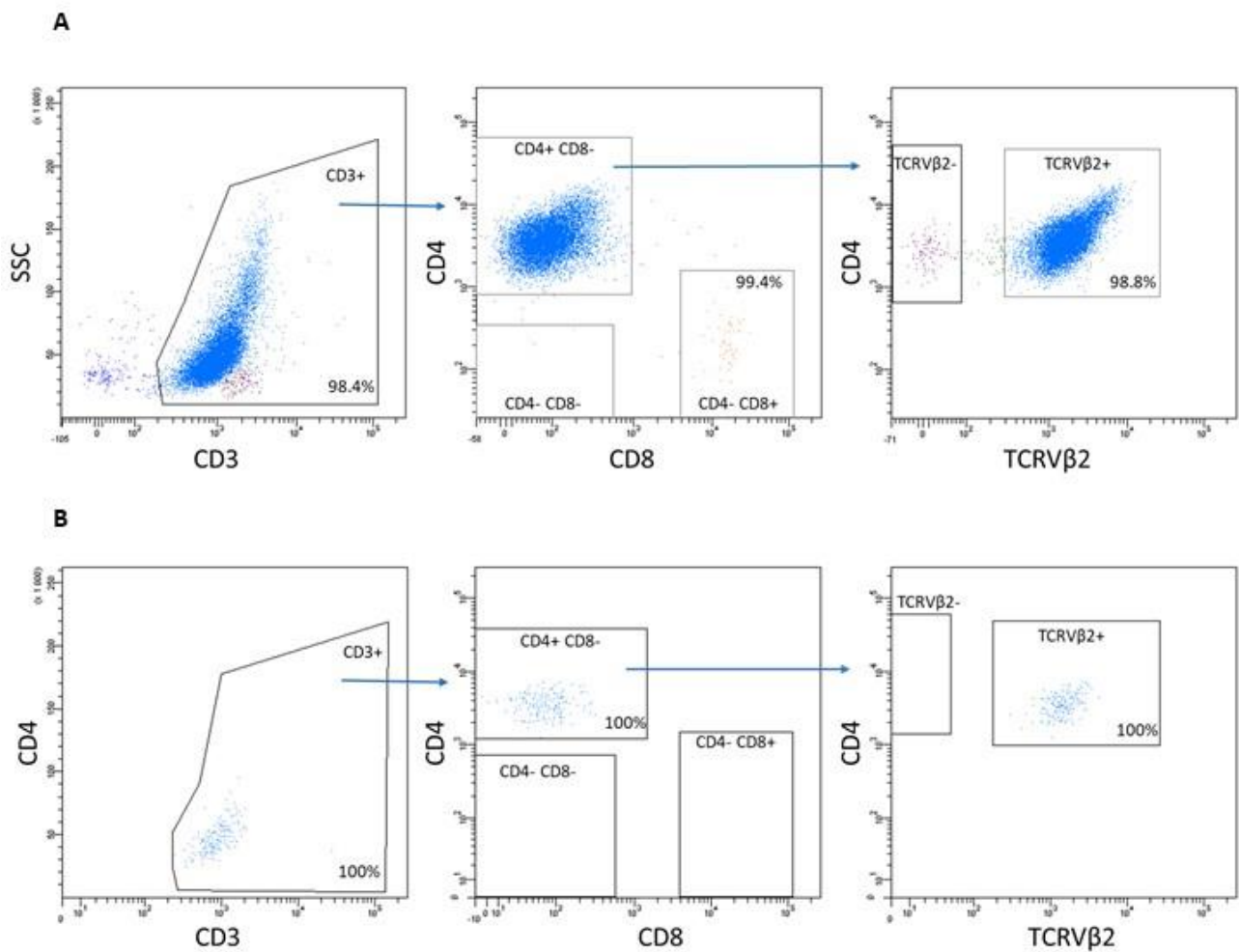


Figure S1: Example of SC sorting and purity test for patient 10 by flow cytometry.

A) TCRVβ2+CD3+CD4+CD8- cells were sorted using flow cytometry and the percentage of TCRVβ2+ cells was determined using FACS DIVA Software.

B) Purity was confirmed on sorted cells by flow cytometry.

SC = Sézary cells.

Figure S2

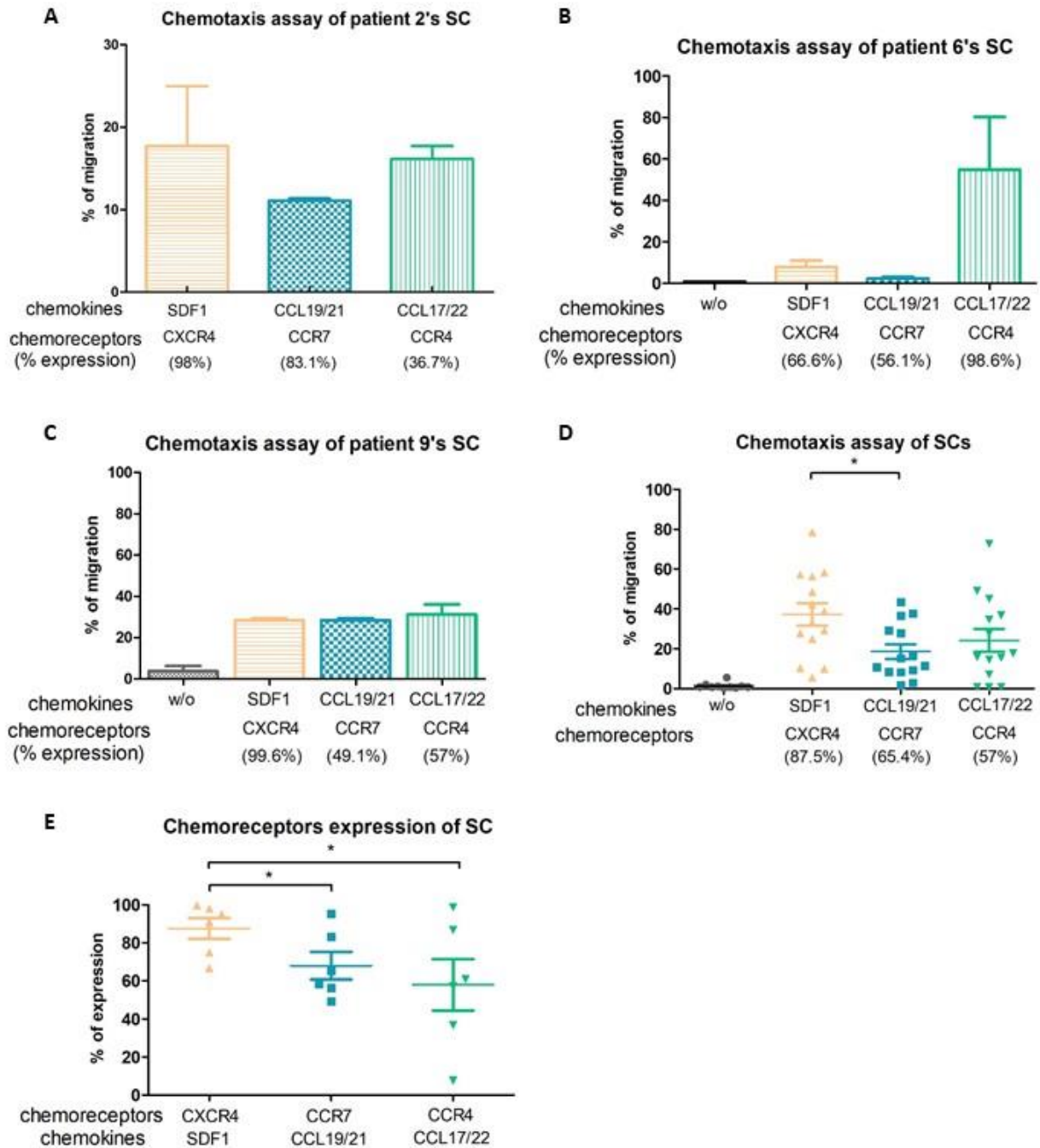


Figure S2: Chemotaxis of SC.

A), B) and C) Examples of *in vitro* chemotaxis assay of patients' SC through transwells with different chemokines added in the lower chamber : CCL19/21 (50/100 ng/mL) (CCR7 chemoattractant), SDF-1 (80 ng/mL) (CXCR4 chemoattractant), CCL17/22 (10/100 ng/mL) (CCR4 chemoattractant). The percentage of migrating cells was evaluated after 3 hours. The percentage of expression of the different chemoreceptors, previously measured by flow cytometry on SC surface, is mentioned under each condition.

Statistical analysis was performed using unpaired Mann-Whitney test. * = $p < 0.05$. **D)** Percentage of migration of patient 1, 2, 6, 7, 9 and 10 after 3 hours of incubation.

SC = Sézary cells.

Figure S3

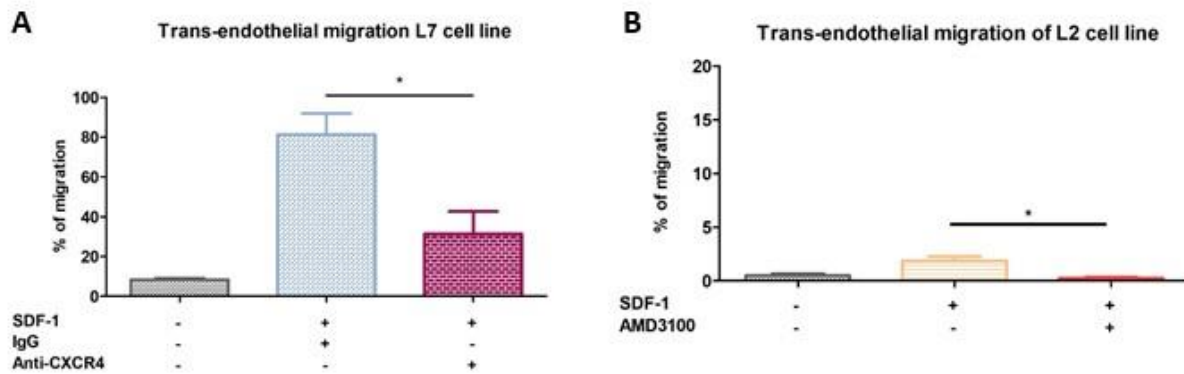


Figure S3: Trans-endothelial migration assay of patient 10 derived SC (L7 cell line) and CXCR4 low L2 cell line

A) and B) Trans-endothelial migration of patient 10 derived SC (L7 cell line) and L2 cell line

Transwells were precoated with a layer of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HMVECs). SDF-1 was added in the lower chamber (80 ng/mL). Cells were seeded in the upper chamber and treated with 50 µg/mL of anti-CXCR4 mAb or its isotype control or AMD3100 (1µg/mL). The percentage of migration was evaluated after 3 hours. Statistical analysis was performed using unpaired Mann-Whitney test. * = $p < 0.05$.

SC = Sézary cells, mAb = monoclonal Antibody.

Figure S4

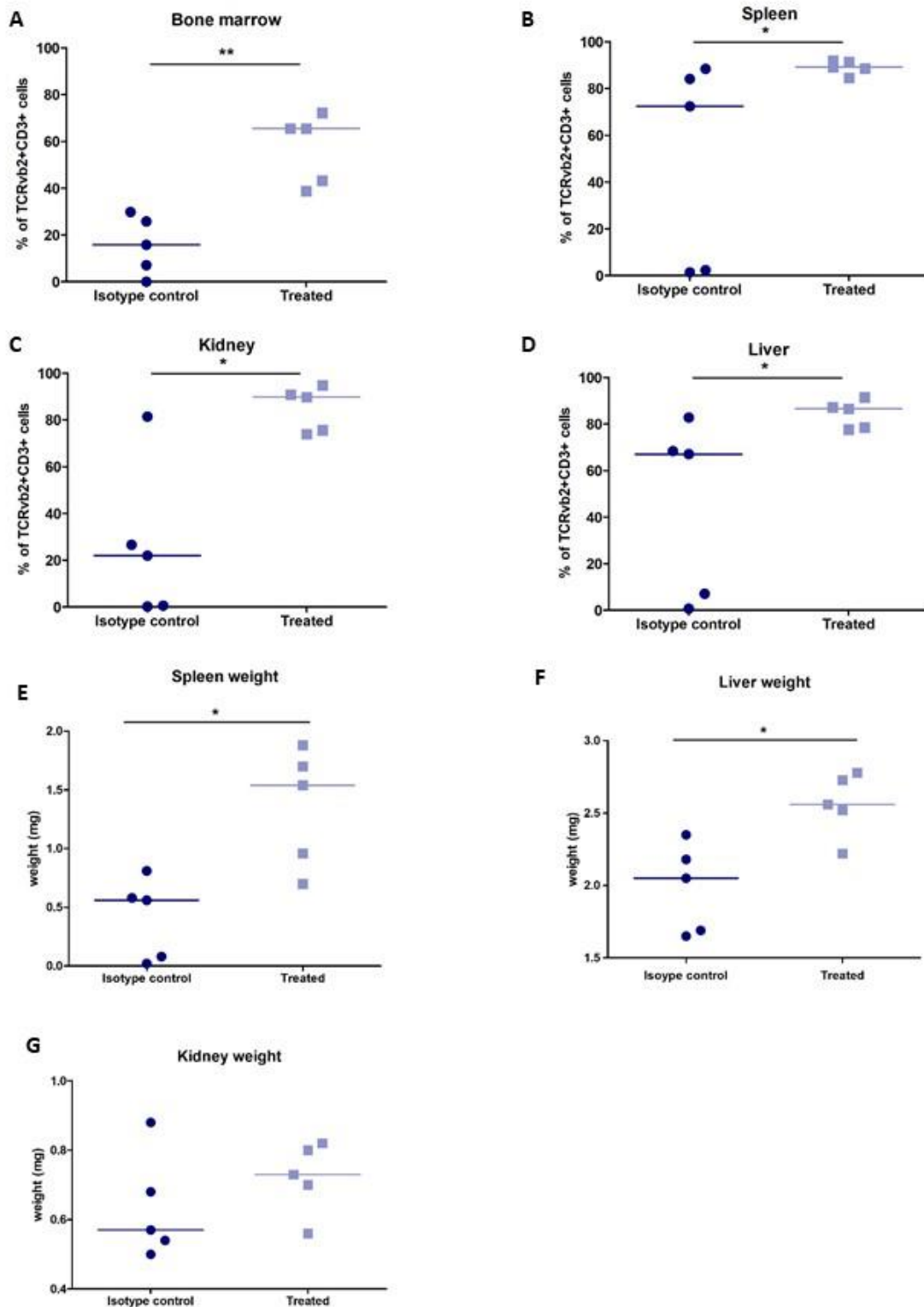


Figure S4: Effect of anti-CXCR4 antibody on the survival and dissemination of CTCL cell *in vivo*
Percentage of TCR β 2+CD3+ L1 human cells in different tissues : bone marrow (A), spleen (B), kidney (C), and liver (D).

E to G. Weight of different organs or mice injected with L1 cells treated with the isotype control or the anti-CXCR4 mAb : spleen (E), liver (F) and kidney (G).

Figure S5

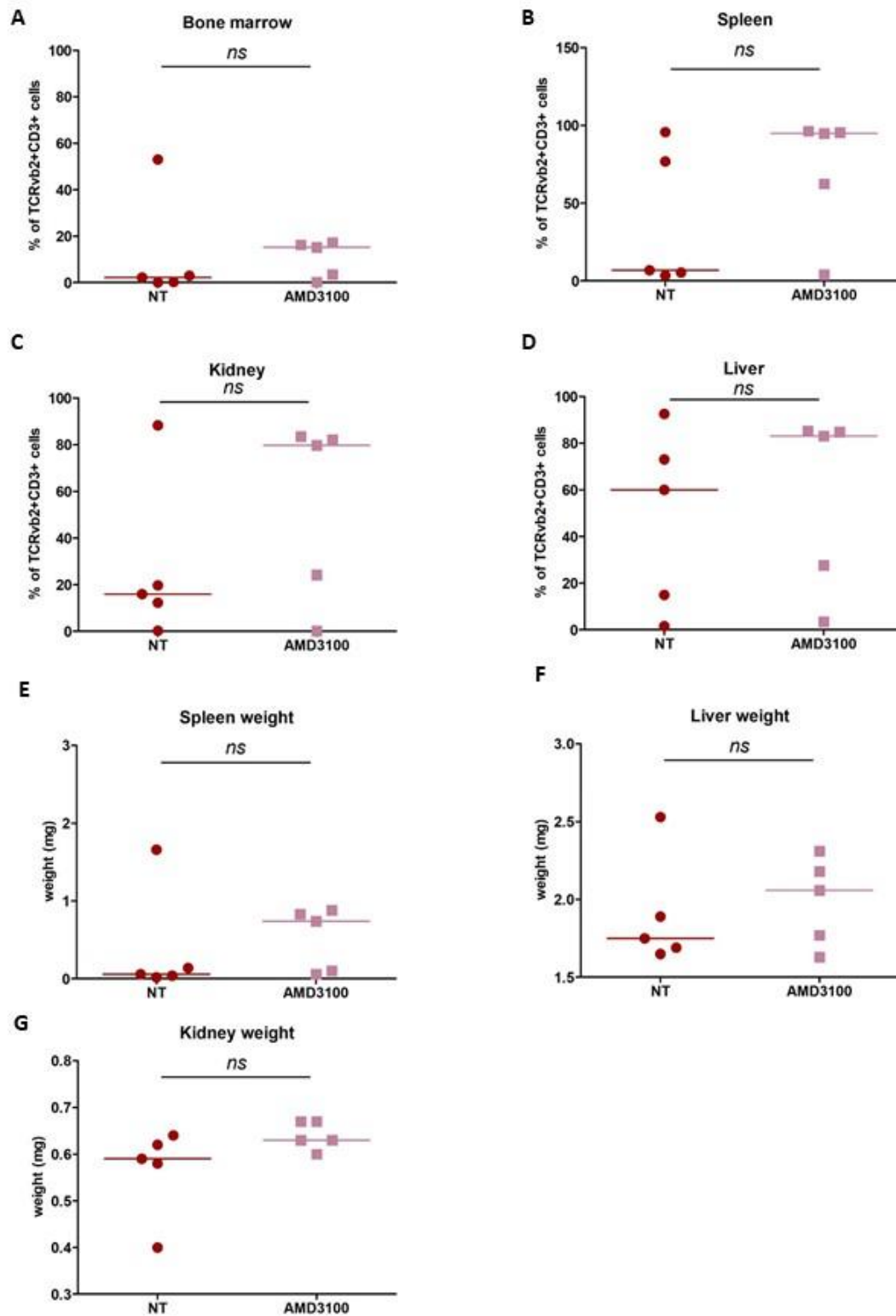


Figure S4: Effect of AMD3100 treatment on the survival and dissemination of CTCL cell *in vivo*
Percentage of TCRvβ2+CD3+ L1 human cells in different tissues : bone marrow (A), spleen (B), kidney (C), and liver (D).

E to G. Weight of different organs or mice injected with L1 cells treated with PBS or AMD3100 : spleen (E), liver (F) and kidney (G).

B) Publication issue du Projet de Master 2 (Co-premier AUTEUR): *APRIL-producing eosinophils are involved in gastric MALT lymphomagenesis induced by Helicobacter sp infection*



OPEN

APRIL-producing eosinophils are involved in gastric MALT lymphomagenesis induced by *Helicobacter sp* infection

Alice Blossse^{1,13,14}, Sara Peru^{1,14}, Michael Levy^{2,3}, Benoit Marteyn^{4,5}, Pauline Floch¹, Elodie Sifré¹, Alban Giese¹, Martine Prochazkova-Carlotti¹, Lamia Azzi Martin¹, Pierre Dubus^{1,13}, Francis Mégraud^{1,6,13}, Agnès Ruskone Fournestraux⁷, Bettina Fabiani⁸, Christiane Copie Bergman⁹, Cyrielle Robe¹⁰, Michael Hahne¹¹, Bertrand Huard¹² & Philippe Lehours^{1,6,13}✉

The roles of the inflammatory response and production of a proliferation-inducing ligand (APRIL) cytokine in gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomagenesis induced by *Helicobacter* species infection are not clearly understood. We characterized the gastric mucosal inflammatory response associated with gastric MALT lymphoma (GML) and identified APRIL-producing cells in two model systems: an APRIL transgenic mouse model of GML induced by *Helicobacter* infection (Tg-hAPRIL) and human gastric biopsy samples from *Helicobacter pylori*-infected GML patients. In the mouse model, polarization of T helper 1 (*tbet*), T helper 2 (*gata3*), and regulatory T cell (*foxp3*) responses was evaluated by quantitative PCR. In humans, a significant increase in *april* gene expression was observed in GML compared to gastritis. APRIL-producing cells were eosinophilic polynuclear cells located within lymphoid infiltrates, and tumoral B lymphocytes were targeted by APRIL. Together, the results of this study demonstrate that the Treg-balanced inflammatory environment is important for gastric lymphomagenesis induced by *Helicobacter* species, and suggest the pro-tumorigenic potential of APRIL-producing eosinophils.

The bacterium *Helicobacter pylori* induces chronic inflammation called gastritis within the gastric mucosa in humans. Gastritis is often asymptomatic but can progress to more serious pathologies such as gastric and duodenal ulcer, adenocarcinoma and, in approximately 0.1% of infected patients, gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma (GML)^{1,2}.

In GML, chronic antigenic stimulation by *H. pylori* on the gastric mucosa induces the formation of B-cell monoclonal infiltrates with a marginal zone immunophenotype^{1,3}. Reactive T lymphocytes (predominantly CD4⁺) are found within the infiltrates. These CD4⁺ cells allow the activation and proliferation of neoplastic B cells via CD40L-CD40 co-stimulation and the secretion of T helper type 2 cytokines such as interleukin 4^{3,4}. Some of

¹Univ. Bordeaux, INSERM, BaRITOn, U1053, 33000 Bordeaux, France. ²EC2M3: Department of Academic Research (EA7375), Université Paris Est Créteil (UPEC) – Val de Marne, 94000 Créteil, France. ³Department of Gastroenterology, Henri Mondor Hospital, APHP, 94000 Créteil, France. ⁴Institut Pasteur, Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. ⁵INSERM Unité 1202, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. ⁶French National Reference Center for Campylobacters and Helicobacters, Hôpital Pellegrin, 33076 Bordeaux, France. ⁷Department of Gastroenterology, Groupe d'Etude des Lymphomes Digestifs (GELD), Hôpital Saint Antoine, AP-HP, 75012 Paris, France. ⁸Department of Pathology, Hôpital Saint Antoine, APHP, 75012 Paris, France. ⁹Department of Pathology, Henri Mondor Hospital, APHP, INSERM U955, Equipe 9, Université Paris-Est, 94000 Créteil, France. ¹⁰INSERM U955, Equipe 9, Mondor Institute of Biomedical Research, 94000 Créteil, France. ¹¹IGMM, Univ Montpellier, CNRS, Montpellier, France. ¹²Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209, CNRS UMR 5309, University Grenoble-Alpes, 38700 La Tronche, France. ¹³CHU de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France. ¹⁴These authors contributed equally: Alice Blossse and Sara Peru. ✉email: philippe.lehours@u-bordeaux.fr

these T cells are regulatory cells (LTregs) that regulate local T-cell responses induced in the lymphoid follicles^{5,6}. The presence of LTregs as promoters of B-cell proliferation, either by directly stimulating B cells or suppressing T cells, was suggested by Craig et al.⁷ LTregs may also participate in the persistent chronic inflammation of the gastric mucosa due to *H. pylori*, as suggested by Laur et al.⁸ rendering the antigenic stimulation process mandatory for B-cell proliferation. Compared to non-responders, GML patients with high tumor LTreg infiltration show a better response to antibiotics, suggesting that LTregs play a role in the regression mechanisms of GML^{8,9}.

A proliferation-inducing ligand (APRIL) cytokine is a member of the tumor necrosis factor (TNF) family. APRIL shares protein homology with other members such as the B-cell activating factor (BAFF). APRIL and BAFF are synthesized as transmembrane type II proteins with a C-terminal domain, characteristic of members of the TNF family. APRIL is produced by cleavage into a soluble protein by a furin-like protease intracellularly before secretion. It is expressed by many cells of the immune system cells such as neutrophils, eosinophils, and macrophages^{10–12}.

The association of APRIL with carcinogenesis has long been suspected¹³. Accordingly, its role in cancer and lymphoma has been analyzed in several studies^{12,14–16}, but there have been few studies on the role of APRIL in GML^{17,18}. Tumor-infiltrating macrophages are a major source of APRIL in GML¹⁷; the production of APRIL is induced by *H. pylori* antigens and *H. pylori*-specific T cells¹⁷.

Since it was determined that *H. pylori* plays a role in the development of GML, many animal models have been developed to understand more fully the pathophysiology of GML. An alternative model of lymphomagenesis was used in our laboratory, based on *Helicobacter sp* infection of transgenic C57BL6 mice with the human form of the APRIL cytokine (Tg-hAPRIL)¹⁹.

We characterized the inflammatory response in the stomach of Tg-hAPRIL mice, a novel animal model of gastric lymphomagenesis, and validated these results in the gastric biopsies of GML patients. We evaluated the inflammatory response in gastric mucosa, verified the deregulation of APRIL in human GML, and identified cytokine-producing and target cells. Our results demonstrate that a Treg-balanced inflammatory environment is important for gastric lymphomagenesis induced by *Helicobacter* species, and suggest the pro-tumorigenic potential of APRIL-producing eosinophils.

Materials and methods

Murine material. Murine material from a previous mouse Tg-hAPRIL experiment was obtained as follows. The stomachs of WT or Tg-hAPRIL mice, uninfected (n = 9 each) or infected with *H. pylori* (n = 16 for WT and n = 14 for Tg-hAPRIL) or *H. felis* (n = 13 and n = 10, respectively), had been recovered 18 months post-infection as described by Floch et al.¹⁹ One part of the stomach was formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE), and another part was ground to recover leukocyte cells. A fraction of these cells had been cultured in RPMI medium overnight. Leukocytes and leukocyte supernatants (frozen at –80 °C after centrifugation) were available for our study¹⁹.

Patient selection. Eleven cases of primary GML (seven men, four women, mean age: 59.9 years) associated with *H. pylori* infection without t(11;18) (API2-MALT1) translocation were included in the present study. All GML patients were *H. pylori*-positive: nine were positive by histology, one by PCR detection on gastric biopsy only, and one by serology only. All patients had stage I gastritis according to the Ann Arbor staging system, and were treated with the typical antibiotic regimen for *H. pylori* eradication²⁰, which was followed by lymphoma regression.

The diagnosis of GML was based on histological analysis of gastric biopsies by an expert hematopathologist. GML was diagnosed according to the World Health Organization classification. The presence of the t(11;18) translocation was determined by amplification and sequencing of the API2-MALT1 fusion transcript according to a previously described method until 2012, and thereafter by interphase fluorescent in situ hybridization (FISH) using the MALT1 break apart probe as previously described²¹. *H. pylori* infection was assessed by modified Giemsa-stained tissue sections and/or immunohistochemistry (IHC) with an anti-*H. pylori* antibody on FFPE tissue sections of gastric biopsies. In addition, a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay was performed on frozen gastric biopsies as previously described²². The control group consisted of 16 gastric biopsies from patients referred for gastric endoscopy for gastric dyspepsia (n = 14), routine follow-up in the context of atrophic gastritis (n = 1), or exploration of anemia (n = 1) (six men, 10 women, mean age: 62.7 years +/– 12.1). We also used gastric biopsy blocks (sent from Saint Antoine Hospital, Paris, France) from these GML patients. The results are shown for two patients (40-year-old male, 62-year-old female), and are representative of the results obtained for the entire GML study population.

RNA extraction. The leukocyte RNAs of WT or Tg-hAPRIL mice, uninfected (n = 5 each) or infected with *H. pylori* (n = 10 for WT and n = 8 for Tg-hAPRIL) or *H. felis* (n = 11 and n = 10, respectively), were extracted according to a standard phenol–chloroform protocol. TRIzol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used before adding chloroform (ratio 1:5). Centrifugation at 12,000 g for 15 min allowed recovery of the aqueous phase containing the RNAs. The addition of isopropanol (ratio 1:1) followed by an additional 20 min 12,000 g centrifugation was used to concentrate the RNA in a pellet. The pellet was washed with 75% ethanol before resuspending in water. RNA quantification was performed using a spectrophotometer (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at 260 nm. The 260/280 nm ratio is a reflection of the quality and protein contamination in a sample. Total RNAs were also extracted from frozen gastric samples from GML individuals and the control group using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions, and were quantified using the NanoDrop. The QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) was used to reverse transcribe all murine RNAs extracted from leukocyte pellets and RNAs extracted from humans. A total of 250 ng

human RNA and 500 ng murine RNA were used to generate cDNA. The first step of genomic DNA removal was performed according to the supplier's recommendations (2 min at 42 °C), followed by reverse transcription to cDNA for 30 min at 42 °C and then for 3 min at 95 °C. The generated cDNAs were stored at –20 °C.

qPCR. qPCR was performed with the CFX96 thermocycler (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) using a qPCR platform (from SFR TransBioMed, Bordeaux, France), and 96-well plates (Bio-Rad). SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) reaction mixture (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) was used (as recommended by the supplier) with 0.2 μM specific primers and 10 ng murine or 5 ng human cDNA. Each target was tested in duplicate for all samples. Commercial primer pairs (RT² qPCR Primer Assay, Qiagen) or synthesized primer pairs (Eurofins Mwg Biotech, Courtaboeuf, France) were used to evaluate the relative expression level of human *april* (PPH01047C), human and murine *tbet* genes (PPH00396A, PPM03727A, respectively), human and murine *gata3* (PPH02143A, PPM05199A, respectively), and human and murine *foxp3* (PPH00029C, PPM05497F, respectively) compared to murine *hprt1* (Eurofins) and murine *gapdh* (Eurofins) or human *hprt1* (Eurofins) and human *gusb* (PPH01096H). Gene expression was compared by obtaining delta threshold cycle values (ΔCt) and normalizing to the expression of the two housekeeping genes. Relative gene expression values were calculated as 2-ΔΔCt according to the method described by Livak and Schmittgen²³. Cycle threshold (Ct) values above 35 were considered non-specific and not used for the analysis.

IHC. Serial sections (3 μm thick) were prepared, deposited on glass slides, and deparaffinized at 60 °C. After rehydration of the slides by successive toluene and alcohol baths (100 °C and 95 °C, respectively), the antigenic sites were unmasked. This unmasking was performed with primary antibody, using homemade buffers citrate (pH 6) or Tris EDTA (pH 9), for 15 or 30 min at 100 °C, and then 30 min at room temperature. Hydrogen peroxide (3%) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was used for 5 min to inactivate the endogenous peroxidases. Specific sites were blocked with horse serum solution. An adjustment was made to determine the optimal dilutions of each primary antibody (Table S1). The primary antibodies were labeled with secondary antibodies (Table S1) and the labels were revealed using Liquid DAB + Substrate Chromogen (Dako) peroxidase substrate followed by hematoxylin counterstaining (VWR International, Fontenay-Sous-Bois, France). The slides were subsequently dehydrated by successive alcohol and toluene baths (95 °C and 100 °C, respectively) to mount them between the slide and cover with the Eukitt mounting medium (VWR). The slides were scanned using the MIRAX SCAN scanner (3DHISTECH Ltd, Budapest, Hungary) and the images were read using Panoramic Viewer software (3DHISTECH Ltd).

Immunofluorescence. Serial sections (3 or 10 μm thick) were prepared, deposited on glass slides, deparaffinized, and rehydrated. To reveal primary antibody binding, fluorochrome-coupled secondary antibodies were used (Table S1). Slides were mounted between the slide and coverslip with ProLong™ Gold Antifade reagent or ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen), and stored at 4 °C. The images were captured with the Nikon TE50i epi-fluorescence microscope equipped with a 40× immersion objective and DS-Qi1Mc camera (Nikon, Champigny sur Marne, France), and then processed with NIS-BR software version 3.2 (Nikon) or with the Leica Microsystems SP5 confocal microscope equipped with a 63× immersion objective and camera (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Then the images were processed with Leica Application Suite Advanced Fluorescence software and ImageJ image analysis software version 1.48 (Java).

Purification of human neutrophils and eosinophils. Human peripheral blood was collected by venipuncture in tubes containing sodium citrate (3.8% final) as the anticoagulant. The neutrophils and eosinophilic polynuclear cells were purified with the MACSxpress Whole Blood Neutrophil Isolation Kit and the MACSxpress Whole Blood Eosinophil Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the supplier's recommendations, respectively. Son et al.²⁴ reported that the MACSxpress method consistently allowed high-purity isolation of eosinophils (95.0 ± 1.7%) and neutrophils (94.2 ± 10.1%). Then the cells were deposited on slides by cytocentrifugation (150×g, 4 min) and fixed in paraformaldehyde (4%). The fixed slides were stored at 4 °C until use. The purity of the purified cells was verified by May-Grunwald staining after cytocentrifugation.

Statistical analysis. To evaluate the significance of the results, statistical tests were performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). The Mann–Whitney test was used as a non-parametric test to compare the distributions of two unmatched groups. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Ethical issues. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. All experimental protocols were approved by a named institutional and/or licensing committee. Patients were recruited from the Gastroenterology Department's local database at Henri Mondor Hospital and/or the standardized hospital inpatient diagnostic database from 2001 to 2016. The study was approved by the Institutional Ethics Committee (Comité de protection des personnes, Protocol No. 15071-ID RCB:2015-A00342-47). Written informed consent of non-opposition to the use of biological material for study purposes was obtained from all patients. Human peripheral blood was also collected by venous puncture from healthy patients at the Bordeaux Blood Bank (Authorization No. 14PLER006). All participants gave their consent in accordance with the Helsinki Declaration of Principles.

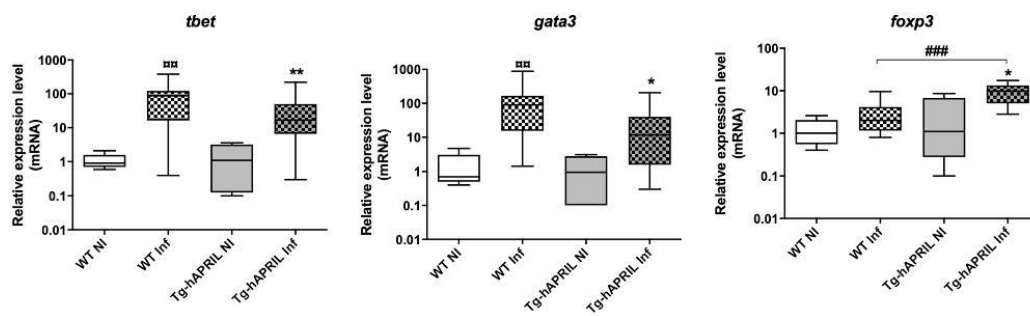


Figure 1. Polarization of gastric inflammatory response in WT and Tg-hAPRIL mice infected with *Helicobacter sp.* Relative expression of *tbet*, *gata3*, and *foxp3* genes in relation to NI control condition. Quantification by qPCR in leukocyte pellets according to genotype (WT or Tg-hAPRIL) and infectious status [non-infected (NI) ($n = 5$), infected (Inf) mice ($n = 21$ and $n = 18$, respectively)]. Boxed graphical representations, with the box representing 50% of values around the median (horizontal bar) and extremity segments representing extreme values, * (vs. Tg-hAPRIL NI): $p < 0.05$, ## (vs. WT NI) or ** (vs. Tg-hAPRIL NI): $p < 0.01$ and ###: $p < 0.0001$; Mann–Whitney test.

Helicobacter-free C57BL6 mice were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). APRIL transgenic (Tg) C57BL6 mice were originally provided by Dr. Michael Hahne (Université de Montpellier, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM)-UMR5535). All experiments were performed in specific pathogen-free animal facilities at the University of Bordeaux. Animal experiments were performed according to EU recommendations (European Directive 2010/63/EU) for animal experimentation. This study was evaluated by the local ethics committee of the University of Bordeaux and conformed to the French Ministry of Agriculture Guidelines on Animal Care and the French Committee of Genetic Engineering, with respect to the principle of the 3Rs (Replace, Reduce, Refined) (Approval No. 50120143-A). Only female neonates were used for experiments.

Results

Characterization of the gastric mucosal inflammatory response in a mouse model of gastric lymphomagenesis.

The relative expression levels of *tbet* (Th1), *gata3* (Th2), and *foxp3* (LTreg) genes in the leukocyte pellets were evaluated to characterize the polarization state of the infiltrating leukocytes at the GML stage in the mouse model Tg-hAPRIL. By qPCR, a significant increase in *tbet* and *gata3* gene expression was observed in infected WT and Tg-hAPRIL mice (*H. pylori* or *H. felis*). By comparing the relative expression levels of *tbet* with *gata3*, no significant difference was found in infected WT mice or Tg-hAPRIL mice, indicating the presence of a balanced Th1 and Th2 response within the gastric microenvironment (Fig. 1). In infected Tg-hAPRIL mice (*H. pylori* or *H. felis*), a significant increase in the relative expression of *foxp3* transcripts was also found, unlike in infected WT mice (Fig. 1), indicating the existence of a regulatory response in *Helicobacter*-infected Tg-hAPRIL at the GML stage. By comparing the relative expression levels of one gene with the others in this mouse model of GML, no significant difference was found, suggesting the presence of balanced Th1, Th2 and Treg responses within the gastric microenvironment at the GML stage.

Characterization of gastric mucosal inflammatory response in *H. pylori*-infected GML patients.

The evaluation of the relative expression levels of the *tbet*, *gata3*, and *foxp3* gene transcripts in RNA extracts from gastric biopsies of *H. pylori*-infected GML patients allowed characterization at the gastric level of the polarization of the inflammatory response of these patients, as compared to the gastritis control population. By qPCR, a significant increase in *tbet*, *gata3*, and *foxp3* gene expression was observed, confirming the presence of Th1, Th2, and regulatory responses in the human gastric microenvironment of GML patients (Fig. 2A) with no significant difference found between the relative gene expression levels. In addition, IHC detection of the CD20 surface marker of B lymphocytes as well as the CD3 and Foxp3 markers for T lymphocytes and LTregs confirmed the expected presence of lymphoid infiltrates composed mainly of B lymphocytes with some infiltrating T cells, among which LTregs were found (Fig. 2B).

Gastric characterization of APRIL expression in *H. pylori*-infected GML patients. To verify the dysregulation of APRIL in human GML, the relative expression levels of the *april* gene transcripts within RNA extracts from gastric biopsies from *H. pylori*-infected GML patients were evaluated. A significant increase in expression of the *april* gene, compared to gastritis, confirmed the presence of deregulation of this cytokine at the GML stage within the human gastric microenvironment (Fig. 3).

Identification of producer cells and target cells of the APRIL cytokine. To identify the human producer cells of APRIL and its target cells, two antibodies were used for IHC experiments: Stalk-1 antibody and Aprily-2 antibody. The Stalk-1 antibody recognizes the non-secreted and membrane-bound form of the cytokine and thus the producing cells, whereas Aprily-2 recognizes the secreted and internalized form and thus

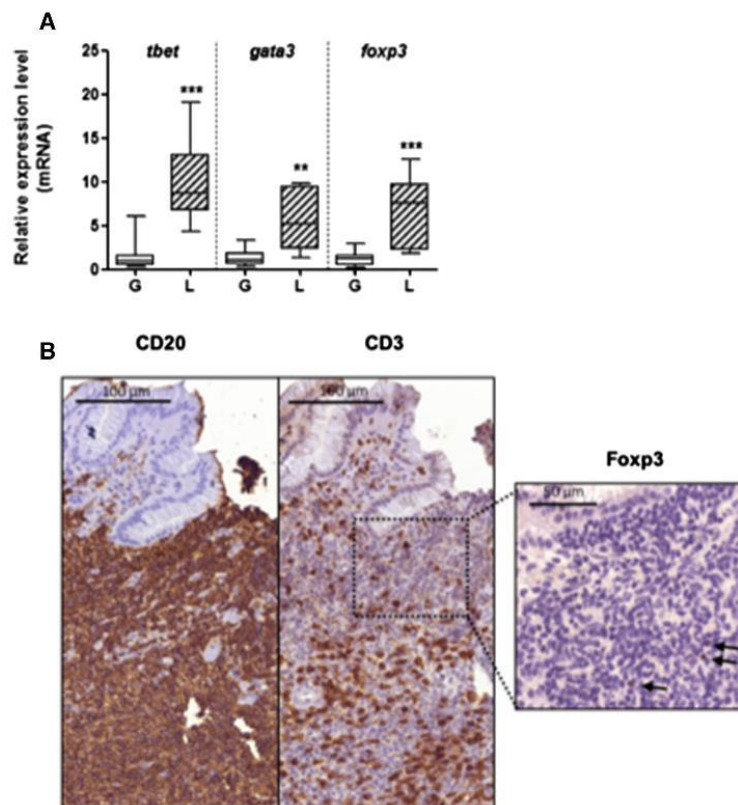


Figure 2. Polarization of gastric inflammatory response in patients with gastric MALT lymphoma. (A) Relative expression of *tbet*, *gata3* and *foxp3* genes relative to the gastritis control condition. Quantification by qPCR within RNA extracted from gastric biopsies of GML (L) patients (n = 11) or gastritis (G) control population (n = 16), all infected with *H. pylori*. Boxed graphical representations, with the box representing 50% of values around the median (horizontal bar) and extremity segments representing extreme values, ** (vs. Gastritis): $p < 0.01$, *** (vs. Gastritis): $p < 0.001$; Mann–Whitney test. (B) Example of B lymphocyte (CD20+), T lymphocyte (CD3+) and T regulatory cells (Foxp 3+, black arrows) staining within lymphoid infiltrate by IHC on sections of human gastric biopsies from GML patients.

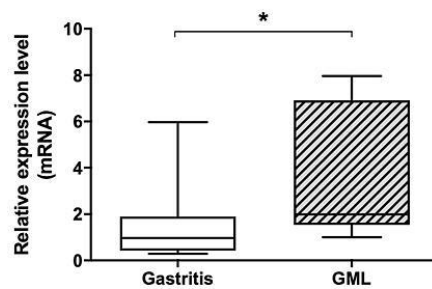


Figure 3. Quantification of the relative expression of the cytokine APRIL in patients with gastric MALT lymphoma. Relative expression of the *april* gene with respect to the gastritis control condition. Quantification by qPCR within RNA extracted from gastric biopsies of GML (L) (n = 11) or gastritis (G) patients (n = 16), all infected with *H. pylori*. Graphic representations are box plots, with the box representing 50% of values around the median (horizontal line) and the whiskers representing the minimum and maximum of all the data * (vs. Gastritis): $p < 0.05$.

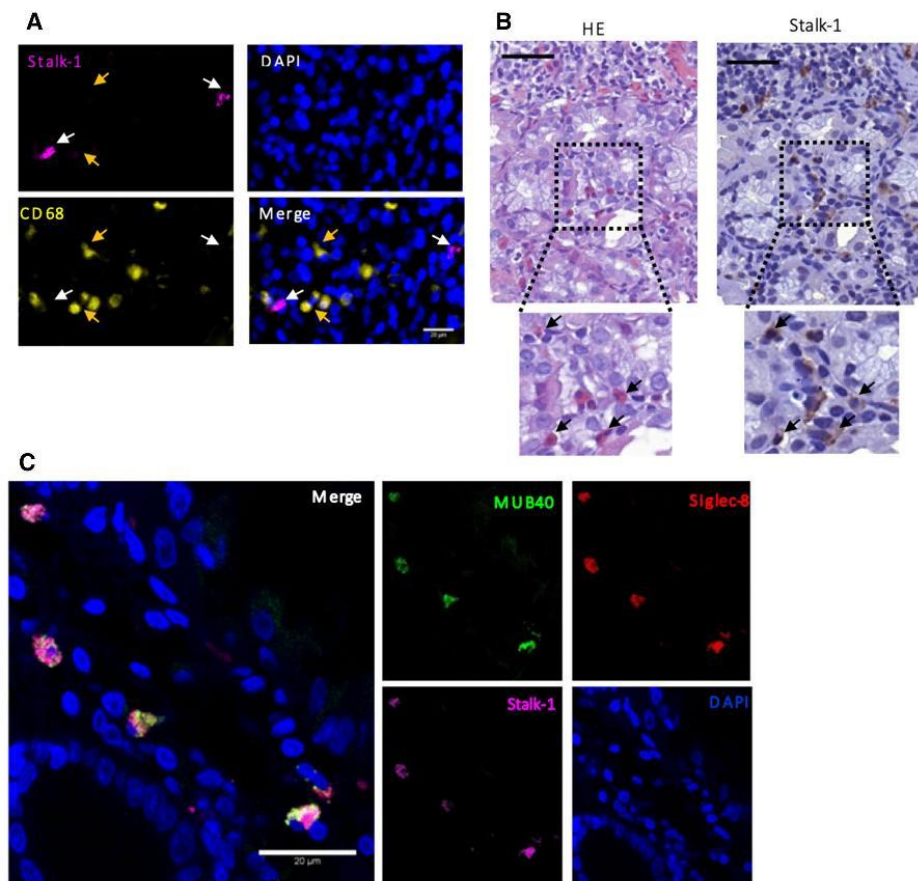


Figure 4. Identification of APRIL cytokine producing cells in gastric lymphoid infiltrates from patients with gastric MALT lymphoma. (A) Immunofluorescence co-labeling of the membrane form of APRIL with Stalk-1+ (magenta), CD68+ macrophages (yellow) and DAPI-labeled nuclei (blue) on sections of human gastric biopsies from GML patients. The white arrows indicate the APRIL-producing cells (Stalk-1+) and the yellow arrows the macrophages (CD68+). (B) Example of HE staining and APRIL staining (Stalk-1+) in serial sections of human gastric biopsies of GML patients. (C) Immunofluorescence co-labeling of the membrane form of the APRIL Stalk-1 (magenta), MUB40+/Siglec-8+ eosinophilic polynuclear cells (green and red) and DAPI-labeled nuclei (blue) on sections of human gastric biopsies of GML patients.

the target cells²⁵. The data obtained showed the presence of Stalk-1-positive cells within the infiltrates from GML patients (Fig. 4A, B). As suggested by Munari et al.¹⁷ we determined whether the cells producing APRIL were macrophages (CD68+) infiltrating the tumor. As immunofluorescence data did not show Stalk-1/CD68 co-labeling (Fig. 4A), we concluded that APRIL-producing cells within lymphoid infiltrates of GML patients were not macrophages, as previously described¹⁷. Hematoxylin and eosin staining (H&E) and IHC using Stalk-1 were performed on serial sections of FFPE tissue sections of the two gastric biopsies from GML patients. The APRIL-producer cells resembled polymorphonuclear leukocytes macroscopically and, in particular, eosinophils (Fig. 4B).

To validate this hypothesis, double immunofluorescence staining on purified human polymorphonuclear leukocytes was performed. The myelotracker (also known as MUB40—a neutrophil lactoferrin marker)^{26,27}, coupled with cyanine-5 was used. Given the presence of granulation in the eosinophilic polynuclear cells, this compound could also mark this other type of polymorphonuclear leukocytes. Eosinophil-specific anti-Siglec-8 (sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins) antibodies were used to stain human eosinophils²⁸. This double MUB40-Siglec-8 staining was first validated on purified human eosinophilic polynuclear cells using normal human purified neutrophils as a control, after verifying the effectiveness of the purification by performing May-Grünwald Giemsa staining on the purified cells (Fig. S1A, B). As expected, the immunofluorescence results showed simple MUB40 + Siglec-8—labeling (Fig. S1C) for human neutrophils, whereas the human eosinophils

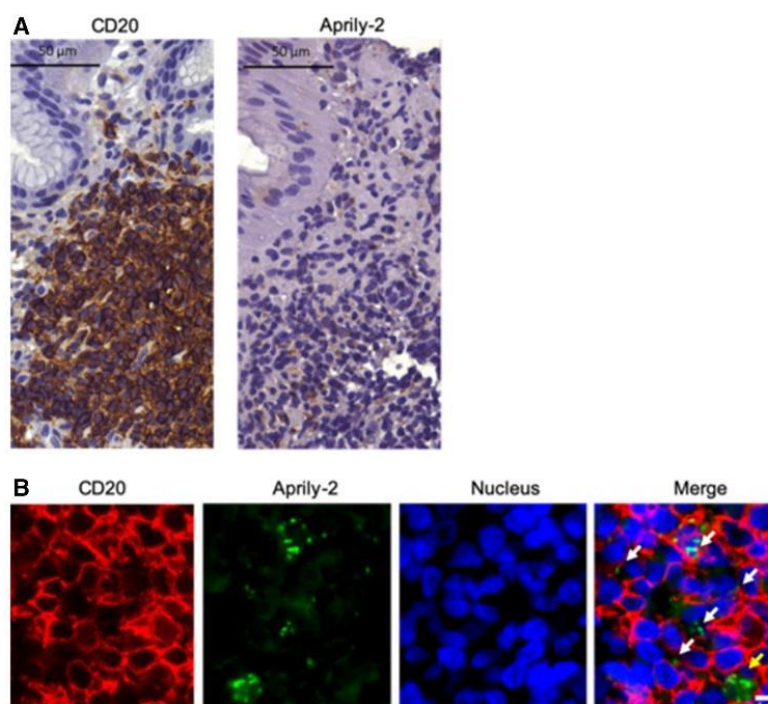


Figure 5. Identification of APRIL cytokine target cells in gastric biopsies from patients with gastric MALT lymphoma. **(A)** Example of B lymphocyte (CD20+) and APRIL (Aprily-2+) labeling in lymphoid infiltrates by IHC on sections of human gastric biopsies from GML patients. **(B)** Immunofluorescence co-labeling of B lymphocyte (CD20+ in red), APRIL cytokine (Aprily-2+ in green) and DAPI-labeled nuclei (blue) on sections of human gastric biopsies from GML patients. The white arrows indicate the B lymphocytes that internalized APRIL and the yellow arrows the CD20-cells that internalized the cytokine.

were double labeled with MUB40 + Siglec-8 + (Fig. S1D). We analyzed human gastric biopsies of GML patients and found that Stalk1+ cells were double-positive for MUB40 and Siglec-8. In conclusion, within the lymphoid infiltrates, the cells producing APRIL appeared to be eosinophilic polynuclear cells (Fig. 4C).

Target cells of the APRIL cytokine. The presence of APRIL cytokine targeted cells with lymphoid infiltrates of human GML was estimated by IHC. Detection of the secreted and internalized form of the cytokine was performed on tissue sections of gastric biopsies from patients with GML, using the Aprily-2 antibody. Numerous cells present in the infiltrates were Aprily-2-positive (Fig. 5A). Co-labeling with Aprily-2 and CD20 was performed and analyzed by immunofluorescence (IF), revealing the co-localization of these two markers (white arrows, Fig. 5B). Therefore, the target cells of the APRIL cytokine were predominantly B lymphocytes. However, some cells did not exhibit Aprily-2/CD20 co-labeling (yellow arrows, Fig. 5B). As Munari et al.¹⁷ suggested that macrophages could be Aprily-2-positive, IF was performed on serial tissue sections of gastric biopsies from patients with GML using anti-CD68 and Aprily-2 antibodies (Fig. S2). Only rare CD68+/Aprily-2+ cells were found (orange arrow, Fig. S2), possibly corresponding to macrophages that phagocytized their environment and thus internalized APRIL.

In conclusion, the use of two distinct antibodies that differentiate APRIL producer cells from target cells, combined with appropriate cell markers, allowed us to demonstrate that tumor B cells in GML are targeted by this cytokine, which is produced by tumor-infiltrating eosinophilic polynuclear cells.

Discussion

To understand more fully the pathophysiology of GML induced by *H. pylori* infection, an alternative model was implemented in our laboratory that relies on the use of transgenic C57BL6 mice for the human form of the APRIL cytokine (Tg-hAPRIL), and infected with *Helicobacter sp* (*H. pylori* or *H. felis*)¹⁹. We showed that the Tg-hAPRIL mouse model infected with *Helicobacter sp* closely reproduces the pathology of human GML with the same balanced gastric Th1, Th2, and Treg inflammatory response. The dysregulation of APRIL at the gastric

level has been confirmed in patients with GML. B lymphocytes were identified as the target of the APRIL cytokine that appeared to be produced by tumor-infiltrating eosinophils.

We first investigated the local inflammatory response at the gastric level in murine models to identify the inflammatory environment favorable to the appearance of GML in infected Tg-hAPRIL mice. At the GML stage, the inflammatory response at the gastric level was balanced. Indeed, an increase in the expression of transcription factors for Th1 (*tbet*) and Th2 (*gata3*) responses was observed in both infected murine models (WT and Tg-hAPRIL mice). We also confirmed these findings in patients with GML. This balanced inflammatory response within the gastric microenvironment at GML stage was already described by D'Elia et al.²⁹ who showed that gastric *H. pylori*-reactive T-cell clones from MALT lymphoma comprised a larger proportion of Th clones secreting both Th1- and Th2-type cytokines, suggesting that mechanisms other than cytokines could be involved in the *H. pylori*-dependent enhanced T-cell help for B-cell proliferation. The role of a regulatory response must also be considered. In infected Tg-hAPRIL mice, a more intense regulatory response was found in contrast to infected WT mice. The intensity of this response may explain the higher level of bacterial colonization in infected Tg-hAPRIL mice²⁷ compared to infected WT mice. As suggested², Treg cells could participate in the persistence of the pathogen in the gastric mucosa by delaying the inflammatory response to allow chronic antigen stimulation necessary for lymphoid proliferation.

The role of APRIL in cancers and lymphomas has been analyzed in several studies^{12,14–16}. Chonwerawong et al.³⁰ have recently suggested that BAFF, another member of the TNF family, may be involved in the development of gastric mucosal hyperplasia and B-cell lymphoid follicles formation in mice lacking Nlr5 (NLR family CARD domain-containing 5) infected by *H. felis*. Here, we highlight the deregulation of APRIL in patients with GML, compared to a control population of patients with gastritis, suggesting a potential role of this cytokine in the development of GML in humans. Indeed, we showed that tumor B cells internalize this cytokine. Since APRIL is involved in lymphocyte regulation and B lymphocyte development, overexpression of this cytokine could contribute to the significant proliferation of neoplastic B cells present in lymphoid infiltrates.

We also identified APRIL-producing cells in the lymphoid infiltrates of GML patients. To differentiate between the target cells and the cytokine producer cells, two antibodies were used: Stalk-1 and Aprily-2. The Stalk-1 antibody recognizes a peptide located at the level of the extracellular domain that remains associated with the membrane after proteolytic cleavage (aa 67–79, which correspond to the peptide GTGGPSQNGEGYP); it is therefore directed against the cells producing the cytokine. The Aprily-2 antibody is directed against the extracellular portion of the protein (aa 93–233) and the secreted form after proteolytic cleavage, thus allowing APRIL cytokine target cells to be recognized²⁵. Our data show that APRIL was not produced by macrophages, unlike the report of Munari et al.¹⁷ which, in a different cohort of GML patients and using Aprily-2 antibody against the secreted form of APRIL, found APRIL production by macrophages (CD68⁺) infiltrating the tumor. The cells producing the APRIL cytokine within the tumor were identified in the present work as eosinophilic polynuclear cells. This identification was made possible by study of their cellular morphology (nuclear and cytoplasmic granulations) and the results of previously validated IF staining. The use of the myelotracker (MUB40) known as a neutrophil-specific marker allowed us to characterize Stalk-1 positive cells as polymorphonuclear leukocytes. The association with the anti-Siglec-8 antibody enabled us to distinguish between neutrophil (anti-Siglec-8 negative) and eosinophilic polynuclear cells (anti-Siglec-8 positive).

This distinction was important since neutrophil polynuclear cells were previously identified by Schwaller et al.²⁵ as the major cellular source of the APRIL cytokine within tumor tissue infiltrates in patients with diffuse large B-cell lymphoma, which is part of non-Hodgkin B-cell lymphomas like GML. However, eosinophilic polynuclear cells were also identified as cells producing the APRIL cytokine in other studies^{31–33}. Among the factors that allow the recruitment of these cells, exposure to pathogens such as *H. pylori* has already been reported³⁴.

Eosinophils comprise part of the inflammatory reaction in *H. pylori* gastritis. Indeed, in 1991 McGovern et al.³⁵ suggested that the severity of chronic gastritis was significantly correlated with eosinophil infiltration. A few years later, Aydemir et al.³⁶ showed that eosinophil infiltration in gastric mucosa was greater in *H. pylori*-positive patients than in *H. pylori*-negative patients. Bold et al.³⁷ also described the presence of eosinophils in the gastric lamina propria in 65% of *H. pylori*-positive chronic gastritis patients and the eosinophils were even more numerous in atrophic gastritis patients with intestinal metaplasia. It was therefore suggested that eosinophils may participate in the immune response against *H. pylori*. However, Arnold et al.³⁴ recently showed that *H. pylori* escapes their bactericidal activity. As a result, we investigated the APRIL expression by eosinophils in gastritis and atrophic gastritis cases to see whether *H. pylori* infection could induce expression in vitro using eosinophils purified from peripheral blood of normal donors (coculture experiments). Unfortunately, neither *april* gene upregulation nor APRIL production were detected (data not shown), indicating that circulating eosinophils cells are probably different from tumor-infiltrating ones. This latter category could indeed be influenced by the tumor microenvironment and especially the local inflammatory response, which could not be reproduced in vitro.

Several studies have shown tumor-associated tissue eosinophilia in various types of tumors, such as in Hodgkin lymphoma where it is associated with poor prognosis³³; however, to date, the presence of tumor-infiltrating eosinophils in the context of GML has been poorly described. Herrera-Goepfert et al.³⁸ showed in a set of 35 low-grade and 16 high-grade GML patients that 73.8% exhibited an increased number of eosinophils accompanied by precancerous lesions such as intestinal metaplasia and atrophy. Piazuolo et al.³⁹ proposed that eosinophils play a dual role in chronic gastritis by either downregulating or favoring the effects of Th1 proinflammatory cytokines. In the context of *H. pylori* infection, Arnold et al.³⁴ showed in vivo that eosinophils suppress Th1 responses locally; this, in turn, could be an explanation for the bacterial gastric persistence, itself known to be involved in the initiation of the lymphomagenesis process. The identification of tumor-infiltrating eosinophils as the source of APRIL production in GML, as shown in the present study, is therefore of major interest. They no doubt play an important role in lymphocyte proliferation of targeted B-cells by their regulatory contribution⁴⁰ to the inflammatory response and preservation of the bacterial load in vivo.

In conclusion, our results demonstrate that the cellular and inflammatory microenvironment is a key contributor to gastric lymphomagenesis. We now have an easy-to-implement model to evaluate the effect of different cytokine receptor inhibitors of the TNF family or activated signaling pathways on the establishment of GML. This is the first description of the implication of APRIL in low grade B cell lymphoma. In our opinion, the identification of APRIL production by eosinophils involved in GML paves the way for more extensive research on the pro-tumoral role of these cells. The targetability of the APRIL producing eosinophils in gastric MALT lymphomagenesis induced by *H. pylori* infection could represent an interesting strategy.

Received: 23 March 2020; Accepted: 3 August 2020

Published online: 09 September 2020

References

- Ferreri, A. J., Ernberg, I. & Copie-Bergman, C. Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects. *J. Intern. Med.* **265**, 421–438 (2009).
- Peek, R. M. & Crabtree, J. E. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J. Pathol.* **208**, 233–248 (2006).
- Suarez, F., Lortholary, O., Hermine, O. & Lecuit, M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood* **107**, 3034–3044 (2006).
- Craig, V. J. et al. Gastric MALT lymphoma B cells express polyreactive, somatically mutated immunoglobulins. *Blood* **115**, 581–591 (2010).
- Laur, A. M. et al. Regulatory T cells may participate in *Helicobacter pylori* persistence in gastric MALT lymphoma: lessons from an animal model. *Oncotarget* **7**, 3394–3402 (2016).
- Kuo, S.-H. et al. Novel Insights of lymphomagenesis of *Helicobacter pylori*-dependent gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancers* **11**, 1–20 (2019).
- Craig, V. J. et al. B-cell receptor signaling and CD40 ligand-independent T cell help cooperate in *Helicobacter*-induced MALT lymphomagenesis. *Leukemia* **24**, 1186–1196 (2010).
- García, M. et al. Study of regulatory T-cells in patients with gastric malt lymphoma: influence on treatment response and outcome. *PLoS ONE* **7**, 1–7 (2012).
- Iwaya, Y. et al. High levels of FOXP3(+) regulatory T cells in gastric MALT lymphoma predict responsiveness to *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter* **18**, 356–362 (2013).
- Huard, B. et al. APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J. Clin. Invest.* **118**, 2887–2895 (2008).
- Stein, J. V. et al. APRIL modulates B and T cell immunity. *J. Clin. Invest.* **109**, 1587–1598 (2002).
- Mhawech-Fauceglia, P. et al. The source of APRIL up-regulation in human solid tumor lesions. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 697–704 (2006).
- Hahne, M. et al. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J. Exp. Med.* **188**, 1185–1190 (1998).
- Chiu, A. et al. Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood* **109**, 729–739 (2007).
- Rennert, P. et al. A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth. *J. Exp. Med.* **192**, 1677–1684 (2000).
- Lascano, V. et al. The TNF family member APRIL promotes colorectal tumorigenesis. *Cell Death Differ.* **19**, 1826–1835 (2012).
- Munari, F. et al. Tumor-associated macrophages as major source of APRIL in gastric MALT lymphoma. *Blood* **117**, 6612–6616 (2011).
- Planelles, L., Medema, J. P., Hahne, M. & Hardenberg, G. The expanding role of APRIL in cancer and immunity. *Curr. Mol. Med.* **8**, 829–844 (2008).
- Floch, P. et al. A new animal model of gastric lymphomagenesis: APRIL transgenic mice infected by *Helicobacter* species. *Am. J. Pathol.* **187**, 1473–1484 (2017).
- Malfetheriner, P. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/florence consensus report. *Gut* **61**, 646–664 (2012).
- Amiot, A. et al. Rituximab, alkylating agents or combination therapy for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a monocentric non-randomised observational study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **39**, 619–628 (2014).
- Tankovic, J., Lamarque, D., Lascos, C., Soussy, C. J. & Delchier, J. C. Clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* has a major impact on the efficacy of the omeprazole-amoxicillin-clarithromycin therapy. *Pathol. Biol. (Paris)* **49**, 528–533 (2001).
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods San Diego Calif.* **25**, 402–408 (2001).
- Son, K. et al. Improved recovery of functionally active eosinophils and neutrophils using novel immunomagnetic technology. *J. Immunol. Methods* **449**, 44–55 (2017).
- Schwaller, J. et al. Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. *Blood* **109**, 331–338 (2007).
- Anderson, M. C. et al. MUB40 binds to Lactoferrin and stands as a specific neutrophil marker. *Cell Chem. Biol.* **25**, 483–493 (2018).
- Anderson, M. C., Injarabian, L., Andre, A., Tournebize, R. & Marteyn, B. S. The MUB40 peptide for use in detecting neutrophil-mediated inflammation events. *J. Vis. Exp. JoVE* **143**, e58367 (2019).
- Floyd, H. et al. Siglec-8. A novel eosinophil-specific member of the immunoglobulin superfamily. *J. Biol. Chem.* **275**, 861–866 (2000).
- D'Elios, M. M. et al. Impaired T-cell regulation of B-cell growth in *Helicobacter pylori*-related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology* **117**, 1105–1112 (1999).
- Chonwawong, M. et al. Innate immune molecule NLRCS protects mice from *Helicobacter*-induced formation of gastric lymphoid tissue. *Gastroenterology* **159**, 169–182 (2020).
- Chu, V. T. et al. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat. Immunol.* **12**, 151–159 (2011).
- Kawakami, T. et al. Abundant a proliferation-inducing ligand (APRIL)-producing macrophages contribute to plasma cell accumulation in immunoglobulin G4-related disease. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. Eur. Ren. Assoc.* **34**, 960–969 (2018).
- Davis, B. P. & Rothenberg, M. E. Eosinophils and cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 1–8 (2014).
- Arnold, L. C. et al. Eosinophils suppress Th1 responses and restrict bacterially induced gastrointestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **215**, 2055–2072 (2018).
- McGovern, T. W., Talley, N. J., Kephart, G. M., Carpenter, H. A. & Gleich, G. J. Eosinophil infiltration and degranulation in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis. *Dig. Dis. Sci.* **36**, 435–440 (1991).

36. Aydemir, S. A., Tekin, I. O., Numanoglu, G., Borazan, A. & Ustundag, Y. Eosinophil infiltration, gastric juice and serum eosinophil cationic protein levels in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis and gastric ulcer. *Med. Inflamm.* **13**, 369–372 (2004).
37. Bold, A. *et al.* Gastric eosinophilia—clinical and morphological correlations. *Rom. J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* **54**, 805–809 (2013).
38. Herrera-Goepfert, R., Arista-Nasr, J. & Alba-Campomanes, A. Pathologic features of the gastric mucosa adjacent to primary MALT-lymphomas. *J. Clin. Gastroenterol.* **29**, 266–269 (1999).
39. Piazzuelo, M. B. *et al.* Eosinophils and mast cells in chronic gastritis: possible implications in carcinogenesis. *Hum. Pathol.* **39**, 1360–1369 (2008).
40. Long, H., Liao, W., Wang, L. & Lu, Q. A player and coordinator: the versatile roles of eosinophils in the immune system. *Transfus. Med. Hemother. Off. Organ Dtsch. Ges. Transfusionsmedizin Immunhamatologie* **43**, 96–108 (2016).

Acknowledgements

The authors thank Dr. Caroline Barau and Maxime Anquetin from the Plateforme de Ressources Biologiques BB-0033-00021, APHP, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France. The English in this document has been checked by at least two professional editors, both native speakers of English.

Author contributions

Conceptualization, L.P.; Data curation, L.P.; Formal analysis, B.A., P.S., M.B., S.E., A.M.L. and H.B.; Funding acquisition, L.P.; Investigation, L.M., R.F.A. and C.B.C.; Methodology, B.A., P.S., L.M., M.B., S.E., F.P., G.A., C.M., A.M.L., C.B.C., H.M. and H.B.; Resources, L.M., R.F.A., F.B., C.B.C., R.C., H.M. and H.B.; Software, A.M.L.; Supervision, H.B. and L.P.; Validation, B.A., P.S. and L.P.; Visualization, S.E., G.A., A.M.L. and D.P.; Writing—original draft, B.A., P.S., L.M., M.B., A.M.L., R.F.A., F.B. and R.C.; Writing—review and editing, M.F., C.B.C., H.B. and L.P.

Funding

This study was funded by the “Ligue Contre le Cancer—Comité Lot et Garonne”.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71792-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.L.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

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



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

C) Publication (participation lors d'un Projet de Master 1) : *TAZ controls Helicobacter pylori-induced Epithelial Mesenchymal Transition and cancer stem cell-like invasive and tumorigenic properties*

Article

TAZ Controls *Helicobacter pylori*-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell-Like Invasive and Tumorigenic Properties

Camille Tiffon¹, Julie Giraud¹, Silvia Elena Molina-Castro^{1,2} , Sara Peru¹, Lornella Seeneevassen¹, Elodie Sifré¹ , Cathy Staedel³, Emilie Bessède^{1,4}, Pierre Dubus^{1,4}, Francis Mégraud^{1,4}, Philippe Lehours^{1,4} , Océane C.B. Martin¹ and Christine Varon^{1,*} 

¹ INSERM, UMR1053 Bordeaux Research in Translational Oncology, BaRITOn, University of Bordeaux, F33000 Bordeaux, France; camille.tiffon@u-bordeaux.fr (C.T.); julie.giraud085@gmail.com (J.G.); smolina13@gmail.com (S.E.M.-C.); sara.peru@etu.u-bordeaux.fr (S.P.); lornella.seeneevassen@u-bordeaux.fr (L.S.); elodie.sifre@u-bordeaux.fr (E.S.); emilie.bessede@u-bordeaux.fr (E.B.); pierre.dubus@u-bordeaux.fr (P.D.); francis.megraud@chu-bordeaux.fr (F.M.); philippe.lehours@u-bordeaux.fr (P.L.); oceane.martin@u-bordeaux.fr (O.C.B.M.)

² Institute for Health Research, University of Costa Rica, Sabanilla 11502, Costa Rica

³ INSERM, UMR1212, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France; Cathy.staedel@inserm.fr

⁴ CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

* Correspondence: christine.varon@u-bordeaux.fr; Tel.: +33-(0)5-57-57-95-75

Received: 1 May 2020; Accepted: 10 June 2020; Published: 13 June 2020



Abstract: *Helicobacter pylori* infection, the main risk factor for gastric cancer (GC), leads to an epithelial–mesenchymal transition (EMT) of gastric epithelium contributing to gastric cancer stem cell (CSC) emergence. The Hippo pathway effectors yes-associated protein (YAP) and transcriptional co-activator with PDZ binding motif (TAZ) control cancer initiation and progression in many cancers including GC. Here, we investigated the role of TAZ in the early steps of *H. pylori*-mediated gastric carcinogenesis. TAZ implication in EMT, invasion, and CSC-related tumorigenic properties were evaluated in three gastric epithelial cell lines infected by *H. pylori*. We showed that *H. pylori* infection increased TAZ nuclear expression and transcriptional enhancer TEA domain (TEAD) transcription factors transcriptional activity. Nuclear TAZ and zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1) were co-overexpressed in cells harboring a mesenchymal phenotype in vitro, and in areas of regenerative hyperplasia in gastric mucosa of *H. pylori*-infected patients and experimentally infected mice, as well as at the invasive front of gastric carcinoma. TAZ silencing reduced ZEB1 expression and EMT phenotype, and strongly inhibited invasion and tumorsphere formation induced by *H. pylori*. In conclusion, TAZ activation in response to *H. pylori* infection contributes to *H. pylori*-induced EMT, invasion, and CSC-like tumorigenic properties. TAZ overexpression in *H. pylori*-induced pre-neoplastic lesions and in GC could therefore constitute a biomarker of early transformation in gastric carcinogenesis.

Keywords: gastric cancer; *Helicobacter pylori*; hippo pathway; ZEB1; epithelial–mesenchymal transition; TAZ; WWTR1; cancer stem cells; YAP

1. Introduction

Gastric cancer (GC) is the third leading cause of cancer-related death worldwide [1,2]. GCs are mostly non-cardia gastric adenocarcinomas, occurring in patients around 70 years old. In most situations, GC has an infectious origin, attributed to the infection by the bacterium *Helicobacter pylori*.

Half of the world's population is infected with *H. pylori*, and this infection is detected in more than 92% GC cases [3,4].

Infection with *H. pylori* always leads to chronic inflammation of the gastric mucosa, which can potentially evolve slowly into atrophy, metaplasia, and dysplasia, and in the worst scenario leads to non-cardia gastric carcinoma after several decades [5]. The major *H. pylori* virulence factor is carried by the *cag* pathogenicity island (*cagPAI*), which encodes a type 4 secretion system (T4SS) and the cytotoxin associated gene A (*cagA*) oncoprotein (CagA). When CagA is injected into gastric epithelial cells via the T4SS, it can induce perturbations of several signaling pathways, leading to the destabilization of inter-cellular junctions, polarity complexes, and pro-inflammatory responses [6]. Previous studies, including those performed in our laboratory, have shown that *H. pylori* induces an epithelial–mesenchymal transition (EMT) of epithelial cells of the gastric mucosa. EMT is a very well-known pathophysiological trans-differentiation process that confers mesenchymal phenotype and properties to epithelial cells. In the gastric context, this EMT is characterized by the loss of epithelial polarity and cellular junctions and the acquisition of a mesenchymal, motile phenotype called the “hummingbird” phenotype [7–10]. The overexpression of zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1) and Snail transcription factors and of structural components such as Vimentin, as well as migration and invasion capacities are reminiscent events of the EMT process. EMT also occurs during cancer dissemination to allow cell extravasation through blood vessels and dissemination to distant organs, thereby initiating metastases [11]. EMT can also lead to the emergence of cells with cancer stem cell (CSC) properties in different cancers including GC [12–14]. CSCs represent a rare cell subpopulation within the tumor that is able to initiate tumor development and dissemination to form distant metastases. CSCs are more resistant to conventional chemotherapy than the more differentiated tumor cells and can be identified by the expression of immaturity markers such as cluster of differentiation 44 (CD44) and aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 (ALDH1A1) in GC [15–17]. Their recent discovery in GC [15,17–19] is a very promising research axis, allowing an earlier detection of the cells at the origin of CSC in pre-neoplastic lesions, as well as the development of CSC-based targeted therapies [20,21].

Several pathways, including the Hippo signaling pathway, have been described to control CSC properties. The Hippo pathway, a highly conserved signaling pathway, from fruit flies to humans, is involved in physiology in the modulation of organ size during development and the maintenance of stemness, especially in the gastrointestinal tract. Its dysregulation, in pathological conditions, can lead to cancer emergence and progression [22–25]. The Hippo pathway is controlled by upstream regulators that activate a module of inhibitory kinases, which in turn inhibits a transducer module composed of oncogenic co-transcription factors. Upstream regulators involve components of cell/cell junctions, polarity complexes, and extracellular matrix stiffness, all acting on the regulation of the inhibitory kinases, including two serine/threonine kinases: Mammalian sterile 20-like kinase-1/2 (MST1/2) and its target the large tumor suppressor kinase 1/2 (LATS1/2). When the Hippo pathway is activated, LATS1/2 is phosphorylated, which in turn phosphorylates its downstream targets yes-associated protein (YAP) and transcriptional co-activator with PDZ binding motif (TAZ) on serine residues, resulting in their sequestration in the cytoplasm and subsequent degradation by the proteasome [25–28]. When the Hippo pathway is inactivated, YAP and TAZ are not phosphorylated by LATS1/2 and can therefore accumulate in the nucleus and bind to transcription factors such as the TEA domain (TEAD) transcription factor family members, their main partners. The resulting complexes activate transcriptional programs inducing cellular plasticity, proliferation, or drug resistance [29].

Recent work from our laboratory showed that the Hippo kinase LATS2 controls *H. pylori*-induced EMT and intestinal metaplasia [30]. YAP1/TEAD-mediated transcription is activated first following *H. pylori* infection and then repressed later while LATS2 accumulates. LATS2 appears to be a protective factor, limiting the loss of gastric epithelial cell identity that normally precedes neoplastic transformation and GC development. The role of YAP has been widely demonstrated in cancer initiation and progression [25–27], including GC [31–33]. Its paralogue TAZ has also been implicated in

aggressiveness and metastasis in different cancers [34–39] and recent literature shows its involvement in GC aggressiveness, metastasis, and CSC properties [40–42]. In GC xenograft models, inhibition of YAP/TAZ interaction with TEADs by the pharmacological inhibitor verteporfin inhibits the tumorigenic properties of CSCs in GC [43]. TAZ is overexpressed in 66.4% GC [40], in which its overexpression is correlated with lymphatic metastasis and tumor stage [44]. In GC cell lines, studies have shown that TAZ controls cell migration, and its overexpression is associated with EMT [40,42]. Until now, the role of TAZ has never been investigated in response to *H. pylori* infection in the context of EMT and early steps of gastric carcinogenesis.

This study aimed to highlight TAZ implication in *H. pylori*-induced EMT and the gastric carcinogenesis process, both in vitro and ex vivo. For this purpose, we explored TAZ regulation in gastric epithelial cells in response to *H. pylori* infection and the consequences of its inhibition by interference RNA strategies on *H. pylori*-induced EMT and CSC-like invasive and tumorigenic properties. Furthermore, the expression of both TAZ and the major EMT marker ZEB1 were evaluated in GC patient-derived tissues and mouse models.

2. Materials and Methods

2.1. Cell and Bacterial Culture and Co-Culture

MKN45 (RIKEN, BRC Cell Engineering Division, Japan) and MKN74 (HSRR Bank JCRB0255) were cultivated in Roswell park memorial institute (RPMI) 1640 Glutamax medium (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France), and NCI-N87 (ATCC CRL-5822), Kato-III (ATCC HTB-103), and GC07 were cultivated in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM-F12) medium (Thermo Fisher Scientific), as previously described [12,15,45]. GC07 was derived from a patient-derived GC xenograft (PDX), which was successfully established by serial transplantation in non-obese diabetous severe combined immunodeficiency Interleukin 2 gamma null (NSG) mice, as previously described [15]. All cells were grown in medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Eurobio, Les Ulis, France) and 50 µg/mL vancomycin (Sandoz, Holzkirchen, Germany) at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. The experiments were performed with cells seeded at low density (3×10^4 cells per well in 24 well plates). Phase contrast microscopy images of cell cultures were taken using the ZOE fluorescent Cell Imager (BioRad, Marnes-la-Coquette, France).

The *cagA*-positive 7.13 wild type (WT) *H. pylori* strain was used for most of co-culture experiments. Several *H. pylori* strains were used: 7.13 WT strain and its isogenic mutant deleted for *cagA* ($\Delta cagA$) or *cagE* ($\Delta cagE$) (from Richard Peek, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, USA) and the P12 WT strain and its isogenic mutant deleted for *cagA* ($\Delta cagA$) or the *cagPAI* ($\Delta cagPAI$) (from Rainer Haas, Ludwig Maximilian University of Munich, Munich, Germany). *H. pylori* were cultivated on Columbia agar plates supplemented with 10% human blood under microaerophilic (5% O₂) conditions at 37 °C in humidified atmosphere, as previously described [8,13]. Co-culture experiments were performed at a multiplicity of infection of 1:25. The evaluation of bacterial number was estimated by spectrophotometry with OD_{600nm} = 1 corresponding to 2×10^8 bacteria/mL. DNA was extracted for gastric tissues and PCR were performed for the detection of *H. pylori* and *cagA*, as previously described [46].

2.2. Transfection of siRNA

In order to downregulate TAZ expression, we transfected cells with small interfering RNA (siRNA) designed to target human TAZ. The siRNA suspension was composed of Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific), OptiMEM medium (Thermo Fisher Scientific), and 20 nM of siRNA. Experiments were performed with three different siRNA that target TAZ: siTAZ1 (5'-ACGUUGACUUAGGAACUUU-3', Eurofins, Dortmund, Germany) [47], siTAZ2 (5'-AGGUACCUUCUCAAUACA-3', Eurofins) [47], and siTAZ3 (5'-UGUGGAUGAGAUGGAUACA-3', Eurofins). siTAZ1 and siTAZ2 are specific of TAZ sequences. siTAZ3 recognizes a common sequence of both TAZ

and YAP mRNA. A negative control siCtrl (siCtrl 5'-GGGCAAGACGAGCGGGAAG-3', Eurofins) with no known homology to mammalian genes was used. Two rounds of siRNA transfection were performed (separated by 24 h) in medium without antibiotics. Co-culture experiments were performed 6 h after the last transfection. Analyses were performed 30 h after the last transfection and 24 h after infection [13,30]. TAZ inhibition efficiency was evaluated by Western blot experiments.

2.3. TEAD-Luciferase Reporter Assay

TEAD reporter assay was performed by co-transfecting the *Renilla* luciferase reporter (pRL-SV40, Promega) and either the TEAD reporter (8xGTIIC-Luciferase reporter, gift from Stefano Piccolo [25]) or TATA box control (TAL, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) firefly luciferase reporters to evaluate the relative TEAD activity. The transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) and 12.5 ng of *Renilla* vector, 125 ng of pTA-Luciferase vector, or 125 ng of pTEAD-Luciferase vector. After 24 h, cells were lysed and the luminescence quantification was measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay system according to the manufacturer's recommendations (Promega, Charbonnières-les-bains, France). Firefly luciferase activities were normalized for transfection efficiency by *Renilla* luciferase for each sample, and TEAD-specific luciferase activity was then normalized to TAL activity.

$$\left(\frac{\text{Luciferase}}{\text{Renilla}}\right) \text{ pcDNA TEAD 8xGTIIC-Luciferase} / \left(\frac{\text{Luciferase}}{\text{Renilla}}\right) \text{ pcDNA pTA-Luciferase}.$$

2.4. RNA Extraction and RTqPCR

Total RNA was extracted using TRIZOL reagent (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's recommendations and quantified by their absorbance at 260 nm. Reverse transcription was performed using the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) containing a DNA digestion step. Quantitative PCR was performed using specific primers at 0.3 μ M and the SYBR-PCR-Premix Ex-Taq reagent (Thermo Fisher Scientific) (Table 1). The amplification steps contain 15 s at 94 $^{\circ}$ C, 30 s at 60 $^{\circ}$ C, and 30 s at 72 $^{\circ}$ C for 45 cycles. Relative expressions were calculated using the comparative cycle threshold (Ct) method with hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*) and TATA-Box binding protein (*TBP*) as normalizers. Primers used were: Cysteine-rich angiogenic inducer 61 (*CYR61*), Matrix metalloproteinase 9 (*MMP9*), Snail family transcriptional repressor 1 (*SNAI1*), Vimentin (*VIM*), and *ZEB1*.

Table 1. RT-qPCR primers sequences used in this study.

Genes	Sequence Forward (5'-3')	Sequence Reverse (5'-3')
<i>CYR61</i>	ATGAATGATTGCAGTTGGAAA	TAAAGGGTTGTATAGGATGCCGA
<i>HPRT1</i>	TGGTCAGGCAGTATAATCCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
<i>MMP9</i>	Quantitect primer assay, cat. QT00040040	
<i>SNAI1</i>	ACAATGTCTGAAAAGGGACTGTGA	CAGACCAGAGCACCCCAT
<i>TBP</i>	GGGCATTATTGTGCACTGAGA	GCCCAGATAGCAGCACGGT
<i>VIM</i>	GGATGCCCTTAAAGGAACCAA	CAACGGCAAAGTTCTCTCCAT
<i>ZEB1</i>	TCCCAACTTATGCCAGGCAC	CAGGAACACATTGTTCATAGTCAC

2.5. Western Blot

After having been washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), cells were lysed on ice in ProteoJET reagent (Thermo Fisher Scientific) supplemented with protease/phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). The extracted proteins were submitted to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) and Western blotting on nitrocellulose membranes (BioRad) for immuno-labelling. After 1 h in bovine serum albumin (BSA)-blocking solution (5%), immuno-labelling was performed using mouse anti-TAZ (1:2000, cat. 560235, BD Pharmingen, Thermo Fisher Scientific), rabbit anti-YAP1 (1:2000; cat. 4912 Santa

Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), mouse anti-Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) (1:2000; sc-47724 Santa Cruz Biotechnology), and mouse anti- α -tubulin (1:8000; cat. T-6074, Sigma-Aldrich) for 1–2 h at room temperature. Fluorescent-labelled secondary antibodies (1:2000; StarBright 700 goat anti-mouse cat. 12004158 or StarBright 700 goat anti-rabbit 12004161, BioRad) were used to detect the primary antibodies and were detected by fluorescence imaging with the BioRad Chemidoc imager. Band intensities were normalized to GAPDH or α -tubulin, and were quantified using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [48].

2.6. Immunofluorescence and Quantification of the Stainings

Experiments were performed as previously described [13,30] on glass coverslips at a density of 2.5×10^4 cells per well. Cells were fixed in a 4% paraformaldehyde solution in PBS supplemented with 1 mM CaCl_2 and 1 mM MgCl_2 for 10 min, and permeabilized in 0.1% Triton in Tris-buffered saline (TBS) supplemented with 1 mM CaCl_2 and 1 mM MgCl_2 for 1 min. After blocking with 1% bovine serum albumin and 2% fetal calf serum solution in TBS, cells were incubated with the primary antibodies mouse anti-TAZ (1:100, cat 560235, BD Pharmingen) and rabbit anti-ZEB1 (1:100, cat. A301-922, Bethyl, Souffelweyersheim, France) for 1 h at room temperature. After 3 washes in PBS solution, fluorescent-labelled secondary antibodies were incubated for 1 h at room temperature using either donkey anti-mouse Alexa-488-labelled (1:250, cat. A21202 Thermo Fisher Scientific), goat anti-rabbit Alexa-546-labelled (1:250, cat. A11010 Thermo Fisher Scientific), or goat anti-rabbit Alexa-488-labelled (1:250, cat. A32731, Thermo Fisher Scientific) secondary antibodies mixed with either Alexa-546-labelled phalloidin (1:250, cat. A22283, Thermo Fisher Scientific) or Alexa-647-labelled phalloidin (1:200, cat. A222287, Thermo Fisher Scientific) and 4'-6-diamidino-phenyl-indol (DAPI) (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cat. D9542, Sigma-Aldrich). After being washed 3 times in PBS and having 1 last wash in distilled water, the coverslips were mounted on glass slides using Slowfade reagent (cat. S36936, Thermo Fisher Scientific). Images were taken using a $\times 40$ (numerical aperture, 1.3) oil immersion objective on an Eclipse 50i epi-fluorescence microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France) with Nis Element acquisition software. Fiji software was used for the relative quantification of the signal intensity on digital images [48]. The relative amount of TAZ and ZEB1 nuclear accumulation was quantified in the nucleus of each cells by delimiting nuclei using DAPI staining and quantifying the mean fluorescence intensity (pixels shade of grey) of TAZ and ZEB1 labelling with Fiji software [48]. In some experiments, the number of positive- vs. negative-labelled nuclei for MKN45 cells was determined. Nuclei were considered positive when the mean fluorescence intensity was higher than the mean fluorescence intensity of the uninfected cells plus two standard deviations.

2.7. Tumorsphere Assay

After 24 h of *H. pylori* infection and 30 h after the last siRNA transfection, we seeded 100 cells (MKN45 and NCI-N87) or 1000 cells (GC07) in non-adherent 96-well culture plates that were previously coated with a 10% poly-2 hydroxyethyl methacrylate (Sigma-Aldrich) solution in 95% (*v/v*) ethanol and dried overnight at 56°C. The medium composition is serum-free GlutaMAX-DMEM/F12 medium supplemented with 20 ng/mL of epidermal growth factor, 20 ng/mL of basic-fibroblast growth factor, 0.3% glucose, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of insulin, and 1:100 N_2 supplement (all from Thermo Fisher Scientific and Sigma Aldrich), and cultured at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere [13,43]. Tumorspheres were counted 7 days after seeding under non-adherent conditions.

2.8. Invasion Assay System

After 24 h *H. pylori* infection and 30 h siRNA-transfection, we recovered cells by trypsinization, and 3×10^4 cells per condition were seeded in the upper side of 8 μm pored Transwells (Sigma-Aldrich) previously coated with rat-tail type 1 collagen (Becton Dickinson) [13]. After they were incubated for 18 h at 37°C, inserts were fixed in 4% paraformaldehyde-PBS solution and labelled with DAPI.

Cells from the upper part of the Transwell inserts were removed by swabbing. Cells that had invaded through the lower side of the inserts were counted using the ZOE fluorescent Cell Imager (BioRad).

2.9. Immunohistochemistry

Tissue sections that were 3 μm thick were prepared from formalin-fixed, paraffin-embedded human and mice tissues and were processed for immunohistochemistry procedures as previously described [12,30]. Primary antibodies rabbit anti-TAZ (1:80 for 1 h incubation, Sigma-Aldrich; HPA007415), rabbit anti-ZEB1 (1:800 during 2 h incubation for mice tissues and 1:100 during 2 h incubation for human tissues, Bethyl; A301-922A), mouse anti-Ki67 (1:150 during 30 min incubation for mice tissues, 652,401 clone 16A8, BioLegend, San Diego, CA, USA), or mouse anti-Ki67 (1:75 during 30 min incubation for human tissues, M7240 clone mib-1, Dako, Les Ulis, France). Secondary horseradish peroxidase (HRP)-labelled ImmPRESS anti-rabbit or anti-mouse antibodies for TAZ and ZEB1, ImmPRESS anti-rat for Ki67 from BioLegend, and VECTASTAIN Elite avidin-biotin complex (ABC) HRP kit (Peroxidase, Universal) for human Ki67 from Dako were incubated for 30 min. Immunolabeling was revealed after a 1–10 min incubation in liquid diaminobenzidine-chromogen substrate. Slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted with Eukitt-mounting medium (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Quantification scores of the relative expression of ZEB1, Ki67, and nuclear TAZ in gastric epithelial cells were determined in a blind lecture using a scale from 0 to 4 with the following criteria: 0: no staining, 1: <5% of positive epithelial cells; 2: 5 to <25% of positive cells; 3: 25 to <50% of positive cells; 4: \geq 50% of positive epithelial cells.

2.10. Ethic Statements on Human and Mouse Tissue Samples

Studies on paraffin-embedded tissue samples from gastric adenocarcinoma patients were performed in agreement with the Direction for Clinical Research and the Tumour and Cell Bank of the University Hospital Centre of Bordeaux (Haut-Leveque Hospital, Pessac, France), as previously reported [13,15]. Animal experiments were performed in level 2 animal facilities of the University of Bordeaux (France), in conformity with the French Ministry of Agriculture Guidelines on Animal Care and the French Committee of Genetic Engineering and with the approval of institutional guidelines determined by the local Ethical Committee of the University of Bordeaux (approval number 4608), as described previously [30].

2.11. Statistical Analysis

Quantification values represent the mean of three or more independent experiments, each performed in duplicate or more \pm standard error of the mean (SEM). Kruskal–Wallis test with Dunn’s post-test or ANOVA with Dunnett’s post-test were used to compare multiple groups. Statistics were performed using GraphPad Prism 8 software (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. *H. pylori* Induced TAZ Overexpression and TAZ/TEAD-Dependent Transcriptional Activity

In order to select the most pertinent gastric epithelial cell lines to study TAZ implication in response to *H. pylori* infection, we performed a Western blot to evaluate TAZ expression compared to that of its paralogue YAP in several cell lines commonly used to study *H. pylori*-induced signal transduction in a gastric carcinogenesis context (Figure 1A). The MKN45 cell line showed the highest TAZ/YAP expression ratio among the different cell lines, because only TAZ was expressed and not YAP. The NCI-N87 cell line and the GC07 cell line established from patient-derived GC xenografts showed a high TAZ/YAP ratio and were also selected to perform the following experiments (Figure 1B) [45]. Then, kinetics of TAZ protein expression and TAZ/YAP-mediated TEAD transcriptional activity were performed in these three gastric cell lines in response to infection with the *cagA*-positive 7.13 wild type (WT) *H. pylori* strain (Figure 1C,D). The results showed that *H. pylori* stimulated both TAZ protein

expression and TEAD transcriptional activity at 1–2 h post-infection in MKN45 and GC07, and at 2 h post-infection in NCI-N87. This activation was transient and was followed by a return to basal TEAD transcriptional activity at 5 h in all cell lines. After 24 h of infection, TEAD transcriptional activity remained upregulated in MKN45 but repressed in GC07 cells and to a lesser extent in NCI-N87.

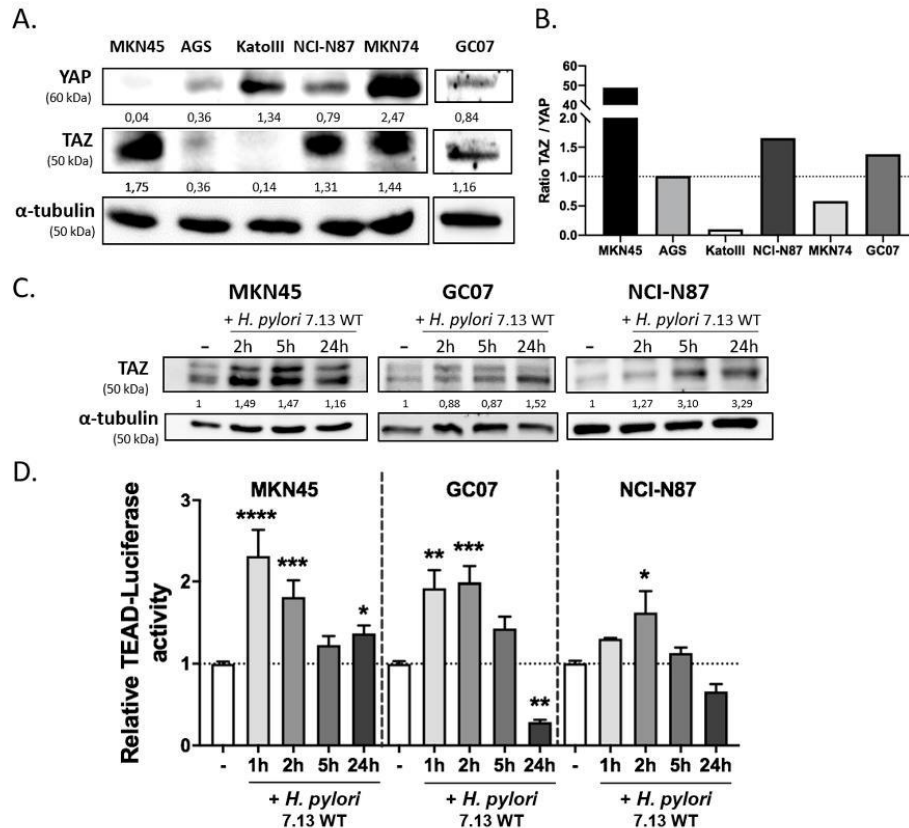


Figure 1. *Helicobacter pylori* increased transcriptional co-activator with PDZ binding motif (TAZ) protein expression and activated TEA domain (TEAD) transcriptional activity. (A,B) Basal expression of TAZ and yes-associated protein (YAP) evaluated in five different gastric epithelial cell lines and one patient-derived xenograft cell GC07 by Western blot. Numbers under each band correspond to the relative protein expression quantification normalized to the expression of α -tubulin housekeeping protein. (B) Representation of the relative expression of TAZ compared to that of YAP in the different gastric epithelial cells. (C,D) Time-course analyses of co-cultures performed with the 7.13 wild type (WT) *H. pylori* strain and gastric epithelial cell lines MKN45, GC07, and NCI-N87 expressing the most important TAZ/YAP ratio. Uninfected condition corresponds to “-”. (C) TAZ protein expression determined during the time-course of 7.13 WT *H. pylori* strain infection by Western blot. Normalization of the quantification was done in comparison to the uninfected condition and α -tubulin housekeeping protein expression. (D) Relative TEAD-luciferase activity determined following 7.13 WT *H. pylori* infection. Bars represent means \pm standard error of the mean (SEM) of fold changes relative to uninfected cells; $n = 5$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. uninfected control, Kruskal–Wallis test with Dunn’s post-test.

A relevant indicator of YAP/TAZ activation is their subcellular localization. Their nuclear localization is associated with their ability to bind nuclear transcription factors such as TEADs to stimulate transcription of target genes. Immunofluorescence staining showed that the basal level of TAZ in cells is weak and localized mostly in the cytoplasm but also in the nucleus of some cells, especially in MKN45 cells (Figure 2A, **arrows**). Upon *H. pylori* infection, we clearly observed a nuclear accumulation of TAZ at 24 h post-infection in the three cell lines, which tended to start as from 2–5 h post-infection in GC07 and NCI-N87 cells (Figure 2A,B). All together, these results show that infection with the 7.13 WT *H. pylori* strain increased TAZ protein expression, nuclear accumulation, and activation of the TAZ–TEAD transcriptional complex activity.

3.2. TAZ and ZEB1 Nuclear Co-Overexpression in *H. pylori*-Infected Gastric Epithelial Cells Was Associated with EMT and Was CagA-Dependent

Kinetic co-culture experiments with *H. pylori* also showed the progressive acquisition of the mesenchymal “hummingbird” phenotype at 5 h and 24 h post-WT *H. pylori* infection in MKN45 and to a lesser extent in NCI-N87 cells, as previously reported [8,13,30] (Figure 2A,C and Figure S1A). This mesenchymal phenotype was also observed for the first time in our in-house patient-derived GC07 cell line, in which it was induced as early as 2 h and continued until 24 h post-infection (Figure 2A,C).

To confirm this EMT-like process at the molecular level, we studied the expression and subcellular localization of the EMT marker ZEB1 in parallel to that of TAZ by co-immunofluorescence microscopy over time following 7.13 WT *H. pylori* infection (Figure 2A). A diffuse labelling of ZEB1, mainly in the cytoplasm, was observed in the uninfected basal condition. After 24 h infection, ZEB1 expression was increased and accumulated in the nuclei of the three cell lines, with a concomitant nuclear localization of TAZ, particularly visible in GC07 and MKN45 cells harboring the mesenchymal “hummingbird” phenotype at 5 h and 24 h post-infection (Figure 2A,B). These results show the concomitant TAZ and ZEB1 expression and nuclear localization in cells having undergone EMT upon *H. pylori* infection (Figure 2B).

In order to determine which *H. pylori*-virulence factor was involved in this phenomenon, we performed co-culture experiments of MKN45 cells with the WT or the isogenic mutant of *H. pylori* 7.13 and P12 strains deleted for either *cagA* ($\Delta cagA$), or a part of the *cagPAI* ($\Delta cagPAI$), or *cagE* gene, encoding for a scaffolding protein necessary for the T4SS assembly ($\Delta cagE$) [49] (Figure S1B–D). Both $\Delta cagPAI$ and $\Delta cagE$ strains failed to assemble a functional T4SS. The $\Delta cagA$ strains have a functional T4SS but cannot express the CagA oncoprotein. Western blot analysis of coculture experiments showed that only the WT strains of *H. pylori* were able to increase TAZ protein expression (Figure S1B). These results were confirmed by RTqPCR assays showing that only the WT strains were able to increase the expression of CYR61, one of the main TAZ–TEAD target genes, suggesting that this effect could be CagA-dependent. The expression of the EMT markers Vimentin, ZEB1, and Snail, as well as the induction of the “hummingbird” phenotype after 24 h of infection, were also CagA-dependent, as previously reported [8,13] (Figure S1D,E). Altogether, these results show that the *H. pylori*-induced increase in TAZ expression and activity occurred concomitantly to EMT and could be CagA-dependent.

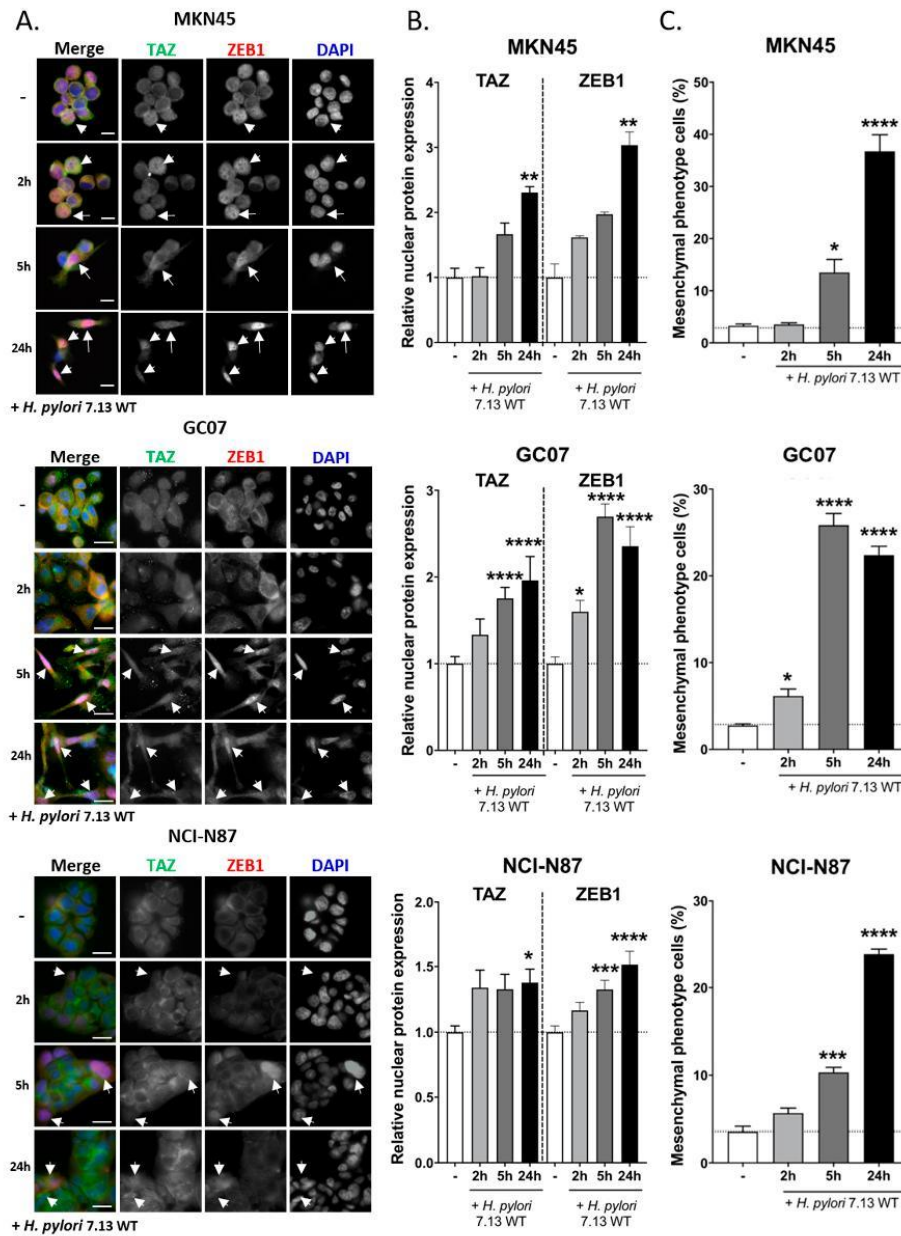


Figure 2. *H. pylori* induced TAZ and ZEB1 co-upregulation associated with their nuclear translocation. (A) Expression and subcellular localization of TAZ and ZEB1 assessed by immunofluorescence during the time-course of infection with 7.13 WT *H. pylori* strain. Representative immunofluorescence images of TAZ (in green), ZEB1 (in red), and nuclei stained with DAPI (in blue) in MKN45, GC07, and NCI-N87 cells. Bars scale, 10 μ m. White arrows show TAZ and ZEB1 co-accumulation in the nuclei. (B) The relative amount of TAZ and ZEB1 nuclear accumulation was quantified by the number of positive- vs.

negative-labelled nuclei for MKN45 cells (cells were considered positive when their mean fluorescence intensity was higher than that measured for the uninfected cells plus two standard deviations) and by measuring TAZ and ZEB1 nuclear intensity staining with Fiji software [48] for GC07 and NCI-N87. Bars represent means \pm SEM of fold changes relative to uninfected cells. $n = 3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. uninfected control in Kruskal–Wallis test with Dunn’s post-test. (C) Percentage of cells with mesenchymal “hummingbird” phenotype after *H. pylori* infection in MKN45, GC07, and NCI-N87 cells. Bars represent means \pm SEM; $n = 3$, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. uninfected control in ANOVA test with Dunnett’s post-test.

3.3. TAZ and ZEB1 Were Co-Upregulated in the Gastric Mucosa of *H. pylori*-Infected Patients and Mice and in Human Gastric Carcinoma Specimens

To confirm these results *in vivo*, we evaluated TAZ and ZEB1 expression and subcellular localization by immunohistochemistry on serial tissue sections of gastric mucosa from uninfected and *H. pylori*-infected mice and patients, as well as human gastric carcinoma. Gastric tissue samples from a previously described mouse model of *H. pylori*-induced gastric carcinogenesis were used, corresponding to C57BL/6 mice experimentally infected with the pro-inflammatory *H. pylori* strain HPARE that has a functional *cagPAI* and *cagA* [12,13,30,46]. In mice, as in humans, chronic *H. pylori* infection leads to a sequence of pre-neoplastic lesions of the gastric mucosa evolving with time from chronic gastritis to metaplasia, dysplasia, and gastric carcinoma (gastric intraepithelial neoplasia (GIN) in mice) [5,46]. We previously reported that ZEB1 and other EMT markers were upregulated during this sequence of pre-neoplastic lesions induced by *H. pylori* in mice and humans; they remained upregulated in human gastric carcinoma [13,30,46]. Here, we show that TAZ and ZEB1 are strongly upregulated with a nuclear localization in gastric epithelial cells of *H. pylori*-infected gastric mucosa in mice and humans, when compared to healthy uninfected mucosa (Figure 3A,B,D), thus confirming our *in vitro* results. Moreover, the nuclear overexpression of TAZ and ZEB1 was detected in poorly differentiated proliferative cells in the isthmus region of *H. pylori*-infected gastric mucosa, which is niche for regenerative epithelial progenitor cells. These stem-like cells are stimulated upon infection to allow tissue regeneration and repair of the epithelial damages induced by chronic *H. pylori* infection and inflammation [13,30,46]. This proliferative region is characterized by a marked Ki67 staining that is more abundant in *H. pylori*-infected conditions compared to uninfected controls.

In human gastric carcinoma, nuclear TAZ and ZEB1 were strongly upregulated compared to healthy gastric mucosa (Figure 3C,D). Notably, the expression and localization of TAZ and ZEB1 were heterogeneous—the center of the tumor masses was less stained than the periphery, where an overexpression of both TAZ and ZEB1 was noted (Figure 3C). An important amount of Ki67-labelled proliferating cells was observed at the tumor periphery and the invasive fronts of the tumors where TAZ and ZEB1 were overexpressed. This suggests an important role for TAZ and ZEB1 in tumor invasion capacities and progression. These *ex vivo* results confirm those observed *in vitro*, i.e., that *cagA*-positive *H. pylori* strains induce a co-overexpression of TAZ and ZEB1 in gastric epithelial cells that is associated with a dedifferentiation process; their detection within areas of proliferating cells suggest their implication in both GC initiation and progression.

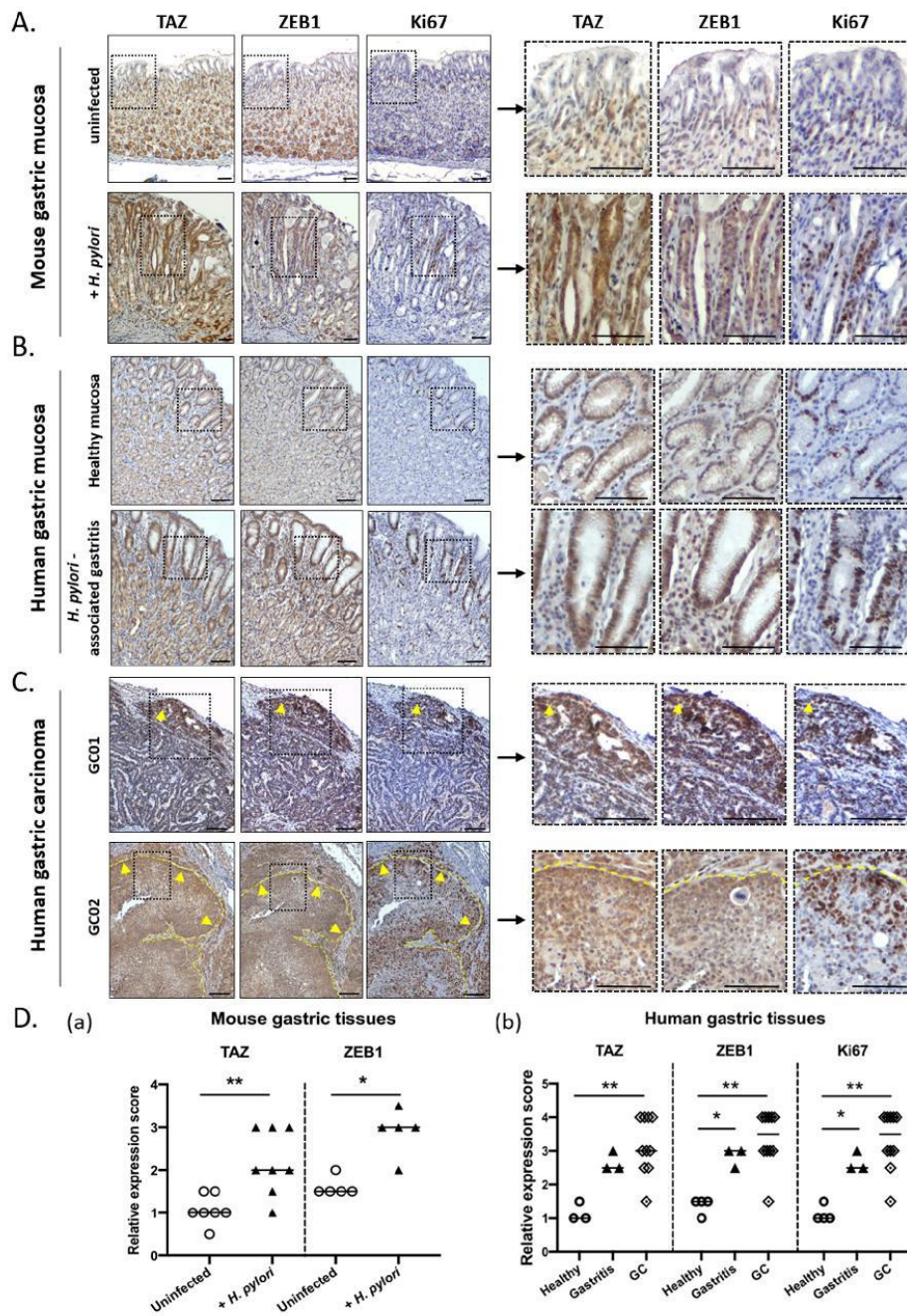


Figure 3. TAZ and ZEB1 were co-upregulated in gastric epithelial cells of *H. pylori*-infected mice and patients and in human gastric carcinoma. Representative images of the immunohistochemistry staining (dark brown) of TAZ, ZEB1, and Ki67 on serial tissue sections. (A) Representative images of the gastric

mucosa of C57BL/6 mice either uninfected or infected with the *cagA*-positive HPARE *H. pylori* strain for 12 months. (B) Representative images of the healthy gastric mucosa of uninfected patients and of patients with *H. pylori*-associated gastritis. (A,B) The nuclear co-overexpression of TAZ and ZEB1 localized in the regenerative isthmus region characterized by Ki67-positive proliferating cells. (C) Representative images of human primary gastric adenocarcinoma (case 01, GC01; case 2, GC02). The yellow dotted line demarcates the limit of the tumor from the stromal microenvironment and the yellow arrows indicate the invasive front of progression of the tumor. Scale bars, 100 μm . (D) Scores of the relative quantification of expression of ZEB1, Ki67, and nuclear TAZ (a) in gastric epithelial cells of *H. pylori* HPARE-infected mice ($n = 6$) and uninfected mice ($n = 6$), and of (b) healthy gastric mucosa ($n = 4$) and *H. pylori*-associated gastritis ($n = 4$) patients, and on gastric adenocarcinoma cases (moderately and poorly differentiated, $n = 10$).

3.4. TAZ Conferred EMT Phenotype and CSC-like Properties via ZEB1 Upregulation in Response to *H. pylori* Infection

In order to investigate the role of TAZ in *H. pylori*-induced EMT and tumor-initiating properties, we used a silencing RNA strategy (siRNA) to inhibit TAZ. The efficiency of three different siRNA used to inhibit TAZ expression under basal conditions and during *H. pylori* infection was confirmed by Western blot in the three gastric cell lines (Figure S2A). The inhibition of TAZ expression in cells transfected with siTAZ-1, siTAZ-2, and siTAZ-3 ranged from 46–73% compared to cells transfected with non-silencing negative control siRNAs (siCtrl). TEAD luciferase reporter assay confirmed these results, showing a strong reduction of TEAD transcriptional activity with the siTAZs even after *H. pylori* infection (from an 80–90% decrease in siTAZ-transfected uninfected conditions to more than 64% in siTAZ-transfected *H. pylori*-infected conditions, compared to siCtrl-transfected uninfected cells; Figure S2B). Contrary of MKN45 and GC07, NCI-N87 cells expressed E-cadherin, an essential component of adherent junctions, which acts as a gatekeeper of *H. pylori*-induced EMT to maintain epithelial polarity and integrity [8]. Furthermore, NCI-N87 cells are not invasive in vitro. The consequences of TAZ inhibition on *H. pylori*-induced EMT were therefore evaluated on MKN45 and GC07 cells that are more prone to EMT than NCI-N87 (Figure 4). *H. pylori* induced a significant increase in the expression of several EMT markers such as Vimentin, ZEB1, SNAI1 (except in GC07), and MMP9 in siCtrl-transfected cells, which was abolished or strongly reduced by TAZ silencing in siTAZ-transfected MKN45 and GC07 cells (Figure 4A). To confirm these results, ZEB1 protein expression and subcellular localization was analyzed by immunofluorescence in siRNA-transfected cells upon *H. pylori* infection. Results showed that *H. pylori*-induced ZEB1 overexpression and nuclear accumulation in siCtrl-transfected MKN45 and GC07 cells was no longer observed after TAZ silencing by siTAZ in MKN45 and strongly reduced in GC07 (Figure 4B,C and Figure S2C). These results show that TAZ activation controls ZEB1 overexpression and nuclear accumulation in response to *H. pylori* infection.

The invasive properties of cells were then evaluated with invasion assays using type I collagen-coated microporous Transwell inserts (Figure 4D and Figure S2D). *H. pylori* infection stimulated invasion in MKN45 cells as previously reported [13], as well as in the GC07 cell line. The silencing of TAZ by the three different siTAZ drastically inhibited *H. pylori*-induced invasive properties in both MKN45 and GC07. Apart from siTAZ1 in MKN45 cells, we observed no effect for the different siTAZ used on basal invasion properties of MKN45 and GC07 cells without *H. pylori* stimulation.

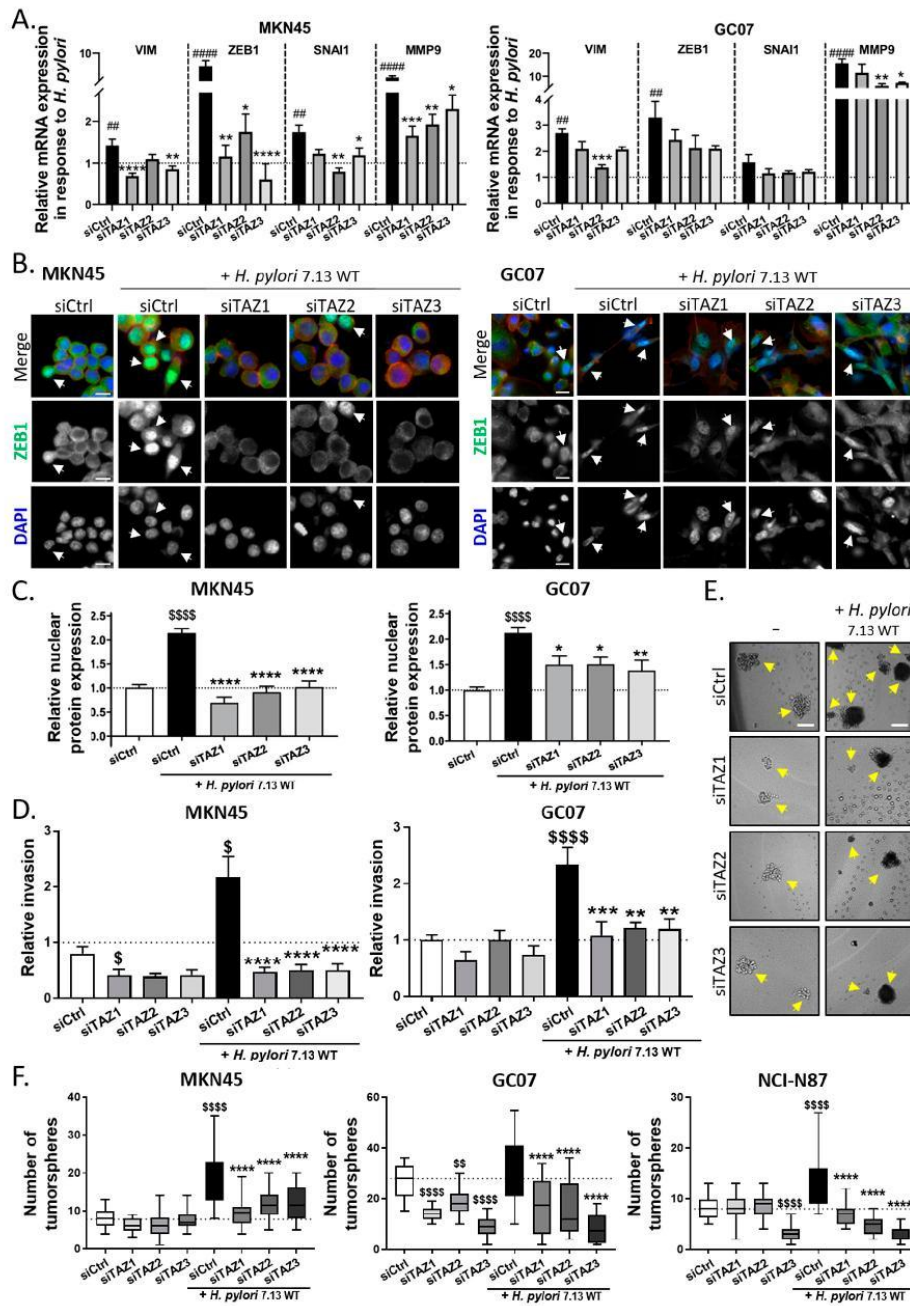


Figure 4. TAZ conferred epithelial–mesenchymal transition (EMT) phenotype and cancer stem cell (CSC)-like properties in response to *H. pylori*. (A) Relative mRNA expression of EMT markers Vimentin (VIM), ZEB1, Snail family transcriptional repressor 1 (SNAI1), and Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) measured by RT-qPCR in MKN45 and GC07 cells, presented as the ratio of mRNA expression in *H. pylori*

-infected vs. uninfected cells for each condition of silencing RNA (siRNA) transfection. Bars represent mean fold changes \pm SEM of 4–6 independent experiments relative to uninfected siCtrl. $4 < n < 6$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. infected/uninfected siCtrl and # vs. uninfected siCtrl. Kruskal–Wallis test with Dunn’s post-test was used. (B) Representative immunofluorescence images of ZEB1 (in green), actin stained with phalloidin (in red), and nuclei stained with DAPI (in blue) in MKN45 and GC07 cells transfected with siCtrl or three different siTAZ and infected with *H. pylori* for 24 h. Scale bars, 10 μ m. White arrows show ZEB1 nuclear localization. (C) Relative nuclear ZEB1 quantification measured by the nuclear ZEB1 intensity staining. Kruskal–Wallis test with Dunn’s post-test was used. (D) After 24 h post *H. pylori* infection and 30 h post siRNA transfection, we seeded 30,000 cells on type I-collagen-coated Transwell inserts; invasive cells were counted 18 h after seeding. Kruskal–Wallis test with Duns post-test was used for MKN45 and ANOVA test with Sidak post-test for GC07. (E) Representative images of MKN45 tumorspheres in non-adherent culture conditions. Yellow arrows show tumorsphere formation. Scale bars, 100 μ m. (F) 30 h post-siTAZ transfection and 24 h post *H. pylori*-infection, we seeded MKN45, GC07, and NCI-N87 cells under non-adherent conditions to investigate their ability to form tumorspheres. Tumorspheres were counted 7 days after cell seeding. ANOVA test with Sidak post-test was used. (C,D) Bars represent means \pm SEM; $3 < n < 4$, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. *H. pylori*-infected siCtrl and \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.0001$ vs. uninfected siCtrl.

In the context of *H. pylori*-induced gastric carcinogenesis, EMT has been associated with the acquisition of CSC-related properties by gastric cell lines, such as the capacity to form tumorspheres in vitro [12,13]. To address the role of TAZ in *H. pylori*-induced CSC-like functional properties, we performed a tumorsphere formation assay (Figure 4E,F and Figure S2E). The drastic culture conditions of this assay (non-adherent, defined culture media without fetal bovine serum) allows determination of the activity of stem cells, which represent a small subpopulation of cells within the cell lines, which will be the only ones able to survive and self-renew under these conditions. In MKN45, *H. pylori* infection increased the number of tumorspheres as previously reported (Figure 4E,F) [13]. This result was confirmed in NCI-N87 cells and to a lesser extent in GC07 cells (Figure 4F and Figure S2D). Remarkably, TAZ inhibition by the three siTAZ showed a full inhibition of the *H. pylori*-induced increase in tumorsphere number in the three cell lines (Figure 4F). There was no effect of siTAZ on the tumorsphere number under basal conditions in MKN45 and NCI-N87 cells, except for siTAZ-3 in NCI-N87. This result indicates that TAZ is not required for self-renewal capacity under basal conditions, but is mandatory in response to *H. pylori* stimulation in order to increase CSC-like tumorigenic properties.

Altogether, these results highlight the role of TAZ in promoting EMT and the acquisition of invasive and tumorigenic properties related to CSCs in the context of gastric carcinogenesis induced by *H. pylori* infection.

4. Discussion

H. pylori infection leads to dysregulation of gastric epithelial cell homeostasis by modulating or hijacking several cellular signaling pathways. All these modifications associated with those induced by chronic inflammation and remodeling of the gastric mucosa microenvironment contribute to the initiation and development of gastric carcinogenesis. We previously reported that *cagA*-positive carcinogenic strains of *H. pylori* upregulate the expression of the Hippo tumor suppressor LATS2 and its oncogenic target YAP in a biphasic kinetic manner [30]. Other studies have also reported an upregulation of YAP in response to *H. pylori* [50,51]. Although YAP and TAZ are paralogues, most studies in the field of *H. pylori* and GC have focused on YAP in such a way that the direct implication of TAZ remained unexplored in the context of *H. pylori*-induced gastric carcinogenesis. Results of this study show for the first time that TAZ is upregulated and accumulates in the nuclei of gastric epithelial cells in response to *H. pylori* infection where it binds to its main partners, the TEAD transcription factors. This TAZ nuclear overexpression is associated with the TAZ/TEAD oncogenic

transcriptional program illustrated by the increase in *CYR61* expression (Figure S1C). *CYR61* is an extracellular matrix protein involved in cell adhesion, proliferation, and migration, whose expression has been correlated with poor survival of cardia gastric adenocarcinoma patients; it can be considered a metastatic biomarker for this cancer [52]. This TAZ overexpression and TAZ/TEAD activity seems to occur in a *CagA*-dependent manner, concomitantly with the ZEB1 overexpression and EMT program. TAZ silencing experiments have shown that TAZ is a major regulator of ZEB1 expression and of the EMT program induced by *CagA*-positive *H. pylori* strains, and that it controls the induction of invasive and tumorigenic properties.

We also showed that TAZ is over-expressed in the gastric mucosa of human and mice infected with *H. pylori*. In both cases, TAZ nuclear overexpression was detected in regenerative areas with Ki67-positive epithelial cells. These areas, in the isthmus region of the gastric glands, correspond to an expansion of stem and progenitor cells that are mobilized to ensure epithelium regeneration in response to chronic injury caused by *H. pylori* infection [7,53,54]. Indeed, we previously showed that LATS2 is also overexpressed and nuclear in the same regenerative areas induced by chronic *H. pylori* infection in vivo [30,55].

According to previous study results from our laboratory and others [8,30,53], *H. pylori* induces an increase in EMT markers (ZEB1, Vimentin, Snail, MMP9) and leads to a progressive nuclear translocation and accumulation of ZEB1 protein in the nucleus 5–24 h post *H. pylori* infection in vitro. In vivo, ZEB1 is also overexpressed and nuclear in the stem/progenitor cell regenerative zone of the gastric mucosa in *H. pylori*-infected mice and humans [8,13].

Recent studies concerning EMT state of epithelial cells and their plasticity suggest not only an ON/OFF EMT model, but also a multilayer of EMT features induced by epigenetic events and dysregulation of signaling pathways, called the EMT hybrid state [56,57]. This body of growing evidence of EMT plasticity is well-illustrated in our cellular models of gastric cell lines, with those harboring an epithelial/mesenchymal hybrid state being more prone to a *H. pylori*-induced EMT-like process and acquisition of CSC-like properties. In the context of *H. pylori* infection, E-cadherin expression is sufficient to counteract *H. pylori*-mediated mesenchymal phenotype [58], and on the contrary, downregulation of E-cadherin or other cell–cell junction proteins such as IQ-domain GTPase-activating protein 1 (IQGAP1) predispose cells to overexpress ZEB1 and undergo EMT [12,59]. MKN45 and GC07 PDX-derived cells are poorly cohesive. MKN45 cells have a mutated *cdh1* gene encoding a truncated and non-functional E-cadherin [60]. This may be the most likely cause of their hybrid epithelial/mesenchymal state, which makes them prone to undergoing an EMT-like process more easily than the E-cadherin functional polarized NCI-N87 cells that constrain the EMT-like process induced by *H. pylori*, as we previously reported [8].

Mechanistically, ZEB1 is a transcriptional repressor of epithelial differentiation genes, such as *cdh1* encoding the E-cadherin adherent junction protein and other cell polarity complex genes, promoting the trans-differentiation characterized by a more or less important loss of epithelial integrity and the acquisition of a highly motile mesenchymal phenotype and invasion properties in cancer [61]. In the gastric carcinogenesis context, experiments on ZEB1 inhibition with siRNA have shown that ZEB1 is essential to the EMT induced in response to *H. pylori* and controls the basal mesenchymal phenotype of some GC cell lines [8,62]. In GC, ZEB1 overexpression is associated with mesenchymal type tumors that have a poor prognosis [62]. In addition to promoting EMT, ZEB1 can also act by repressing the expression of the stemness-inhibiting miR-200b microRNA conferring stemness properties, thereby linking motility and stemness towards a migrating CSC phenotype [8,13,61,63,64]. Its role in the emergence of CSC-like cells with invasive and tumorigenic properties has been demonstrated in several cancers including breast cancer [14] and GC [8,13,62], in which its inhibition by siRNA repressed CSC-like phenotype and properties. Consequently, ZEB1 has been considered as a major actor of cancer cell plasticity in tumor initiation, progression, and metastatic dissemination. A recent study shows that ZEB1, which is mostly known as a transcriptional repressor, could also act as a transcriptional activator by directly interacting with YAP to stimulate the expression of a common set of ZEB1/YAP

target genes, including CYR61, which is predictor of metastatic risk and poor survival in aggressive breast cancer [64]. However, Lehmann et al. reported in this study that ZEB1 could directly bind to YAP but not to its paralogue TAZ, due to structural differences between YAP and TAZ—TAZ possesses only one WW domain in the central part of the protein, contrary to YAP that has two WW domains. To our knowledge, the capability of TAZ to bind to ZEB1 has never been investigated in GC. In the study by Lehmann et al., the use of siYAP and siTAZ did not alter ZEB1 expression in aggressive breast cancer cell lines. On the contrary, TAZ inhibition using a lentiviral short hairpin RNA (shRNA) strategy reduced ZEB1 expression in the retinal pigment epithelial cell line (RPE) [65]. We previously showed that these RPE cells are sensitive to *H. pylori* infection and respond, like gastric epithelial cells, through an EMT-like transition involving YAP/TAZ/TEAD activation [30].

One of the remaining questions is how *H. pylori* can activate TAZ, leading to ZEB1 upregulation and induction of an EMT-like process. Different pathways and hypotheses could be associated with TAZ activation in this context. In breast cancer, the protein kinase C (PKC) is a major inducer of the EMT process [66]. *H. pylori*, via the T4SS, activates protein kinase C (PKC), which is responsible for c-Abl phosphorylation leading to its cytoplasmic retention via binding to 14-3-3 protein, promoting EMT-like cell elongation and migration [67]. The c-Abl kinase can phosphorylate TAZ on tyrosine residues, leading to its activation [68]. The link between PKC, c-Abl, and TAZ activation remains to be investigated in the context of *H. pylori*-mediated EMT and gastric carcinogenesis. Other studies have shown that *H. pylori*, via CagA, causes the disruption of the epithelial barrier function by altering the apical junction complex structure by recruiting the tight-junction scaffolding protein Zonula occludens-1 (ZO-1) [7]. ZO-1 and ZO-2 are negative regulators of TAZ by sequestering it at tight junctions and preventing its nuclear translocation and transcriptional activity [69]. We can hypothesize that *H. pylori*, via CagA-induced delocalization of ZO-1 from tight junctions, could release TAZ from the tight junctions and allow its activation and nuclear translocation to participate to EMT. Another pathway linking *H. pylori*-induced signaling to TAZ activation could be the Wnt/ β -catenin pathway, activated in response to CagA [59,70]. CagA signaling induces the inhibition of Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β) [71] and β -catenin destruction complex, and also the disruption of E-cadherin/ β -catenin complexes at cell junctions [72], both leading to β -catenin release and nuclear accumulation, and to a transcriptional program promoting gastric carcinogenesis [73]. Independently of the Hippo pathway, TAZ degradation also depends on phosphorylated β -catenin that bridges TAZ to its ubiquitin ligase Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase (β -TrCP). Upon Wnt signaling, activated β -catenin impairs β -TrCP mediated TAZ ubiquitination and degradation, leading to concomitant nuclear accumulation of β -catenin and TAZ [47]. This scenario could contribute to explain the nuclear accumulation of TAZ observed in response to *H. pylori* infection in this study, especially in E-cadherin-deficient gastric cell lines with an epithelial/mesenchymal hybrid state.

In vivo, the nuclear co-overexpression of TAZ and ZEB1 observed in the isthmus regenerative stem and progenitor cell area of the gastric mucosa in *H. pylori*-infected mice and humans is consistent with the TAZ-dependent ZEB1 overexpression and EMT-like process observed in vitro in response to *H. pylori* infection. In vitro, loss-of-function experiments with siTAZ not only resulted in a severe inhibition of EMT marker expression, but also strongly impaired the invasive and tumorigenic properties of gastric cell lines. The nuclear co-overexpression of TAZ and ZEB1 was also detected at the invasive front of the tumors on GC tissue sections, suggesting that TAZ could constitute a marker of invasion and aggressiveness in GC. TAZ expression is a prognostic indicator in colorectal cancer and is required for metastatic activity and chemoresistance of CSC in breast cancer [34,35,38]. In GC, TAZ was reported as a biomarker of aggressiveness as it is associated with the metastatic status of GC patients, and is highly expressed in diffuse type GC associated with a mesenchymal phenotype [40,41]. Furthermore, we recently showed that inhibition of YAP/TAZ interaction with TEADs using Verteporfin inhibits CSC tumorigenic and invasive properties in vitro, as well as tumor growth in GC xenograft models [44], confirming that TAZ, like YAP, could be an interesting biomarker and target in GC.

In conclusion, the present study demonstrated for the first time a novel mechanism by which *H. pylori* upregulates TAZ, which is responsible for the upregulation of ZEB1, one of the most important inducers of EMT and CSC properties in the context of gastric carcinogenesis. Therefore, our findings support the fact that TAZ is a crucial inducer of EMT and invasive and tumorigenic CSC-like properties in response to *H. pylori* infection. The detection of TAZ co-overexpression with ZEB1 and Ki67 in *H. pylori*-induced pre-neoplastic lesions and in invasive GC suggests that TAZ could indeed constitute a biomarker of early transformation in gastric carcinogenesis.

Supplementary Materials: The following Figures S1 and S2 and their figure legends are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/9/6/1462/s1>, Figure S1: *H. pylori*-virulence factor CagA was implicated in TAZ overexpression and EMT. Figure S2: Effect of TAZ silencing by siRNA on TAZ expression, TEAD-luciferase activity, ZEB1 expression, and invasive and tumorigenic cells properties.

Author Contributions: Conceptualization, C.T., S.E.M.-C., C.S., O.C.B.M., and C.V.; data curation, C.T.; formal analysis, C.T.; funding acquisition, C.S., P.D., F.M., P.L., and C.V.; investigation, C.T., S.P., and E.S.; methodology, C.T., J.G., S.E.M.-C., L.S., E.S., C.S., E.B., and C.V.; project administration, C.T. and C.V.; resources, J.G., L.S., P.D., F.M., P.L., and C.V.; supervision, O.C.B.M. and C.V.; validation, C.T. and C.V.; visualization, C.T., S.P., and C.V.; writing—original draft, C.T. and C.V.; writing—review and editing, C.T., J.G., S.E.M.-C., L.S., E.S., C.S., E.B., P.D., F.M., P.L., O.C.B.M., and C.V.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The PhD fellowship of Camille Tiffon was funded by the Ligue Nationale Française Contre le Cancer/French National League against Cancer. Silvia Elena Molina-Castro was a PhD fellowship recipient of the University of Costa Rica (San José, Costa Rica) and the Ministry of Sciences and Technologies (MICITT, Costa Rica). This research was funded by the Institut National du Cancer/French National Institute on Cancer INCa, grant PLBio 2014-152, and by a regional grant from La Ligue Contre le Cancer.

Acknowledgments: We thank R. Peek (Vanderbilt University, Nashville, TN, USA) and Rainer Haas (Ludwig Maximilian University of Munich, Germany) for the *H. pylori* 7.13 and P12 wild type and isogenic mutant strains, respectively, and Michel Moenner (CNRS UMR5095, University of Bordeaux, France) for providing anti-TAZ antibodies and for helpful discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Bray, F.; Jemal, A.; Grey, N.; Ferlay, J.; Forman, D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): A population-based study. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 790–801. [\[CrossRef\]](#)
2. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Mégraud, F.; Bessède, E.; Varon, C. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma. *Clin. Microbiol. Infect.* **2015**, *21*, 984–990. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. González, C.A.; Megraud, F.; Buissonniere, A.; Lujan Barroso, L.; Agudo, A.; Duell, E.J.; Boutron-Ruault, M.C.; Clavel-Chapelon, F.; Palli, D.; Krogh, V.; et al. Helicobacter pylori infection assessed by ELISA and by immunoblot and noncardiac gastric cancer risk in a prospective study: The Eurgast-EPIC project. *Ann. Oncol.* **2012**, *23*, 1320–1324. [\[CrossRef\]](#)
5. Correa, P.; Houghton, J. Carcinogenesis of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* **2007**, *133*, 659–672. [\[CrossRef\]](#)
6. Backert, S.; Selbach, M. Role of type IV secretion in Helicobacter pylori pathogenesis. *Cell. Microbiol.* **2008**, *10*, 1573–1581. [\[CrossRef\]](#)
7. Amieva, M.R.; Vogelmann, R.; Covacci, A.; Tompkins, L.S.; Nelson, W.J.; Falkow, S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA. *Science* **2003**, *300*, 1430–1434. [\[CrossRef\]](#)
8. Baud, J.; Varon, C.; Chabas, S.; Chambonnier, L.; Darfeuille, F.; Staedel, C. Helicobacter pylori initiates a mesenchymal transition through ZEB1 in gastric epithelial cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60315. [\[CrossRef\]](#)
9. Marques, M.S.; Melo, J.; Cavadas, B.; Mendes, N.; Pereira, L.; Carneiro, F.; Figueiredo, C.; Leite, M. Afadin downregulation by helicobacter pylori induces epithelial to mesenchymal transition in gastric cells. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2712. [\[CrossRef\]](#)

10. Yin, Y.; Grabowska, A.M.; Clarke, P.A.; Whelband, E.; Robinson, K.; Argent, R.H.; Tobias, A.; Kumari, R.; Atherton, J.C.; Watson, S.A. Helicobacter pylori potentiates epithelial: Mesenchymal transition in gastric cancer: Links to soluble HB-EGF, gastrin and matrix metalloproteinase-7. *Gut* **2010**, *59*, 1037–1045. [[CrossRef](#)]
11. Thiery, J.P.; Acloque, H.; Huang, R.Y.J.; Nieto, M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **2009**, *139*, 871–890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bessède, E.; Molina, S.; Acuña-Amador, L.; Dubus, P.; Staedel, C.; Chambonnier, L.; Buissonnière, A.; Sifré, E.; Giese, A.; Bénéjat, L.; et al. Deletion of IQGAP1 promotes Helicobacter pylori-induced gastric dysplasia in mice and acquisition of cancer stem cell properties in vitro. *Oncotarget* **2016**, *7*, 80688–80699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bessède, E.; Staedel, C.; Acuña Amador, L.A.; Nguyen, P.H.; Chambonnier, L.; Hatakeyama, M.; Belleannée, G.; Mégraud, F.; Varon, C. Helicobacter pylori generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Oncogene* **2014**, *33*, 4123–4131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mani, S.A.; Guo, W.; Liao, M.-J.; Eaton, E.N.; Ayyanan, A.; Zhou, A.Y.; Brooks, M.; Reinhard, F.; Zhang, C.C.; Shipitsin, M.; et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **2008**, *133*, 704–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Nguyen, P.H.; Giraud, J.; Chambonnier, L.; Dubus, P.; Wittkop, L.; Belleannée, G.; Collet, D.; Soubeyran, I.; Evrard, S.; Rousseau, B.; et al. Characterization of biomarkers of tumorigenic and chemoresistant cancer stem cells in human gastric carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 1586–1597. [[CrossRef](#)]
16. Chen, W.; Zhang, X.; Chu, C.; Cheung, W.L.; Ng, L.; Lam, S.; Chow, A.; Lau, T.; Chen, M.; Li, Y.; et al. Identification of CD44+ cancer stem cells in human gastric cancer. *Hepatogastroenterology* **2013**, *60*, 949–954. [[CrossRef](#)]
17. Takaishi, S.; Okumura, T.; Tu, S.; Wang, S.S.W.; Shibata, W.; Vigneshwaran, R.; Gordon, S.A.K.; Shimada, Y.; Wang, T.C. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* **2009**, *27*, 1006–1020. [[CrossRef](#)]
18. Fukuda, K.; Saikawa, Y.; Ohashi, M.; Kumagai, K.; Kitajima, M.; Okano, H.; Matsuzaki, Y.; Kitagawa, Y. Tumor initiating potential of side population cells in human gastric cancer. *Int. J. Oncol.* **2009**, *34*, 1201–1207.
19. Lau, W.M.; Teng, E.; Chong, H.S.; Lopez, K.A.P.; Tay, A.Y.L.; Salto-Tellez, M.; Shabbir, A.; So, J.B.Y.; Chan, S.L. CD44v8-10 is a cancer-specific marker for gastric cancer stem cells. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 2630–2641. [[CrossRef](#)]
20. Nguyen, P.H.; Giraud, J.; Staedel, C.; Chambonnier, L.; Dubus, P.; Chevret, E.; Bœuf, H.; Gauthereau, X.; Rousseau, B.; Fevre, M.; et al. All-trans retinoic acid targets gastric cancer stem cells and inhibits patient-derived gastric carcinoma tumor growth. *Oncogene* **2016**, *35*, 5619–5628. [[CrossRef](#)]
21. Courtois, S.; Durán, R.V.; Giraud, J.; Sifré, E.; Izotte, J.; Mégraud, F.; Lehours, P.; Varon, C.; Bessède, E. Metformin targets gastric cancer stem cells. *Eur. J. Cancer* **2017**, *84*, 193–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yu, F.-X.; Zhao, B.; Guan, K.-L. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* **2015**, *163*, 811–828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Huh, H.D.; Kim, D.H.; Jeong, H.-S.; Park, H.W. Regulation of TEAD Transcription Factors in Cancer Biology. *Cells* **2019**, *8*, 600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Calses, P.C.; Crawford, J.J.; Lill, J.R.; Dey, A. Hippo pathway in cancer: Aberrant regulation and therapeutic opportunities. *Trends Cancer* **2019**, *5*, 297–307. [[CrossRef](#)]
25. Piccolo, S.; Dupont, S.; Cordenonsi, M. The biology of YAP/TAZ: Hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 1287–1312. [[CrossRef](#)]
26. Zanconato, F.; Cordenonsi, M.; Piccolo, S. YAP/TAZ at the roots of cancer. *Cancer Cell* **2016**, *29*, 783–803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hansen, C.G.; Moroishi, T.; Guan, K.-L. YAP and TAZ: A nexus for hippo signaling and beyond. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 499–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Zhao, B.; Li, L.; Lei, Q.; Guan, K.-L. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: An updated version. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 862–874. [[CrossRef](#)]
29. Johnson, R.; Halder, G. The two faces of Hippo: Targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 63–79. [[CrossRef](#)]
30. Molina-Castro, S.E.; Tiffon, C.; Giraud, J.; Boeuf, H.; Sifre, E.; Giese, A.; Belleannée, G.; Lehours, P.; Bessède, E.; Mégraud, F.; et al. The hippo kinase LATS2 controls helicobacter pylori-induced epithelial-mesenchymal transition and intestinal metaplasia in gastric mucosa. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *9*, 257–276. [[CrossRef](#)]

31. Kang, W.; Tong, J.H.M.; Chan, A.W.H.; Lee, T.-L.; Lung, R.W.M.; Leung, P.P.S.; So, K.K.Y.; Wu, K.; Fan, D.; Yu, J.; et al. Yes-associated protein 1 exhibits oncogenic property in gastric cancer and its nuclear accumulation associates with poor prognosis. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 2130–2139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Song, M.; Cheong, J.-H.; Kim, H.; Noh, S.H.; Kim, H. Nuclear expression of Yes-associated protein 1 correlates with poor prognosis in intestinal type gastric cancer. *Anticancer Res.* **2012**, *32*, 3827–3834. [[PubMed](#)]
33. Yu, L.; Gao, C.; Feng, B.; Wang, L.; Tian, X.; Wang, H.; Ma, D. Distinct prognostic values of YAP1 in gastric cancer. *Tumour. Biol.* **2017**, *39*, 1010428317695926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cordenonsi, M.; Zanconato, F.; Azzolin, L.; Forcato, M.; Rosato, A.; Frasson, C.; Inui, M.; Montagner, M.; Parenti, A.R.; Poletti, A.; et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* **2011**, *147*, 759–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bartucci, M.; Dattilo, R.; Moriconi, C.; Pagliuca, A.; Mottolese, M.; Federici, G.; Benedetto, A.D.; Todaro, M.; Stassi, G.; Sperati, F.; et al. TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. *Oncogene* **2015**, *34*, 681–690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Li, Z.; Wang, Y.; Zhu, Y.; Yuan, C.; Wang, D.; Zhang, W.; Qi, B.; Qiu, J.; Song, X.; Ye, J.; et al. The Hippo transducer TAZ promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell maintenance in oral cancer. *Mol. Oncol.* **2015**, *9*, 1091–1105. [[CrossRef](#)]
37. Xie, D.; Cui, J.; Xia, T.; Jia, Z.; Wang, L.; Wei, W.; Zhu, A.; Gao, Y.; Xie, K.; Quan, M. Hippo transducer TAZ promotes epithelial mesenchymal transition and supports pancreatic cancer progression. *Oncotarget* **2015**, *6*, 35949–35963. [[CrossRef](#)]
38. Yuen, H.-F.; McCrudden, C.M.; Huang, Y.-H.; Tham, J.M.; Zhang, X.; Zeng, Q.; Zhang, S.-D.; Hong, W. TAZ expression as a prognostic indicator in colorectal cancer. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54211. [[CrossRef](#)]
39. Hong, J.-H.; Hwang, E.S.; McManus, M.T.; Amsterdam, A.; Tian, Y.; Kalmukova, R.; Mueller, E.; Benjamin, T.; Spiegelman, B.M.; Sharp, P.A.; et al. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* **2005**, *309*, 1074–1078. [[CrossRef](#)]
40. Wei, J.; Wang, L.; Zhu, J.; Sun, A.; Yu, G.; Chen, M.; Huang, P.; Liu, H.; Shao, G.; Yang, W.; et al. The Hippo signaling effector WWTR1 is a metastatic biomarker of gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Cell Int.* **2019**, *19*, 74. [[CrossRef](#)]
41. Yue, G.; Sun, X.; Gimenez-Capitan, A.; Shen, J.; Yu, L.; Teixeira, C.; Guan, W.; Rosell, R.; Liu, B.; Wei, J. TAZ is highly expressed in gastric signet ring cell carcinoma. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 393064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ge, L.; Li, D.-S.; Chen, F.; Feng, J.-D.; Li, B.; Wang, T.-J. TAZ overexpression is associated with epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-resistant gastric cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2017**, *51*, 307–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Giraud, J.; Molina-Castro, S.; Seeneevassen, L.; Sifré, E.; Izotte, J.; Tiffon, C.; Staedel, C.; Boeuf, H.; Fernandez, S.; Barthelemy, P.; et al. Verteporfin targeting YAP1/TAZ-TEAD transcriptional activity inhibits the tumorigenic properties of gastric cancer stem cells. *Int. J. Cancer* **2020**, *146*, 2255–2267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zhou, G.-X.; Li, X.-Y.; Zhang, Q.; Zhao, K.; Zhang, C.-P.; Xue, C.-H.; Yang, K.; Tian, Z.-B. Effects of the hippo signaling pathway in human gastric cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2013**, *14*, 5199–5205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Giraud, J.; Bouriez, D.; Seeneevassen, L.; Rousseau, B.; Sifré, E.; Giese, A.; Mégraud, F.; Lehours, P.; Dubus, P.; Gronnier, C.; et al. Orthotopic patient-derived xenografts of gastric cancer to decipher drugs effects on cancer stem cells and metastatic dissemination. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Varon, C.; Dubus, P.; Mazurier, F.; Asencio, C.; Chambonnier, L.; Ferrand, J.; Giese, A.; Senant-Dugot, N.; Carloti, M.; Mégraud, F. Helicobacter pylori infection recruits bone marrow-derived cells that participate in gastric preneoplasia in mice. *Gastroenterology* **2012**, *142*, 281–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Azzolin, L.; Panciera, T.; Soligo, S.; Enzo, E.; Bicciato, S.; Dupont, S.; Bresolin, S.; Frasson, C.; Basso, G.; Guzzardo, V.; et al. YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* **2014**, *158*, 157–170. [[CrossRef](#)]
48. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)]

49. Odenbreit, S.; Püls, J.; Sedlmaier, B.; Gerland, E.; Fischer, W.; Haas, R. Translocation of helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* **2000**, *287*, 1497–1500. [[CrossRef](#)]
50. Wu, Y.; Shen, L.; Liang, X.; Li, S.; Ma, L.; Zheng, L.; Li, T.; Yu, H.; Chan, H.; Chen, C.; et al. Helicobacter pylori-induced YAP1 nuclear translocation promotes gastric carcinogenesis by enhancing IL-1 β expression. *Cancer Med.* **2019**, *8*, 3965–3980. [[CrossRef](#)]
51. Li, N.; Feng, Y.; Hu, Y.; He, C.; Xie, C.; Ouyang, Y.; Artim, S.C.; Huang, D.; Zhu, Y.; Luo, Z.; et al. Helicobacter pylori CagA promotes epithelial mesenchymal transition in gastric carcinogenesis via triggering oncogenic YAP pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Wei, J.; Yu, G.; Shao, G.; Sun, A.; Chen, M.; Yang, W.; Lin, Q. CYR61 (CCN1) is a metastatic biomarker of gastric cardia adenocarcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 31067–31078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Bessède, E.; Dubus, P.; Mégraud, F.; Varon, C. Helicobacter pylori infection and stem cells at the origin of gastric cancer. *Oncogene* **2015**, *34*, 2547–2555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Weis, V.G.; Goldenring, J.R. Current understanding of SPEM and its standing in the preneoplastic process. *Gastric Cancer* **2009**, *12*, 189–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Belair, C.; Baud, J.; Chabas, S.; Sharma, C.M.; Vogel, J.; Staedel, C.; Darfeuille, F. Helicobacter pylori interferes with an embryonic stem cell micro RNA cluster to block cell cycle progression. *Silence* **2011**, *2*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Simeone, P.; Trerotola, M.; Franck, J.; Cardon, T.; Marchisio, M.; Fournier, I.; Salzet, M.; Maffia, M.; Vergara, D. The multiverse nature of epithelial to mesenchymal transition. *Semin. Cancer Biol.* **2019**, *58*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Vergara, D.; Simeone, P.; Damato, M.; Maffia, M.; Lanuti, P.; Trerotola, M. The Cancer Microbiota: EMT and Inflammation as Shared Molecular Mechanisms Associated with Plasticity and Progression. *J. Oncol.* **2019**, *2019*, 1253727. [[CrossRef](#)]
58. Oliveira, M.J.; Costa, A.M.; Costa, A.C.; Ferreira, R.M.; Sampaio, P.; Machado, J.C.; Seruca, R.; Mareel, M.; Figueiredo, C. CagA associates with c-Met, E-cadherin, and p120-catenin in a multiprotein complex that suppresses Helicobacter pylori-induced cell-invasive phenotype. *J. Infect. Dis.* **2009**, *200*, 745–755. [[CrossRef](#)]
59. Wroblewski, L.E.; Piazzuelo, M.B.; Chaturvedi, R.; Schumacher, M.; Aihara, E.; Feng, R.; Noto, J.M.; Delgado, A.; Israel, D.A.; Zavros, Y.; et al. Helicobacter pylori targets cancer-associated apical-junctional constituents in gastroids and gastric epithelial cells. *Gut* **2015**, *64*, 720–730. [[CrossRef](#)]
60. Oda, T.; Kanai, Y.; Oyama, T.; Yoshiura, K.; Shimoyama, Y.; Birchmeier, W.; Sugimura, T.; Hirohashi, S. E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 1858–1862. [[CrossRef](#)]
61. Vandewalle, C.; Van Roy, F.; Berx, G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 773–787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Murai, T.; Yamada, S.; Fuchs, B.C.; Fujii, T.; Nakayama, G.; Sugimoto, H.; Koike, M.; Fujiwara, M.; Tanabe, K.K.; Kodera, Y. Epithelial-to-mesenchymal transition predicts prognosis in clinical gastric cancer. *J. Surg. Oncol.* **2014**, *109*, 684–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Brabletz, S.; Brabletz, T. The ZEB/miR-200 feedback loop—A motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* **2010**, *11*, 670–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Lehmann, W.; Mossmann, D.; Kleemann, J.; Mock, K.; Meisinger, C.; Brummer, T.; Herr, R.; Brabletz, S.; Stemmler, M.P.; Brabletz, T. ZEB1 turns into a transcriptional activator by interacting with YAP1 in aggressive cancer types. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Liu, Y.; Xin, Y.; Ye, F.; Wang, W.; Lu, Q.; Kaplan, H.J.; Dean, D.C. Taz-tead1 links cell-cell contact to zeb1 expression, proliferation, and dedifferentiation in retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2010**, *51*, 3372–3378. [[CrossRef](#)]
66. Vergara, D.; Ravaioli, S.; Fonzi, E.; Adamo, L.; Damato, M.; Bravaccini, S.; Pirini, F.; Gaballo, A.; Barbano, R.; Pasculli, B.; et al. Carbonic Anhydrase XII expression is modulated during epithelial mesenchymal transition and regulated through protein kinase C signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 715. [[CrossRef](#)]
67. Posselt, G.; Wiesauer, M.; Chichirau, B.E.; Engler, D.; Krisch, L.M.; Gadermaier, G.; Briza, P.; Schneider, S.; Boccellato, F.; Meyer, T.F.; et al. Helicobacter pylori-controlled c-Abl localization promotes cell migration and limits apoptosis. *Cell Commun. Signal* **2019**, *17*, 10. [[CrossRef](#)]
68. Jang, E.J.; Jeong, H.; Han, K.H.; Kwon, H.M.; Hong, J.-H.; Hwang, E.S. TAZ suppresses NFAT5 activity through tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 4925–4932. [[CrossRef](#)]

69. Remue, E.; Meerschaert, K.; Oka, T.; Boucherie, C.; Vandekerckhove, J.; Sudol, M.; Gettemans, J. TAZ interacts with zonula occludens-1 and -2 proteins in a PDZ-1 dependent manner. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 4175–4180. [[CrossRef](#)]
70. Nagy, T.A.; Frey, M.R.; Yan, F.; Israel, D.A.; Polk, D.B.; Peek, R.M. Helicobacter pylori regulates cellular migration and apoptosis by activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J. Infect. Dis.* **2009**, *199*, 641–651. [[CrossRef](#)]
71. Nagy, T.A.; Wroblewski, L.E.; Wang, D.; Piazzuelo, M.B.; Delgado, A.; Romero-Gallo, J.; Noto, J.; Israel, D.A.; Ogden, S.R.; Correa, P.; et al. β -Catenin and p120 mediate PPAR δ -dependent proliferation induced by Helicobacter pylori in human and rodent epithelia. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 553–564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Murata-Kamiya, N.; Kurashima, Y.; Teishikata, Y.; Yamahashi, Y.; Saito, Y.; Higashi, H.; Aburatani, H.; Akiyama, T.; Peek, R.M.; Azuma, T.; et al. Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal trans differentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* **2007**, *26*, 4617–4626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Franco, A.T.; Israel, D.A.; Washington, M.K.; Krishna, U.; Fox, J.G.; Rogers, A.B.; Neish, A.S.; Collier-Hyams, L.; Perez-Perez, G.I.; Hatakeyama, M.; et al. Activation of beta-catenin by carcinogenic Helicobacter pylori. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10646–10651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).