N° d'ordre

Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)
CERVI-INSERM U851 « Immunité, infection, vaccination »

DIPLOME DE DOCTORAT
(Arrêté du 7 août 2006)

Thèse soutenue publiquement le 22 novembre 2012 par

Monsieur Emmanuel Bachy

STIMULATION BACTERIENNE CHRONIQUE ET DEVELOPPEMENT DE LYMPHOMES DE TYPE NATURAL KILLER T-CELL (NKT) CHEZ LA SOURIS

Directeur de thèse : Docteur Thierry Defrance

JURY :

Professeur Philippe Gaulard	Rapporteur
Professeur Olivier Hermine	Rapporteur
Professeur Gilles Salles	Président
Professeur Thierry Lamy	Examinateur
Docteur Laurent Genestier	Examinateur
Docteur Thierry Defrance	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Secrétaire Général	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. PARROT
Département GEP	Directeur : M. N. SIAUVE
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : Mme S. FLECK
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. COLLIGNON
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. C. VITON
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. R. BERNARD
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS

Résumé

Le lien entre infection et lymphomagénèse est établi depuis plusieurs décennies. Notamment, deux types de mécanismes sont décrits : le premier, qualifié de direct et largement établi, fait intervenir un pathogène capable d'intégrer un ou plusieurs oncogènes dans la cellule et d'aboutir à sa transformation (par exemple le virus HTLV-1 ou le virus EBV) tandis que le second, qualifié d'indirect et mal connu, aboutit à la transformation cellulaire par une stimulation antigénique répétée du lymphocyte, le plus souvent dans un contexte inflammatoire, par un pathogène particulier (comme *Helicobacter pylori* par exemple). Il n'existe, à l'heure actuelle, qu'un seul modèle animal de lymphomagénèse indirecte permettant d'approcher la compréhension de ce mécanisme de transformation (lymphome B de la zone marginale gastrique chez la souris Balb/c). Nous avons cherché à développer un nouveau modèle murin de lymphomagénèse en contexte de stimulation bactérienne chronique.

Streptococcus pneumoniae (*Spn*) est une bactérie encapsulée dont l'implication dans le développement d'hémopathies lymphoïdes a été suggérée. Dans le cadre de ce travail de thèse, des souris génétiquement invalidées pour le gène suppresseur de tumeur p53 ont été injectées tous les 15 jours par le pathogène inactivé à la chaleur. Le modèle p53 a été choisi dans l'objectif de révéler un éventuel phénotype tumoral dont l'incidence resterait indétectable chez des animaux sauvages. L'injection répétée de *Spn* a augmenté de façon significative l'incidence de lymphomes T périphériques (TCRαβ pour la plupart) ayant un phénotype T mémoire effecteur ($CD44^{hi}CD62L^{lo}CD25^{-}CCR7^{-}$) et des marqueurs d'activation exprimés à leur surface (CD69, CD54 et B220). L'ensemble des marqueurs phénotypiques et des analyses transcriptomiques de ces lymphomes a permis de les distinguer sans ambiguïté des lymphomes T immatures thymiques connus et largement décrits dans ce modèle murin p53-déficient. L'existence d'un biais de répertoire $V_{ß}8$ dans ces lymphomes nous a conduit à supposer qu'ils pourraient dériver de lymphocytes particuliers dits NKT (Natural Killer T cells) invariants, hypothèse que nous avons confirmée de façon univoque par la positivité du marquage par le tétramère CD1d-α-GalCer. La recherche d'une entité comparable en pathologie humaine est actuellement en cours.

L'absence de tels lymphomes NKT décrits jusqu'à présent chez la souris ou l'homme ouvrent de multiples perspectives, à la fois sur le plan nosographique si une entité similaire est découverte en pathologie humaine mais aussi en terme de physiopathologie des lymphomes T. En effet, l'implication potentielle d'infections ou de maladies inflammatoires chroniques (jusqu'ici largement évoquée dans la lymphomagénèse B) dans le développement de lymphomes T pourrait apparaître comme un nouveau paradigme en hématologie.

Avertissement

La nature « Natural Killer T cell invariant (iNKT) » des lymphomes murins que nous avons observés dans le modèle p53-déficient n'ayant été déterminée que quelques jours avant la fin de la rédaction de ce manuscrit, l'introduction n'a pu être modifiée. Une partie bibliographique concernant les lymphocytes NKT a donc été ajoutée au début de la partie « discussion » de cette thèse.

Néanmoins, plusieurs arguments nous laissent supposer que les hypothèses sur la stimulation antigénique chronique des T conventionnels dans des pathologies telles que les leucémies T-LGL (large granular lymphocytes) ou les lymphomes de type EATL (enteropathy-associated T-cell lymphoma) restent pertinentes. Notamment, les données préliminaires *in vitro* dont nous disposons (basées sur des populations de lymphocytes T conventionnels et qui sont discutées en fin de manuscrit), associées à l'absence de lymphome NKT humain décrit à l'heure actuelle, suggèrent que les lymphomes NKT invariants murins obtenus sont peut-être un modèle plus large de lymphomagénèse T chez l'homme en contexte de stimulation antigénique chronique. Sauf à penser que l'ensemble de ces pathologies chez l'homme ne dérivent effectivement de lymphocytes à la frontière de l'immunité innée et de l'immunité adaptative tels que des NKT non invariant de type II par exemple (ce que nous sommes en train d'explorer), les parties introductives sur la lymphomagénèse T et le développement T normal nous semblent rester pertinentes.

Sommaire

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 9

A. Classification, épidémiologie et aspects cliniques des lymphomes 10

1. Classification 10

1.1. Types de lymphomes 10

1.2. Lymphomes B 10

1.3. Lymphomes T 11

2. Epidémiologie 13

2.1. Généralités 13

2.2. Formes immatures 13

2.3. Formes matures B 13

2.4. Formes matures T 14

3. Aspects cliniques 14

3.1. Circonstances de découverte 14

3.2. Complications 14

3.3. Facteurs pronostiques 14

4. Facteurs de risque et physiopathologie 15

4.1. Facteurs de risque 15

4.2. Physiopathologie 16

4.2.1. Lymphomagénèse B 17

4.2.2. Lymphomagénèse T 20

B. Infection chronique et lymphomagénèse 22

1. Différents mécanismes de transformation 22

1.1. Transformation « directe » 23

1.2. Transformation « indirecte » 24

2. Le lymphome du MALT gastrique associé à *H. pylori* ou l'archétype du modèle de transformation indirecte 25

2.1. Données épidémiologiques 25

2.2. Données thérapeutiques 26

2.3. Données physiopathologiques 27

2.3.1. Rôle de la composante lymphocytaire T 27

2.3.2. Spécificité antigénique de la composante lymphocytaire T 27

2.3.3. Polarisation et fonctionnalité de la composante lymphocytaire T 27

2.3.4. Spécificité antigénique du clone tumoral lymphocytaire B 28

2.4. Modèle animal 29

3. Autres lymphomes B associés à une possible infection chronique 30

3.1. Lymphomes B et infections à *C. jejuni*, VHC, *B. burgdorferi* et *chlamydia sp* 30

3.1.1. IPSID et C. jejuni 30
3.1.2. Lymphomes B non-hodgkiniens et infection par le virus de l'hépatite C 31
3.1.3. Lymphome cutané et infection à Borrelia burgdorferi 38
3.1.4. Lymphome des annexes oculaires et infection à Chlamydia psittaci 39
3.2. Lymphome B diffus à grandes cellules et infection chronique à *H. pylori* ou HCV 40
3.3. Leucémie lymphoïde chronique et lymphome du manteau : vers une extension du modèle ? 42
3.3.1. Leucémie lymphoïde chronique 42
3.3.2. Lymphome du manteau....44
4. Lymphomagénèse T et infection chronique : quels exemples ? 46
4.1. Leucémie T à grands lymphocytes granuleux (T-LGL) 46
4.1.1. Caractéristiques clinico-biologiques....46
4.1.2. Critères diagnostiques....47
4.1.3. Hypothèses physiopathologiques....49
4.2. Autres lymphomes T 52
4.2.1. Lymphomes T cutanés (mycosis fongoïde et syndrome de Sézary)....52
4.2.2. Lymphome T gastrique primitif....53
4.2.3. Lymphome T γδ hépatosplénique....54
5. Au-delà de l'infection chronique 55
5.1. Lymphome folliculaire et pesticides 55
5.1.1. Origine de la cellule tumorale 55
5.1.2. Rôle d'une éventuelle stimulation antigénique chronique....57
5.2. Lymphomes B et maladies auto-immunes 58
5.3. Lymphome T sur entéropathie et maladie coeliaque 59
5.4. Lymphome T anaplasique et prothèse mammaire 60
6. Quels modèles animaux ? 61
6.1. Modèle Eμ-*MYC*/BCR^{HEL} 62
6.2. Modèle ITK-SYK 63
6.3. Modèle Snf5$^{-/-}$ 64
C. Développement et réponse immunitaire lymphocytaire T 66
1. Développement lymphocytaire T 66
1.1. Développement lymphocytaire T au niveau thymique 66
1.2. Localisation spatiale des différentes étapes de différenciation 67
1.3. Sélections positive et négative 68
1.3.1. Sélection positive....68
1.3.2. Sélection négative....69
1.3.3. Rôle du signal TCR 70
2. Développement de la mémoire lymphocytaire 70
2.1. Activation lymphocytaire T et étapes de la réponse primaire 71
2.2. Principes de la mémoire lymphocytaire T 73
2.3. Lymphocytes T « central memory » et « effector memory » 74

2.4. Genèse de la mémoire lymphocytaire T _____ 75
2.5. Homéostasie des populations lymphocytaires T naïves et mémoires _____ 77
2.5.1. Homéostasie des lymphocytes T naïfs 78
2.5.2. Homéostasie des lymphocytes T activés 79
2.5.3. Homéostasie des lymphocytes T mémoires 80
2.6. Genèse de la population T mémoire « non conventionnelle » _____ 81
D. Conclusion 84

RESULTATS 85

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 123

A. Introduction 124
B. Les lymphocytes NKT : « What's in a name ? » 125
1. Généralités _____ 125
2. NKT de type I ou NKT invariants ou iNKT _____ 127
3. NKT de type II _____ 131
4. Les lymphocytes « NKT-like » _____ 132
C. Lymphomes NKT humains : mythe ou réalité ? 134
D. p53 dans la lymphomagénèse T : plus qu'un modèle animal ? 140
E. Lymphomagénèse T et stimulation antigénique chronique : vers un nouveau paradigme ?. 146
F. Perspectives 149

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 151

Table des illustrations (article non inclus)

Figure 1. La lymphomagénèse au cours des infections chroniques, un modèle complexe et multifactoriel. 16
Figure 2. Mécanisme d'action de l'enzyme AID dans l'hypermutation somatique et la commutation isotypique au cours du développement lymphocytaire B 19
Figure 3. Mécanismes schématiques de lymphomagénèse associés à une infection..... 23
Figure 4. Modèle de transformation directe par le virus de l'hépatite C via son entrée intracellulaire par interaction CD81-E2 35
Figure 5. Modèle de transformation indirecte par le virus de l'hépatite C 37
Figure 6. Modèle multi-étapes de transformation indirecte associée à l'infection chronique par le virus de l'hépatite C..... 38
Figure 7. Frottis sanguins montrant des petits lymphocytes matures (A) ou des grands lymphocytes à grains (B)..... 48
Figure 8. Etapes de développement des lymphocytes T α β au niveau thymique. 67
Figure 9. Hypothèses expliquant l'activation différentielle des lymphocytes CD8 comparativement aux lymphocytes CD4. 72
Figure 10. Etapes de la réponse antivirale lymphocytaire T CD4 et CD8..... 73
Figure 11. Modèles de différentiation des lymphocytes T mémoires 77
Figure 12. Structure de l'α-galactosylceramide.. 125
Figure 13. Marquage par l'α-galactosylceramide 127
Figure 14. Développement des lymphocytes iNKT 129
Figure 15. Schéma du glycolipide endogène iGb3 130
Figure 16. Schéma représentant les 2 modes d'activation direct et indirect des lymphocytes iNKT 131
Figure 17. Exemple de marquage par cytométrie en flux et en immunohistochimie par l'anticorps anti-B220..... 135
Figure 18. Analyse sur le site Immgen des profils d'expression de ZBTB16 (PLZF)..... 136
Figure 19. Résultats préliminaires montrant le rôle de p53 dans l'apoptose des lymphocytes T conventionnels stimulés chroniquement 141
Figure 20. Modèle hypothétique de lymphomagénèse T immature ou mature reposant sur des fonctions distinctes de p53 144
Figure 21. Modèle hypothétique de transformation par induction d'AID dans des lymphocytes T .. 145
Figure 22. Séquençage et alignement des séquences de 6 lymphomes NKT périphériques..... 147

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

A. Classification, épidémiologie et aspects cliniques des lymphomes

Les lymphomes malins se définissent comme des proliférations tumorales malignes constituées de cellules lymphoïdes B, T ou plus rarement NK. Les lymphomes malins ont fait l'objet de plusieurs classifications histologiques dont la dernière (OMS 2008) est de nature clinico-pathologique, c'est-à-dire fondée sur des données morphologiques (architecture de la prolifération et aspect cytologique), immunophénotypiques, génétiques, moléculaires et cliniques[1]. Dans la 1ère section de cette introduction bibliographique, quelques données générales physiopathologiques, épidémiologiques et cliniques des lymphomes seront brièvement abordées.

1. Classification

1.1. Types de lymphomes

Les néoplasies B et T/NK sont des tumeurs clonales matures ou immatures de lymphocytes B, de lymphocytes T ou de cellules NK à différents stades de différenciation. Par certains aspects, les néoplasies B et T semblent récapituler les caractéristiques de lymphocytes B et T normaux à certains stades de leur différenciation. Néanmoins, il existe vraisemblablement une hétérogénéité voire une plasticité de ces tumeurs rendant parfois délicat une correspondance stricte entre un type de tumeur et une contrepartie cellulaire normale.

Le système immunitaire peut schématiquement être divisé en deux composantes dont chacun des acteurs peut être à l'origine d'une transformation maligne et d'une évolution clonale aboutissant au développement d'une hémopathie. La 1ère de ces composantes est le système immunitaire inné qui inclut les cellules NK, les cellules NK/T et les lymphocytes T γδ. Ces cellules jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire survenant au niveau des barrières muqueuses et cutanées. La 2ème composante est constituée de lymphocytes T ou B intervenant dans la réponse immunitaire qualifiée d'adaptative. Elle présente deux caractéristiques uniques : la spécificité de la reconnaissance antigénique et l'aptitude à générer une « mémoire » immunologique. De la même façon qu'un certain nombre d'hémopathies dérivent de la transformation clonale d'acteurs du système inné, un certain nombre de néoplasies sont la conséquence de la transformation clonale d'un lymphocyte B ou T.

1.2. Lymphomes B

La plupart des lymphomes B conservent l'ensemble des caractéristiques principales de leur contrepartie cellulaire normale si bien que la classification de ce type de lymphomes repose essentiellement sur leur stade de différenciation.

De façon schématique, le lymphocyte B normal suit une différenciation linéaire débutant au niveau de l'organe lymphoïde central que constitue la moelle osseuse avant de se poursuivre dans les organes lymphoïdes secondaires en périphérie. Les précurseurs lymphoïdes B, dont dérivent les leucémies et

lymphomes lymphoblastiques, englobent plusieurs stades de différenciation débutant avec les progéniteurs B, donnant naissance aux lymphocytes pré-B caractérisés par la présence d'une immunoglobuline intracytoplasmique après réarrangement des segments V(D)J, et les lymphocytes B immatures caractérisés par la présence d'une immunoglobuline IgM de surface, avant l'acquisition d'un phénotype mature caractérisé par la co-expression IgM/IgD à la surface de la cellule. Ces cellules matures, qualifiées de lymphocytes B naïfs, quittent la moelle osseuse pour rejoindre les organes lymphoïdes périphériques. Chez l'homme, ces cellules B naïves sont souvent $CD5^+$, circulent dans le sang périphérique, les follicules lymphoïdes primaires ainsi qu'au niveau de la zone du manteau[2,3]. Le consensus actuel (bien qu'encore débattu) est que le lymphome du manteau dérive de la transformation maligne de ces cellules naïves $CD5^+$.[4]

Après sa rencontre avec un antigène dont son récepteur B (BCR) est spécifique, le lymphocyte B naïf va proliférer et subir un ensemble de transformations orientant son développement en lymphocyte B effecteur (plasmocyte) ou en lymphocyte B à mémoire. Selon la nature de l'antigène, le développement d'un lymphocyte B naïf en plasmocyte requiert ou non la contribution des lymphocytes T. Dans le cas où aucune aide T n'est nécessaire, cette réponse qualifiée de thymo-indépendante peut se dérouler en dehors du centre germinatif[5]. Néanmoins, la majorité des lymphocytes B, après rencontre avec leur antigène spécifique, vont être tributaires d'interactions avec des lymphocytes T, également antigène-spécifiques, pour leur maturation en plasmocytes ou en lymphocytes B mémoires. Cette réponse, conduisant à la formation d'un centre germinatif (siège du processus d'hypermutations somatiques), porte le nom de réponse thymo-dépendante. La plupart des lymphomes B sont supposés dériver de cellules du centre germinatif ou de cellules post-centre germinatif.

1.3. Lymphomes T

Concernant les lymphomes T, la détermination de la contrepartie cellulaire normale correspondant à un stade de différenciation déterminé s'avère beaucoup plus délicate et ceci pour plusieurs raisons. La 1ère, et principale, est la fréquence relativement faible des hémopathies T (voir paragraphe épidémiologie) comparativement aux hémopathies lymphoïdes B, d'où des données physiopathologiques beaucoup plus parcellaires.

À la différence des lymphocytes B, les précurseurs T se développent successivement dans 2 organes lymphoïdes centraux : la moelle osseuse (comme pour les précurseurs B) et le thymus. Les étapes de maturation des précurseurs T, notamment au niveau de la glande thymique, seront décrites plus en détail dans la 3ème section de cette introduction bibliographique. L'ensemble des hémopathies malignes dérivant de la transformation clonale de ces précurseurs T, que ce soit au niveau de la moelle osseuse ou du thymus, constitue les leucémies aiguës ou lymphomes lymphoblastiques T. [6]

Les lymphomes T matures sont rencontrés principalement chez l'adulte, et leur présentation est essentiellement ganglionnaire, contrastant avec les localisations majoritairement extra-ganglionnaires

des lymphomes T γδ ou NK du système immunitaire inné[6]. Comme précisé précédemment, la contrepartie lymphocytaire T normale des lymphomes T matures est rarement établie. Le lymphome T angio-immunoblastique semble cependant faire exception à cette règle. Il est en effet maintenant admis que ce lymphome dérive de la transformation de lymphocytes dits T_{FH} (pour T follicular helper), sous-types de lymphocytes T CD4+ participant à la maturation de la réponse immunitaire adaptative B au sein du centre germinatif[7]. Le phénotype de ces cellules est assez particulier puisqu'elles expriment les marqueurs du centre germinatif BCL6 et CD10 habituellement retrouvés au niveau des lymphocytes B ainsi que les marqueurs CD4, CD57, PD-1 et CXCR5[8]. Même si l'expression de ces différents marqueurs n'est pas systématique au sein des lymphomes angio-immunoblastiques, il existe un faisceau d'arguments pour rattacher ce type de lymphomes à la cellule T_{FH}.

2. Epidémiologie

2.1. Généralités

Au cours des 40 dernières années, l'épidémiologie des lymphomes a été marquée par une augmentation de l'incidence des lymphomes malins non hodgkinien (LNH) qui sont devenus le 7ème cancer en terme de fréquence. Cette augmentation, qui amorce un fléchissement, est plus marquée dans les pays développés même si elle intéresse l'ensemble du monde[9,10]. Cette augmentation est hétérogène selon le type de lymphome considéré, intéressant notamment les LNH alors que l'incidence de la maladie de Hodgkin est restée stable. Au sein du groupe des LNH, l'augmentation a surtout concerné les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL), les lymphomes folliculaires (FL) et les lymphomes de la zone marginale (MZL). Par comparaison, l'incidence de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) est restée relativement stable, tandis que celle du myélome multiple a légèrement augmenté.

2.2. Formes immatures

Les leucémies aiguës ou lymphomes lymphoblastiques, qu'ils soient de phénotype T ou B, sont principalement retrouvés chez l'enfant. 75% de ces hémopathies se développent avant 6 ans. Dans 85% des cas de forme leucémique le phénotype est B tandis que les hémopathies de type T ont plus volontiers une forme lymphomateuse avec notamment une présentation médiastinale. Il existe une prédominance masculine dans ce type d'hémopathies immatures.

2.3. Formes matures B

Les néoplasies B matures représentent près de 90% des hémopathies lymphoïdes à l'échelle mondiale[11]. Ils représentent approximativement 4% des cas de nouveaux cancers par an. Ils sont plus fréquemment rencontrés dans les pays développés, en particulier aux Etats-Unis, en Europe de l'Ouest ou en Australie. Les 2 types histologiques principaux sont, par ordre de fréquence, les DLBCL et le FL représentant respectivement 37% et 29% des cas de NHL[12]. Il existe des disparités géographiques concernant l'incidence des différents sous-types histologiques de lymphomes B matures. Par exemple, le FL est plus fréquent aux Etats-Unis et en Europe de l'Ouest alors qu'il est rare en Amérique du Sud, en Europe de l'Est, en Afrique ou en Asie., *A contrario*, le lymphome de Burkitt (BL) est endémique en Afrique équatoriale où il est systématiquement associé à l'infection par le virus Epstein-Barr (EBV) alors qu'il représente moins de 2% des cas de lymphomes aux Etats-Unis et en Europe de l'Ouest. La médiane d'âge de survenue des lymphomes B est de l'ordre de 60 à 70 ans avec cependant quelques disparités notamment concernant le lymphome B primitif du médiastin ou le lymphome de Hodgkin dans sa forme nodulaire sclérosante qui touchent de façon prédominante adolescents et jeunes adultes.

2.4. Formes matures T

Les lymphomes T et NK matures restent relativement rares, représentant approximativement 12 % de l'ensemble des lymphomes non-hodgkiniens[13].

3. Aspects cliniques

3.1. Circonstances de découverte

Les circonstances de découverte de la majorité des lymphomes malins sont liées soit aux manifestations du syndrome tumoral, le plus souvent ganglionnaire, soit aux signes généraux associés. Une adénopathie, définie comme un ganglion de plus de 1 cm de diamètre, qu'elle soit superficielle ou profonde (médiastinale ou abdominale), est ainsi le mode de découverte le plus fréquent. Cette ou ces adénopathies sont généralement fermes, indolores, non inflammatoires, et mobiles. La splénomégalie est également fréquente. Tous les sites anatomiques extra-ganglionnaires peuvent également être touchés, notamment la moelle osseuse, la peau, le foie, le tube digestif, les poumons, le système nerveux central, les seins ou les testicules. Parmi les signes généraux, 3 définissent ce qu'on appelle communément les symptômes B (en référence à la classification d'Ann Arbor qui sera détaillée ultérieurement) : une fièvre > 38 °C pendant plus de 8 jours, à prédominance vespérale ; la présence de sueurs nocturnes obligeant le patient à se changer ; un amaigrissement supérieur à 10 % du poids corporel en moins de 6 mois. Un prurit inexpliqué, une altération de l'état général font également partie des signes généraux qu'il n'est pas rare de retrouver dans la symptomatologie des lymphomes.

3.2. Complications

Les complications liées aux lymphomes sont également une circonstance de découverte fréquente. Ces complications sont essentiellement de deux natures, soit mécanique dans le cadre d'un syndrome compressif lié à la masse tumorale (compression médiastinale avec syndrome cave supérieur, occlusion digestive ou urinaire voire compression médullaire ou radiculaire au niveau rachidien), soit systémique dans le cadre, par exemple, d'un syndrome de lyse tumorale (spontané ou après début de la chimiothérapie) ou dans le cadre d'un syndrome d'activation macrophagique (le plus souvent associé à un lymphome T).

3.3. Facteurs pronostiques

Hormis l'âge du patient et le type histologique du lymphome, plusieurs paramètres tels que le stade (défini par la classification d'Ann Arbor, voir tableau 1), la présence de signes généraux ou l'état général du patient participent à l'établissement du pronostic de la maladie. Par ailleurs, un certain nombre de paramètres biologiques tels que le taux de lactate déshydrogénase (LDH), l'hémoglobine, le taux de ß2-microglobuline ou la présence d'un syndrome inflammatoire biologique (CRP et vitesse

de sédimentation) sont eux aussi pris en compte par la plupart des scores pronostiques propres à chaque type de lymphome.

Stade I	Atteinte d'une aire ganglionnaire
Stade II	Atteinte d'au moins 2 aires ganglionnaires situées du même côté du diaphragme
Stade III	Atteinte ganglionnaire de part et d'autre du diaphragme
Stade IV	Atteinte viscérale en dehors d'une atteinte par contiguïté (moelle, foie, poumon)
A : absence de signes généraux / B : présence de signes généraux E : atteinte d'un viscère par contiguïté d'une atteinte ganglionnaire X : tumeur volumineuse dite « bulky » : rapport tumeur médiastinale/médiastin > 1/3 ou diamètre > 10cm S : atteinte splénique	

Tableau 1. Classification d'Ann Arbor des lymphomes *(version révisée en 1989 dite de Cotswolds)*

4. Facteurs de risque et physiopathologie

4.1. Facteurs de risque

De nombreux facteurs de risque ont été décrits comme pouvant être liés au développement de lymphomes B ou T (voir figure 1). Parmi ceux-ci, les agents infectieux ne seront pas traités dans ce paragraphe puisqu'ils constituent le sujet même de cette thèse et seront traités abondamment dans l'ensemble de celle-ci. Le rôle de l'immunodépression, génétique ou thérapeutique, a été clairement documenté. Les études, pour la plupart menées dans le cadre du consortium international InterLymph, ont permis d'identifier de nouveaux facteurs de risque et d'en dédouaner d'autres. Le rôle de l'hérédité a été confirmé avec une augmentation du risque de près de 50% chez un apparenté du 1er degré et notamment au sein de la fratrie[14]. Ce rôle est variable suivant l'entité considérée : plus important pour les FL et les lymphomes du manteau que pour les lymphomes T. Le rôle de l'inflammation a été démontré avec un risque accru associé à certains polymorphismes du TNF ou de l'IL-10 dans les DLBCL, du récepteur toll-like (TLR) 2 dans le FL et du TLR4 dans le MZL de type MALT (pour mucosa-associated lymphoid tissue). Les rôles de NF-κB, de gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN et du stress oxydatif sont probablement majeurs mais restent pour l'heure mal déterminés. Des facteurs individuels comme l'obésité ont été identifiés, ainsi qu'une alimentation riche en viande, en graisse ou en produits laitiers ont été évoqués. La consommation de légumes et de poissons aurait un effet protecteur tout comme celle d'aliments contenant des flavonoïdes[15] (retrouvés dans une grande variété d'aliments tels que le céleri, le jus d'orange, le raisin, les mûres, les câpres, le raisin, le thé ou le cacao). La responsabilité de l'exposition à la dioxine a été identifiée[16,17], celle des pesticides est supposée[18]. Les rôles du tabac ou de l'alcool, des nitrates, des statines, des anti-inflammatoires stéroïdiens ou non-stéroïdiens voire des anticonvulsivants n'ont pas été retenus. Certaines teintures de cheveux ont clairement été incriminées dans le développement de LNH dans les années 1980 avant leur retrait du marché. Le rôle protecteur de l'exposition solaire, notamment aux

ultra-violets[19], a été confirmé. Le risque associé aux maladies auto-immunes sera traité dans un chapitre à part entière.

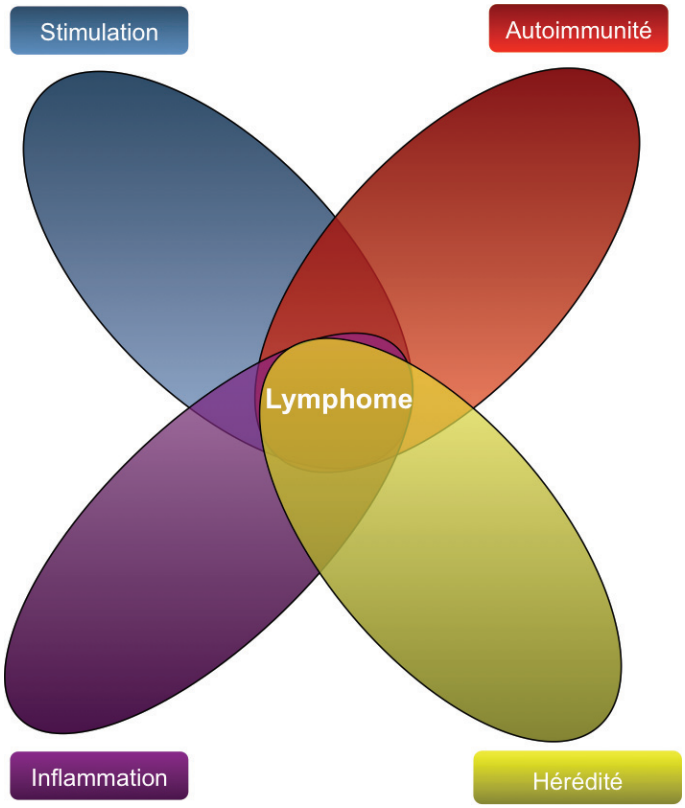


Figure 1. La lymphomagénèse au cours des infections chroniques, un modèle complexe multifactoriel**.** La stimulation antigénique chronique dans le processus de transformation n'est vraisemblablement qu'une des composantes de ce modèle.

4.2. Physiopathologie

Comme nous l'avons vu précédemment, environ 90% des lymphomes sont de phénotype B et moins de 10% de phénotype T. Cela peut paraître paradoxal étant données les fréquences comparables de lymphocytes B et T chez l'individu. Néanmoins, comme nous allons le voir, le développement lymphocytaire B expose ce dernier à un nombre d'étapes à risque de transformation oncogénique largement supérieur à celui du lymphocyte T. Que ce soit dans la lymphomagénèse B ou T, les anomalies cytogénétiques occupent une place prépondérante, notamment les translocations chromosomiques. Néanmoins, il apparaît aujourd'hui clairement que les lymphomes ne sont pas des pathologies tumorales autonomes comme en témoigne la dépendance fréquente au microenvironnement tumoral, au contexte cytokinique ou à la signalisation du BCR ou du TCR.

4.2.1. Lymphomagénèse B

Les différents stades du développement lymphocytaire B sont caractérisés par certaines modifications au niveau des gènes du BCR tout comme par l'acquisition de marqueurs phénotypiques particuliers. L'ensemble de ces étapes de développement se déroule par ailleurs dans des organes ou des structures histologiques distinctes. La constatation que la plupart des lymphomes B semblent conserver les marqueurs particuliers correspondant au stade de développement où s'est produite la transformation est à la base de la nomenclature OMS[20-23]. Les études d'expression pan-génomique ont également largement contribué à la définition de la contrepartie cellulaire normale.

La plupart des lymphomes B dérivent de cellules du centre germinatif ou post-centre germinatif. Ainsi, le lymphome folliculaire ou le lymphome de Burkitt de même que certains type de lymphomes B diffus à grandes cellules (dit de type GCB pour germinal-center like B-cell) semblent clairement naître d'une transformation lors de la réaction du centre germinatif[24]. La LLC, qu'elle soit de phénotype muté ou non muté, semble correspondre à une cellule B à mémoire (donc post-centre germinatif). Nous reparlerons en détails de la LLC dans la 2ème partie de cette introduction bibliographique[25]. Pour certains types de lymphomes tels que les lymphomes B diffus à grandes cellules de type ABC (pour activated B-cell étant donné la ressemblance en terme de profil d'expression génique avec des cellules B activées *in vitro*) ou les lymphomes de Hodgkin, la contrepartie cellulaire normale exacte apparaît moins évidente à identifier et pourrait signifier une dérive phénotypique associée au processus de transformation tumorale[26].

La réponse d'un lymphocyte B ou T à un antigène donné passe par la reconnaissance de ce dernier par le BCR ou le TCR de ce même lymphocyte. Chaque lymphocyte porte un récepteur B ou T distinct formé de la combinaison de segments V, D et J (pour la chaîne lourde du BCR ou la chaîne ß du TCR) et de segments V et J (pour la chaîne légère du BCR ou la chaîne α du TCR). Outre de la diversité combinatoire générée par les différents réarrangements V(D)J, la maturation d'affinité (SHM pour somatic hypermutation) exclusivement observée pour le BCR, la taille du répertoire potentiel pour les lymphocytes B est augmentée par un mécanisme d'hypermutations somatiques (SHM) médié par la protéine AID (activation-induced cytidine deaminase) au niveau du centre germinatif. AID est également responsable de la commutation de classe (CSR ou class-switch recombination) permettant de générer des isotypes d'immunoglobuline autres que IgM (IgA, IgG ou IgE et leurs sous-classes). Néanmoins, il est actuellement supposé que cette protéine AID, au-delà de son rôle physiologique dans la maturation du lymphocyte B, occupe une place centrale dans la lymphomagénèse B en introduisant des mutations ponctuelles au hasard (mais ciblées toutefois sur certaines séquences nucléotidiques qualifiées de « hotspots ») dans certains proto-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur voire en générant certaines translocations chromosomiques (figure 2). L'expression de cette protéine AID lors de la réaction du centre germinatif serait à la base de la surincidence observée de lymphomes B par rapport aux lymphomes T.

Ainsi, les processus oncogéniques à l'origine de la lymphomagénèse B commencent à être assez clairement identifiés. Notamment, les translocations impliquant le locus d'un des gènes des immunoglobulines et un pro-oncogène sont très fréquemment retrouvées[27,28]. Trois groupes de translocations de ce type peuvent être identifiés. Le premier, telle que la translocation *BCL2-IGH* retrouvée dans le lymphome folliculaire, porte les stigmates de la recombinaison V(D)J médiée par les recombinases de la famille RAG survenant à un stade précoce du développement lymphocytaire B dans la moelle osseuse (perte de nucléotides à la fin des segments J_H ou D_H et addition de nucléotides différant de la séquence germinale)[29,30]. Dans le 2ème groupe de translocation impliquant les gènes des Igs, la cassure se situe en amont ou en aval de segments V(D)J réarrangés et la région variable porte des stigmates de mutations somatiques, preuve que la translocation à lieu lors de la réaction du centre germinatif via l'action de AID[31,32]. Le 3ème groupe de translocations se situe au niveau de la région constante de la chaîne lourde des Igs indiquant qu'elles surviennent durant la commutation isotypique ou commutation de classe (CSR) toujours sous l'action de AID.

Hormis les translocations, AID est responsable de mutations somatiques au niveau de certains pro-oncogènes par un mécanisme « by-stander » encore mal compris. Ainsi, des mutations dans les gènes *BCL6*, *PIM1*, *PAX5, FAS* ou *MYC* ont été clairement identifiées dans les lymphomes B diffus à grandes cellules[33].

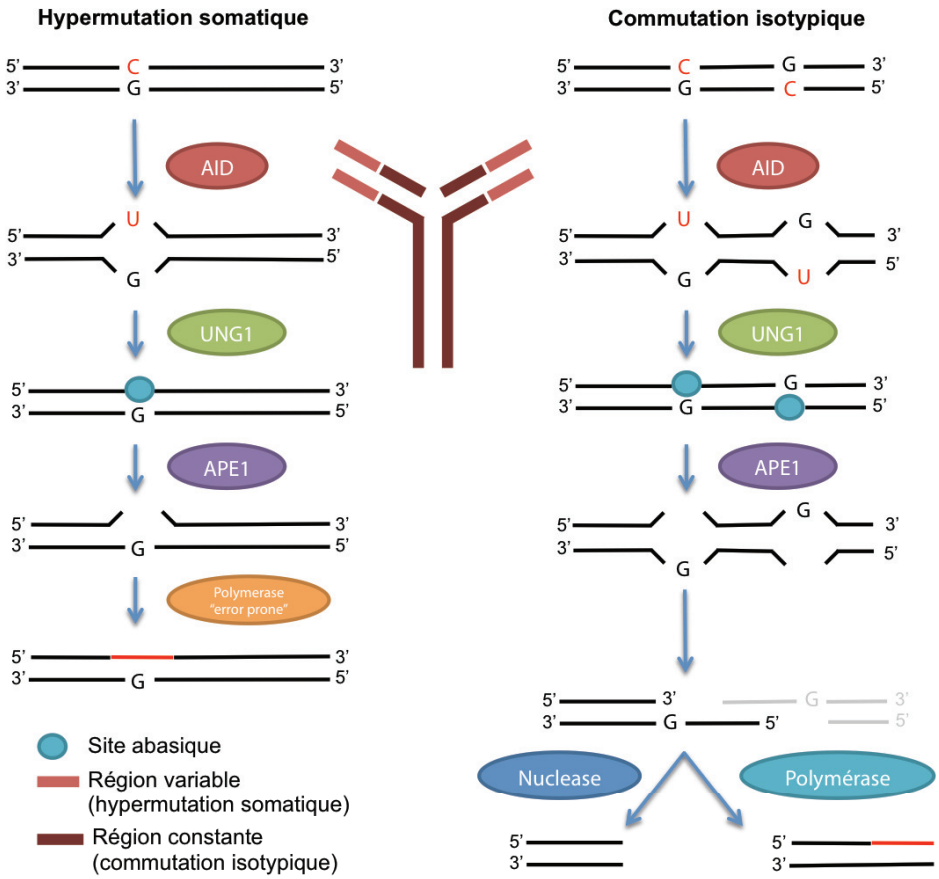


Figure 2. Mécanisme d'action de l'enzyme AID dans l'hypermutation somatique et la commutation isotypique au cours du développement lymphocytaire B (*d'après Nussenzweig et al. Nature 2004*).

La survie des lymphocytes B matures est dépendante d'une signalisation par la voie du BCR, l'ablation conditionnelle de ce dernier ou l'inactivation de sa voie de signalisation dans des modèles murins conduisant à une apoptose rapide de cette population[34,35]. La question de savoir s'il s'agit d'une signalisation constitutive autonome ou d'une interaction de faible affinité avec certains antigènes reste débattue. De la même façon, il est actuellement démontré que la plupart des lymphomes B matures sont dépendants d'une signalisation par la voie du BCR pour leur survie. Ainsi, la plupart des lymphomes B expriment un BCR de surface, bien que l'expression puisse être relativement faible, et il existe des indices clairs en faveur d'une pression de sélection sur la fonctionnalité même de ce BCR[36,37]. En effet, à quelques exceptions près[38], les translocations impliquant le locus des Igs surviennent exclusivement sur l'allèle non-productif (ne perturbant ainsi pas l'expression du BCR) alors que les remaniements génétiques intervenant lors de la recombinaison V(D)J, le SHM et la CSR s'opèrent sur les deux allèles du locus Ig. D'autres preuves indirectes existent telles que l'absence de diminution ou de perte d'expression du BCR comme mécanisme d'échappement lors d'un traitement par anticorps anti-idiotypique[39]. De la même façon, alors que 10% des mutations somatiques

introduites lors du processus de SHM devraient conduire à une perte d'expression du BCR dans un processus purement aléatoire –mutations non-sens, délétions ou duplications avec déplacement du cadre de lecture, ou encore remplacements empêchant l'appariement chaîne légère/chaîne lourde-, ce genre de phénomène n'est quasiment jamais observé dans les lymphomes dits de type centre germinatif ou post-centre germinatif (folliculaire, Burkitt ou MALT notamment)[40]. Les rares cas de lymphomes n'exprimant pas un BCR de surface tels que la plupart des lymphomes de Hodgkin, le lymphome des séreuses, le lymphome du transplanté ou le lymphome B primitif du médiastin ont probablement acquis des moyens de contourner la nécessité de cette signalisation directe par le BCR[41-43]. Notamment, un certain nombre de ces lymphomes sont associés à l'EBV et il a été démontré que la protéine LMP2A pouvait se substituer à un engagement direct du BCR (notamment par des motifs ITAM similaires aux protéines CD79a et CD79b)[44]. Les antigènes potentiellement impliqués dans l'engagement du BCR des différents types de lymphomes évoqués précédemment ainsi que leur rôle potentiel dans le processus de transformation, la survie et la prolifération du clone tumoral seront largement détaillés dans la partie suivante de ce manuscrit.

4.2.2. Lymphomagénèse T

Contrairement aux lymphomes B, les mécanismes de la lymphomagénèse T restent mal identifiés. La classification des lymphomes T reste erratique comme en témoigne l'entité majoritaire qualifiée de PTCL-NOS pour peripheral T-cell lymphoma-non otherwise specified[20], reflétant bien le manque de réels critères distinctifs permettant d'appréhender finement cette maladie rare et agressive. A l'exception des réarrangements impliquant le gène *ALK* dans certains lymphomes anaplasiques et la t(5;9) juxtaposant ITK et SYK dans certains PTCL-NOS –essentiellement de morphologie particulière dite folliculaire- (dont nous reparlerons dans la 2ème partie de ce travail à propos des modèles murins de lymphomagénèse), il n'existe pas de translocation récurrente permettant d'aider au démembrement de ces lymphomes T[45-48]. Jusqu'à présent, ces lymphomes ont donc été principalement regroupés d'après leur présentation clinique et la topographie anatomique de l'envahissement tumoral (nodal, extra-nodal, cutané, localisé, disséminé…).

Alors que les translocations impliquant les gènes des immunoglobulines sont habituelles dans les lymphomes B matures (t(14;18) du lymphome folliculaire, t(8;14) du Burkitt ou t(11;14) du lymphome du manteau par exemple), les translocations impliquant les gènes du TCR sont l'apanage des formes immatures (leucémie aiguë lymphoblastique T) et de la leucémie pro-lymphocytaire (mettant en contact le promoteur du gène α du TCR en 14q11 et les oncogènes *TCL1* en 14q32 ou *MTCP1* en Xq28) alors qu'elles sont exceptionnelles dans les formes matures[49,50]. Certaines translocations impliquant des gènes du TCR et d'autres oncogènes tels que *PVRL2* ou *IRF4*/*MUM1* ont été décrites dans de rares cas de PTCL-NOS[51,52].

Tout comme pour les lymphomes B mais dans une moindre mesure, l'utilisation de profils d'expression génique a permis d'appréhender la contrepartie cellulaire normale dont semble dériver

certains lymphomes T. Comme évoqué précédemment, c'est notamment le cas pour le lymphome angio-immunoblastique (AITL) dont la correspondance avec des cellules T_{FH} a été clairement établie[7,53]. Par ailleurs, ces analyses ont montré que certains lymphomes T de type PTCL-NOS se rapprochaient nettement d'une signature de type AITL, suggérant que cette dernière entité pourrait s'avérer plus étendue qu'initialement supposé. Ces données ont été appuyées par la démonstration récente de mutations récurrentes de *TET2* à la fois dans les AITL et dans un sous-groupe de PTCL-NOS exprimant certains marqueurs communément retrouvés dans les T_{FH} (PD-1, BCL6 et/ou CXCL13) ou présentant certaines caractéristiques des AITL (2 parmi les suivantes : grands lymphocytes B $CD20^+$, cellules $EBER^+$, expansions de cellules dendritiques folliculaires CD21 et/ou CD23, expression du CD10)[54]. Une stricte correspondance entre stade de développement ou type cellulaire d'origine de la cellule tumorale n'a pas été mise en évidence à ce jour pour d'autre type de lymphomes T que les AITL.

B. Infection chronique et lymphomagénèse

1. Différents mécanismes de transformation

Les études épidémiologiques établissant un lien entre infection et lymphomagénèse publiées au cours des 2 dernières décennies sont nombreuses. Néanmoins, les mécanismes biologiques sous-jacents qui mènent au processus de transformation dans un contexte infectieux sont encore aujourd'hui mal compris. De façon générale, les liens entre infections à *Helicobacter pylori* et lymphome gastrique de type MALT, à EBV et syndrome lymphoprolifératif notamment chez le transplanté, à herpès virus 8 (HHV-8) et lymphome des séreuses, ou encore entre infection au virus T lymphotropique humain (HTLV-1) et la leucémie T aiguë de l'adulte (ATL) ont été démontrés. À l'heure actuelle, il n'existe cependant pas, dans la plupart des cas, de modèle physiopathologique clair permettant de comprendre l'ensemble des étapes de transformation aboutissant aux lymphomes. De façon schématique, il semble qu'il existe 2 types de transformation distincts (figure 3). D'un côté, un mécanisme de transformation qualifié d'« indirect » (dont l'infection à *Helicobacter pylori* et le lymphome gastrique de type MALT constitue l'archétype), et de l'autre côté, un mécanisme de transformation qualifié de « direct » (dont les lymphomes associés à l'EBV, HHV-8 ou HTLV-1 semblent caractéristiques)[55]. Certains auteurs parlent d'un 3^{e} type d'association dans le cadre des lymphomes associés au virus de l'immunodéficience humaine. Ce type de mécanisme faisant intervenir une diminution de la veille immunitaire antitumorale (mais également une lymphoprolifération à EBV dans la majorité des cas) ne sera pas abordé dans le cadre de ce travail.

Dans les néoplasies de type B, l'analyse du récepteur des cellules B permet d'apporter des informations à la fois sur le plan ontogénétique mais aussi sur le plan de l'implication éventuelle d'un antigène dans le processus de transformation. En particulier, l'existence d'un biais du répertoire au niveau de la chaîne lourde des immunoglobulines est généralement considérée comme la preuve qu'un nombre limité d'antigènes, de superantigènes ou de ces 2 entités est impliqué dans la lymphomagénèse[22,23]. Par ailleurs, l'existence d'hypermutations somatiques dans un certain nombre de lymphomes B, souvent caractéristiques d'un récepteur qui a subi une pression de sélection par l'antigène, rend l'hypothèse du rôle d'une stimulation antigénique à un moment donné du processus de transformation plus que probable[56,57]. Pour la leucémie lymphoïde chronique, l'homologie structurelle du site de liaison à l'antigène entre différents BCR non-apparentés (on parle alors de stéréotypie de ces BCR) rend cette hypothèse encore plus crédible[58].

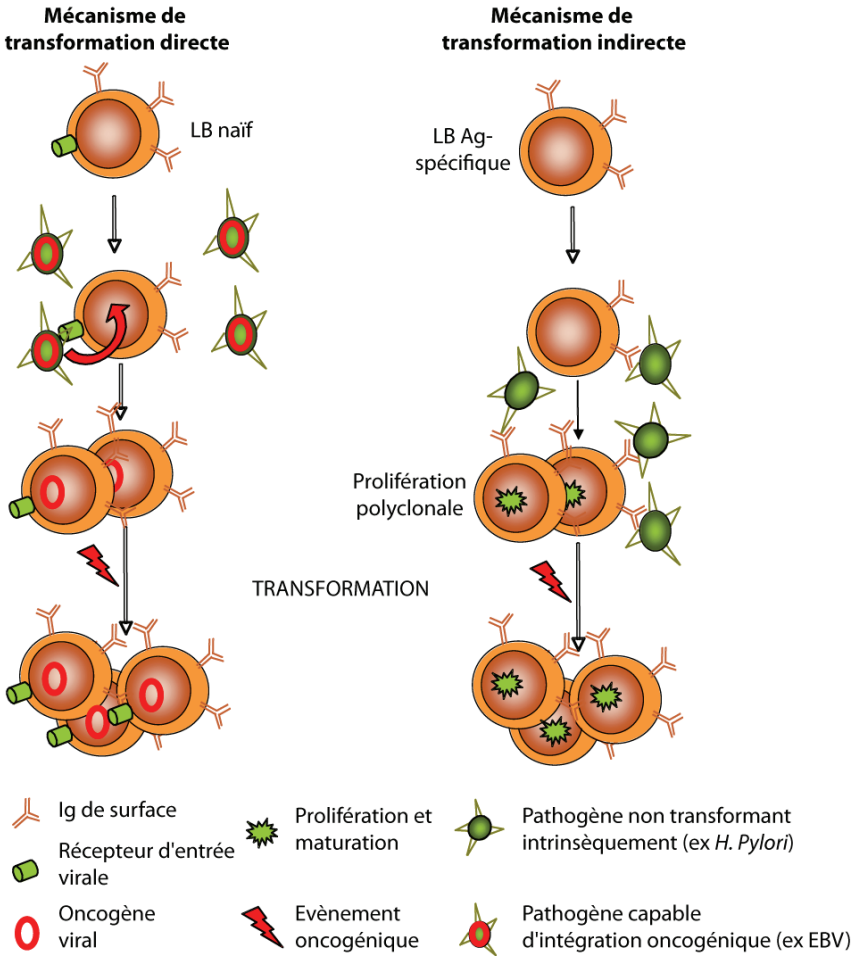


Figure 3. Mécanismes schématiques de lymphomagénèse associés à une infection *(d'après Suarez et al.*[55]*)*.

1.1. Transformation « directe »

Le virus EBV est un exemple majeur de virus transformant impliqué dans la survenue de plusieurs sous-types histologiques de lymphomes. Ce virus est habituellement contracté dans la petite enfance dans la plupart des pays en voie de développement. Dans les pays développés, la primo-infection a lieu le plus souvent lors de l'adolescence et est responsable de la mononucléose infectieuse. À la suite de cette primo-infection, le virus persiste à l'état latent au niveau de certains lymphocytes B mémoires. La capacité de transformation du virus Epstein-Barr *in vitro* est clairement établie. Plusieurs protéines du virus peuvent être exprimées dans les lymphocytes infectés mais, parmi celles-ci, la protéine LMP-1 (pour latent membrane protein-1) semble la plus importante dans le processus de transformation. Chez le sujet immunocompétent, l'intégrité de l'immunité cellulaire T prévient l'émergence de clones B transformés par l'EBV.

L'association systématique de l'EBV à la forme endémique du lymphome de Burkitt en Afrique sub-saharienne en a fait l'un des modèles de transformation directe privilégié. Ce type de lymphome, dont la présentation clinique typique chez le jeune enfant est la présence de masses extra-nodales rapidement progressives, est caractérisé de façon systématique par une translocation t(8;14) mettant le

gène *C-MYC* sous contrôle du promoteur de la chaîne lourde des immunoglobulines. EBV est également largement impliquées dans la survenue des lymphomes en contexte d'immunosuppression, qu'elle soit acquise ou innée. Chez le transplanté d'organe, l'immunosuppression thérapeutique anti-rejet peut être responsable d'une perte de contrôle de l'infection à EBV. Ultérieurement, le développement d'une lymphoprolifération n'est pas rare, allant d'une simple hyperplasie lymphoïde à un véritable lymphome non-hodgkinien lors d'un stade plus tardif. L'expression d'un large panel de protéines de l'EBV, dont la protéine LMP-1, est fréquemment retrouvée dans les lymphomes du transplanté associés à ce virus. Ce même virus est également retrouvé dans un autre type de lymphome non-hodgkinien appelé lymphome NK/T nasal.

Deux autres virus transformant que son le virus HHV-8 et le virus HTLV-1 entrent dans le cadre de ce mécanisme de transformation directe. HHV8, agent responsable du sarcome de Kaposi, appartient, tout comme le virus EBV, à la famille des herpès virus. Il est également retrouvé dans tous les cas de lymphomes des séreuses. Il est également lié à la maladie multicentrique de Castelman et aux lymphomes plasmablastiques associés à cette dernière. Le virus HTLV-1 est, quant à lui, responsable de la leucémie aiguë T de l'adulte.

1.2. Transformation « indirecte »

Le modèle de transformation directe a donc été initialement évoqué au début des années 1960 par les travaux de Epstein avec la mise en évidence d'un nouveau type d'herpès virus dans des suspensions de lignées cellulaires issues de biopsies de lymphomes de Burkitt endémiques[59]. Plus récemment, une autre théorie est venue faire le lien entre infection chronique, notamment bactérienne, et développement de certains types de lymphomes. Dans cette hypothèse, la persistance d'un agent bactérien de façon chronique au niveau de certains tissus est supposée favoriser l'émergence d'un clone lymphocytaire tumoral par stimulation chronique sans transformation directe. Il existe en effet au cours de tout processus prolifératif la survenue potentielle d'erreurs réplicatives usuellement prévenues par le système de réparation cellulaire. Comme nous l'avons précisé précédemment, le développement et la maturation post-stimulation antigénique des lymphocytes B présentent probablement un risque intrinsèque accru de survenue d'événements oncogéniques via le potentiel mutationnel de la protéine AID. L'un des modèles les mieux établis à l'heure actuelle pour ce type de transformation directe est le lymphome du MALT gastrique associé à l'infection par *Helicobacter pylori*. Néanmoins, il est important de garder en mémoire que les premières hypothèses concernant le lien potentiel entre infections et lymphomagénèse par stimulation chronique datent du milieu des années 70. A cette période, les premiers cas de régression de la maladie des chaînes lourdes alpha ou IPSID (pour immunoproliferative small intestine disease[60-62] dont nous reparlerons plus loin) sous antibiotiques à large spectre[63] (donnés initialement pour tenter de contrôler la symptomatologie diarrhéique) sont en effet observés.

2. Le lymphome du MALT gastrique associé à *H. pylori* ou l'archétype du modèle de transformation indirecte

La dénomination de lymphome dit du MALT est venue de l'examen simultané de 2 cas de lymphomes B de bas grade par Isaacson et Wright[64], l'un correspondant à un IPSID et l'autre à ce qui allait devenir un lymphome B du MALT gastrique. La ressemblance frappante entre ces 2 types de lymphomes et la structure histologique des plaques de Peyer ont conduit les 2 anatomopathologistes à supputer l'origine commune de ce type de lymphomes. Par la suite, la cartographie exacte de ces lymphomes du MALT à été précisée avec 70% des cas concernant une localisation gastrique, 14% une localisation pulmonaire, 12% les annexes oculaires (conjonctive et glandes lacrymales), 4% la thyroïde et 1% l'intestin grêle (dont l'IPSID)[65]. Etant donnée la surreprésentation des localisations gastriques, il n'est pas étonnant que l'ensemble des avancées physiopathologiques aient été réalisées à partir de ce modèle.

La démonstration précise du lien de causalité en pathologie humaine n'est jamais chose aisée. En épidémiologie, les critères de Austin Bradford Hill établis en 1965 sont encore aujourd'hui de rigueur dans la démonstration des liens de causalité entre un agent et une pathologie[66]. Ils sont au nombre de neufs, sans critère dont la présence est *sine qua non*, et leurs importances respectives sont relatives à la pathologie considérée. Ils sont résumés dans le tableau 2, et l'on peut noter dans le cas de la lymphomagénèse associée aux infections chroniques l'importance du critère d'association, de la cohérence externe, de la plausibilité biologique et des preuves expérimentales. Le lymphome du MALT gastrique associé à *Helicobacter pylori* est aujourd'hui l'archétype de la pathologie dans laquelle la quasi totalité des critères de causalité a été démontrée.

Force de l'association	Niveau de l'association Importance de la différence
Cohérence	Externe : reproductibilité entre travaux, équipes, populations Interne : protocole, gestion des biais
Temps	L'exposition précède la cause
Relation dose-effet	-
Preuves expérimentales	-
Spécificité de l'association	-
Cohérence biologique	Histoire naturelle de la maladie, physiopathologie
Plausibilité biologique	En regard des connaissances actuelles
Analogie	Par rapport à d'autres pathologies

Tableau 2. Critères de Austin Bradford Hill *(d'après Hill[66]).*

2.1. Données épidémiologiques

En 1991, Wotherspoon *et al.* publient la 1ère étude pivot dans le Lancet en montrant la présence du pathogène *H. pylori* dans la quasi-totalité des cas de lymphomes B du MALT gastrique (101/110 patients exactement)[67]. Rappelons que dans la population générale, du moins dans les pays développés, la prévalence de l'infection à *H. pylori* au niveau gastrique est de l'ordre de 50 à 60 %

environ qui sont à comparer aux 92 % observés dans cette cohorte. Dans le même papier, les auteurs montrent que chez 125 patients sur 450 présentant des lésions de gastrite à *H. pylori* sans lymphome franc, des structures lymphoïdes secondaires, similaires à un tissu de type MALT au niveau des plaques de Peyer, étaient retrouvées. Non seulement cette étude princeps posait les bases de l'association épidémiologique entre *H. pylori* et les lymphomes du MALT gastriques mais elle permettait également de caractériser les probables lésions pré-néoplasiques que sont les lésions lympho-épithéliales (LEL). D'autres études sont venues corroborer ces données d'un point de vue épidémiologique. Notamment, l'association géographique entre prévalence de l'infection à *H. pylori* et incidence de lymphome gastrique a clairement été soulignée[68], en particulier dans certaines régions d'Italie. Enfin, une autre étude centrale, publiée dans le New England Journal of Medicine en 1994, est venue confirmer de façon définitive l'association entre l'infection à *H. pylori*. et le lymphome du MALT gastrique[69]. Dans cette étude cas-témoins, une base de plus de 230 000 sérums collectés prospectivement a été rétrospectivement exploitée par les auteurs. Ces derniers ont en effet analysé la présence d'anticorps IgG anti-*H. pylori* par ELISA chez 33 patients ayant développé ultérieurement un lymphome du MALT gastrique de même que chez 132 contrôles sains (matching 1:4 apparié sur l'âge, le sexe et la date de collection du sérum) et 31 patients ayant développé ultérieurement un lymphome non-hodgkinien de localisation non-gastrique. Confirmant les données des études précédentes, le risque de développer un lymphome du MALT gastrique était significativement plus élevé chez les patients dont la sérologie anti-*H. pylori* était positive que chez les sujets contrôles (Odds ratio=6.3, 95% CI=2.0-19.9). Aucune association n'était en revanche retrouvée entre infection à *H. pylori* et lymphomes non-hodgkiniens de localisation non-gastrique. Avec une médiane de délai de 14 ans entre la date de collection du sérum et le développement d'un lymphome du MALT gastrique, cette étude introduisait pour la 1ère fois de façon univoque le critère de temporalité nécessaire à l'établissement d'un lien de causalité.

2.2. Données thérapeutiques

Pierre angulaire dans la démonstration du lien de causalité entre infection et lymphomagénèse, les premiers travaux démontrant la régression de la pathologie tumorale après éradication du pathogène ont été publiés en 1993 par l'équipe du professeur Isaacson[70]. Dans cette étude clé publiée dans le Lancet, les auteurs montrent la réponse complète sur les plans endoscopique, histologique et moléculaire associée à l'éradication d'*H. pylori*. Une multitude de travaux ultérieurs portant sur plus de 500 cas ont montré qu'un succès avoisinant les 75% peut être espéré d'une telle démarche thérapeutique[71,72]. Malgré la persistance dans près de 50 % des cas du clone tumoral documentée par biologie moléculaire, la rechute de la pathologie lymphomateuse est loin d'être la règle bien qu'elle existe[73-75].

2.3. Données physiopathologiques

2.3.1. Rôle de la composante lymphocytaire T

Les premières données physiopathologiques datent, elles aussi, du début des années 90. À cette époque, la même équipe que celle qui a mis en évidence le lien épidémiologique entre *H. pylori* et lymphome du MALT gastrique démontre comment l'ensemble des cellules B tumorales meurent spontanément en culture dans un délai de l'ordre de 5 jours[76]. L'adjonction d'*H. pylori* inactivé à la chaleur à la culture permet à la fois la survie mais également la prolifération et l'activation (documentée par l'expression du CD25) du clone tumoral. De façon notable, cet effet est souche-spécifique, renforçant l'idée que la souche infectant le patient est bien celle responsable du mécanisme de lymphomagénèse et non une réactivité fortuite secondaire. Par ailleurs, les auteurs montrent que la prolifération du clone tumoral et la sécrétion d'IL-2 dans les cultures sont largement diminuées lorsque le contingent T est déplété, soulignant pour la 1ère fois le caractère T-dépendant de la prolifération clonale lymphocytaire B. De façon singulière, les lymphocytes T du patient mais issus d'un autre organe que l'estomac sont incapables de pourvoir à l'aide nécessaire à la prolifération du clone B. De façon similaire, aucune prolifération ou activation n'est en revanche détectée lorsque des cellules de lymphomes B de localisation nodale sont mises en présence du pathogène. Des études postérieures ont montré que l'interaction CD40-CD40L est fondamentale dans le rôle joué par les lymphocytes T pour la prolifération du clone tumoral[77]. Ces données permettent de comprendre la faible propension de ce type de lymphome à disséminer à distance de la localisation d'origine, tout du moins lorsque le clone reste dépendant de la présence du pathogène au niveau gastrique.

2.3.2. Spécificité antigénique de la composante lymphocytaire T

La plupart des lymphocytes T infiltrant les lésions de lymphome du MALT gastrique sont $CD4^+$ tandis qu'une minorité de T $CD8^+$ intra-tumoraux sont observés. Alors qu'aucun clone T $CD8^+$ généré par dilution limite *in vitro* n'est capable de répondre à un lysat total de *H. pylori*, entre 2 et 36% des clones T $CD4^+$ générés à partir de biopsies de patients atteints soit d'ulcère peptique, soit de gastrite, soit de lymphome du MALT *H. pylori* positifs, prolifèrent en réponse à un lysat total ou à des protéines purifiées telles que CagA, VacA, l'uréase ou certaines HSP du pathogène. La spécificité antigénique est majoritairement dirigée contre la protéine CagA au stade d'ulcère peptique (50% des clones $CD4^+$), contre l'uréase au stade de gastrite chronique (25% des clones) alors que la spécificité antigénique au stade de lymphome semble mal déterminée (réponse essentiellement au lysat total de *H. pylori*) reflétant une réponse possible à un antigène pour l'instant indéterminé.

2.3.3. Polarisation et fonctionnalité de la composante lymphocytaire T

Alors qu'au stades initiaux de la pathologie digestive liée à *H. pylori*, notamment au stade d'ulcère peptique, il existe une très nette polarisation Th1, la réponse de ces clones T $CD4^+$ au stade de lymphome du MALT semble variable et les données de la littérature sont contradictoires. Une réponse

de type Th0 mixte avec IFN-γ, IL-4 et IL-5 sécrétés de façon équilibrée dans certaines études[78] ou la persistance d'un profil Th1 dans d'autres[79] ou encore plus récemment la mise en évidence d'un profil Th2 majoritaire[80,81] ont été décrites. Il existe par ailleurs des altérations fonctionnelles de ces populations T infiltrant les lésions lymphomateuses. D'un côté, l'aide fournie par ces lymphocytes T à des lymphocytes B autologues sanguins purifiés (évaluée par incorporation de thymidine tritiée à J4) est majorée comparativement à une expérience menée avec des lymphocytes T dans les stades initiaux non tumoraux de la pathologie à *H. pylori* ou par les lymphocytes T sanguins circulants non intra-tumoraux des patients. D'un autre côté, les capacités cytotoxiques évaluées par la lyse de lymphocytes B autologues EBV-transformés et chargés par un lysat de *H. pylori* est largement diminuée. Sont notamment observées une faible capacité à induire une apoptose Fas-FasL médiée de même qu'une défaillance des capacités cytotoxiques perforine-médiées[78].

2.3.4. Spécificité antigénique du clone tumoral lymphocytaire B

La présence d'hypermutations somatiques (on parle de clone « muté » lorsque le degré d'homologie induit par ces mutations somatiques par rapport à la séquence « germinale » est inférieur à 98%, polymorphismes exclus) au sein du locus du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines de même que la présence d'une évolution intra-clonale sont des arguments forts en faveur du rôle de la stimulation antigénique par *H. Pylori* dans le processus de lymphomagénèse. Les travaux portant sur l'étude de la présence d'hypermutations somatiques dans les lymphomes du MALT gastrique indiquent que la plupart des clones tumoraux sont mutés[82,83]. Toutefois, alors que la spécificité antigénique et le rôle des lymphocytes T dans la prolifération des lymphocytes B tumoraux sont relativement bien établis, la spécificité antigéniques du BCR du clone B lymphomateux restent plus difficiles à appréhender. En effet, de façon assez particulière, les différents travaux publiés sont en faveur d'une polyréactivité de ce BCR, reconnaissant à la fois des antigènes de *H. pylori* mais aussi un large panel d'autoantigènes[84,85]. Une étude récente publiée par Craig *et al*. dans Blood[86] montre notamment comment l'immunoglobuline du clone tumoral exprimée de façon recombinante (IgG recombinante obtenue à partir du clonage et du séquençage de l'IgM de surface portée par le lymphocyte B tumoral après transfection dans des cellules 293T) fixe avec une affinité intermédiaire à la fois des antigènes du soi et des antigènes exogènes, notamment des lysats de *H. pylori* totaux, des immunoglobulines G (facteur rhumatoïde), l'ADN ou encore un broyat gastrique. Par ailleurs, il existe un biais de répertoire avec l'utilisation dans 4 cas sur 7 de lymphomes du MALT gastrique d'une région variable de la chaîne lourde des immunoglobulines V_H 1-69*01. A noter également une région CDR3 particulière, notamment plus longue que la normale (15,3 acides aminés contre 12,7 acides aminés de moyenne). Cinq cas sur 7 analysés présentaient des hypermutations somatiques au niveau du locus V_H. Trois cas sur 7 présentaient des signes d'évolution intra-clonale (accumulation de mutations séquentielles dérivant d'un clone unique). L'ensemble de ces éléments suggère que non seulement le clone tumoral a besoin d'une aide par des clones T *H. pylori* spécifiques mais que la

contribution d'une stimulation directe via son BCR polyréactif semble essentielle, tout du moins dans les stades précoces de la maladie. Cependant, la polyréactivité retrouvée dans cette étude reste débattue comme en témoigne la réponse à cet article faite par Hoogeboom *et al.*[87] ne retrouvant qu'un seul cas polyréactif parmi 7 échantillons testés[85]. L'apparente polyréactivité du BCR tumoral rapportée par Craig *et al*. est en contradiction avec le statut muté de ce même BCR qui signe normalement l'acquisition d'une monoréactivité de haute affinité. A noter qu'une autre étude publiée quelques années auparavant montrait que l'ensemble des Igs recombinantes synthétisées à partir de 7 lymphomes du MALT (60% de localisation gastrique et 40% de localisations autres) ne présentaient quasiment aucune réactivité vis-à-vis d'un panel de screening de quelque 30000 protéines et 5000 peptides[88].

2.4. Modèle animal

Les premières données concernant un modèle murin expérimental d'infection chronique à *Helicobacter* (souche infectante d'*Helicobacter felis* ou *Helicobacter heilmannii* chez la souris BalB/c) datent de 1995[89]. À cette époque, Enno *et al.* montrent comment jusqu'à l'âge de 19 mois environ aucun signe d'inflammation ou de lésions lympho-épithéliales n'est observé chez les animaux infectés alors qu'à partir de 22 mois, 38 % des animaux infectés développent un tissu lymphoïde correspondant à du MALT tandis qu'aucune modification immuno-histologique n'est observée chez les animaux du groupe contrôle non infecté. Par ailleurs, de véritables lésions lympho-épithéliales sont observées chez 25% des animaux infectés par *H. felis* évoquant d'un point de vue morphologique le développement de réels lymphomes du MALT. Plus important encore et preuve que le modèle expérimental semble mimer de façon pertinente la pathologie humaine, l'éradication par traitement antibiotique (bismuth + métronidazole + tétracycline *per os* pendant 14 jours après 20 mois d'infection) de l'infection à *H. pylori* entraîne chez ces souris l'absence de développement ultérieur de lésions tumorales, au moins d'un point de vue macroscopique[90]. Alors que 23% (11/48) des animaux traités par antibiotiques présentaient un lymphome du MALT gastrique 4 mois après le traitement antibiotique (24 mois au total), 75% (27/36) des animaux non traités avaient développé un lymphome. Parmi les animaux atteints, le grade histologique était également significativement plus élevé chez les animaux non traités par antibiotiques.

La même équipe a poussé un peu plus loin la démonstration de la correspondance avec la pathologie humaine en montrant en 2005 qu'une réinfection par le pathogène après réponse complète histologique entraînait une rechute de la pathologie tumorale. Bien que rare, il est en effet démontré que la ré-infection chez un sujet porteur de lymphome du MALT gastrique en réponse complète histologique est susceptible d'entraîner une rechute dans 1 à 20% des cas suivant les séries, ayant fait proposer à certains la nécessité d'un traitement antibiotique du conjoint, lui aussi le plus souvent *H. pylori* « positif »[91].

Parallèlement à l'analyse du BCR dans des lymphomes du MALT gastrique humain, Craig *et al.* ont étudié la spécificité antigénique, la région CDR3 et l'évolution intra-clonale du BCR porté à la surface du clone tumoral dans les lymphomes du modèle murin infecté par *H. felis*[86]. Des résultats similaires à ceux retrouvé chez l'homme ont été obtenus avec un biais de répertoire V_H (V_H1 dans 7 cas sur 20 et V_H14 dans 4 sur 20), un statut mutationnel positif dans 9 cas sur 11 analysés, une région CDR3 plus longue qu'attendue, une évolution intraclonale dans 6 cas sur 11 et une polyréactivité de l'idiotype recombinant. A noter également des signes en faveur d'une sélection négative et/ou positive du clone (fortement évocatrice d'un processus antigène-médié) dans 8 cas sur 11. On parle de sélection positive lorsque le rapport du taux de mutations retrouvées dans les régions CDRs (complementary determining regions) responsables d'un remplacement nucléotidique (R) sur le taux de mutations silencieuses (S) est supérieur au rapport théorique attendu dans un processus purement aléatoire (cut-off à 2,9). On parle de sélection négative lorsque le rapport du taux de mutations retrouvées dans la région FR (framework region) responsables d'un remplacement nucléotidique (R) sur le taux de mutation silencieuse (S) est inférieur au rapport théorique attendu dans un processus purement aléatoire (cut-off à 2,9 également)[92]. De façon schématique, cette méthode de détermination mathématique équivaut biologiquement au fait qu'un processus de maturation antigène médié va se traduire par la conservation du clone le plus affin pour l'antigène (ayant donc « affiné » sa complémentarité au niveau de la région CDR3 tout en ayant « préservé » au maximum la signalisation au niveau de la région FR). Cette technique est largement utilisée pour montrer de façon indirecte que certains lymphomes B semblent reliés à une stimulation antigénique chronique.

Finalement, le lymphome du MALT gastrique dans le contexte de l'infection à *H. pylori* est clairement aujourd'hui le lymphome B en contexte de stimulation antigénique le mieux documenté et le seul, à notre connaissance, dont il existe un modèle murin. Il existe néanmoins d'autres lymphomes B dont le lien avec une infection chronique sans processus de transformation directe semble fort probable, de type MALT principalement mais non exclusivement.

3. Autres lymphomes B associés à une possible infection chronique

3.1. Lymphomes B et infections à *C. jejuni*, VHC, *B. burgdorferi* et *chlamydia sp*

3.1.1. IPSID et C. jejuni

Alors qu'il est le premier lymphome de type MALT à avoir été décrit et le premier dont l'association avec une infection chronique a été supposée (voir l'efficacité d'un traitement antibiotique probabiliste évoquée précédemment), le lymphome méditerranéen ou maladie des chaînes lourdes α rebaptisé IPSID (immunoproliferative small intestine disease) est resté longtemps sans pathogène associé formel. Il est également le premier lymphome de type MALT où la restriction de la chaîne légère puis la clonalité formelle -documentée à partir de l'analyse par Southern Blot de la chaîne lourde des Ig- a

été démontrée dès les stades précoces de la maladie[93,94]. Alors que les premières tentatives par culture bactériologique standard n'ont pas permis d'identifier un germe potentiel dans les cas d'IPSID[95], des résultats contradictoires ont par la suite été publiés quant à l'imputabilité d'*Helicobacter pylori*[96,97]. Ce n'est qu'en 2004 que Marc Lecuit *et al.* publient dans le New England Journal of Medicine l'association entre infection à *Campylobacter jejuni* et IPSID d'après l'étude d'un cas princeps suivi de la documentation de 4 cas supplémentaires sur 6 investigués, à l'aide de techniques immunohistochimiques (marquage par anticorps monoclononal dirigé contre un antigène flagellaire du pathogène) et biomoléculaires (sonde FISH et amplification par PCR spécifiques d'une séquence de *Campylobacter jejuni*). Les auteurs confirment la réponse hématologique (disparition de la chaîne lourde α tronquée sérique et du clone tumoral circulant chez le cas princeps) associée à l'éradication du pathogène par le traitement antibiotique. De façon intéressante, un case-report mentionnant l'exacerbation, après le début de la chimiothérapie dans un cas d'IPSID, d'une diarrhée avec identification de *Campylobacter jejuni* à la culture avait déjà été rapporté dans la littérature sans que le lien physiopathologique n'ait été évoqué[98]. Par ailleurs, la répartition géographique des cas d'IPSID semble en accord avec la distribution des cas de portage asymptomatique de *C. jejuni* puisque 15% des enfants sont porteurs du pathogène dans les pays en voie de développement contre 0,5% dans les pays développés. En effet, il existe une incidence plus forte de la pathologie en moyen et extrême Orient ainsi qu'en Afrique. Néanmoins, hormis ces données d'association épidémiologique et thérapeutique, les données physiopathologiques concernant la persistance de *C. jejuni* de façon asymptomatique chez l'hôte ou concernant la présence de lésions pré-néoplasiques sont encore parcellaires. De plus, aucun modèle murin n'existe, rendant le lien de causalité formelle encore loin d'être démontré.

Par ailleurs et de façon tout à fait intrigante, la non fonctionnalité de la chaîne lourde tronquée sécrétée par le clone tumoral plasmocytaire pose la question du rôle de la stimulation antigénique via une interaction directe BCR-pathogène. Néanmoins, il semble clair qu'il existe une poursuite de la différenciation B du clone tumoral dont la contrepartie cellulaire originelle serait plutôt centro-germinative et dont la maturation plasmocytaire serait un *continuum*[99]. Il est tout à fait possible qu'une stimulation initiale par le BCR soit ensuite relayée par un environnement pro-inflammatoire seul. La perte de la fonctionnalité de la chaîne lourde tronquée a par ailleurs été associée à une disparition du rétro-contrôle négatif exercé normalement par les IgA totales normales au niveau de la muqueuse intestinale (comme en témoigne l'augmentation massive de plasmocytes à IgA dans la *lamina propria* de souris $sIgR^{-/-}$ incapables de produire la forme polymérique sécrétoire SIgA)[100], conférant ainsi un avantage sélectif au clone tumoral[101].

3.1.2. Lymphomes B non-hodgkiniens et infection par le virus de l'hépatite C

Au-delà de son rôle bien établi comme agent responsable de l'hépatite non-A et non-B, il existe actuellement des arguments solides permettant d'établir un lien entre l'infection au virus de l'hépatite C (VHC) et le risque de développement d'un lymphome B non-hodgkinien. Cette association entre

VHC et syndrome lymphoprolifératif a été établie récemment sur la base de données épidémiologiques, biologiques et cliniques.

Le virus de l'hépatite C fait partie des virus à ARN de la famille des *Flaviviridae*. Il est de petite taille (~9600 nucléotides), ne dispose pas d'une reverse-transcriptase et code pour une protéine de grande taille dont le clivage donne naissance à plusieurs protéines structurales et non structurales (enzymatiques) virales. Plusieurs études cas-témoins ont clairement rapporté une association entre l'infection à VHC et le développement de LNH. Deux études américaines majeures (dont l'une basée sur le registre NCI-SEER ou National Cancer Institute-Surveillance Epidemiology and End Results) et une étude européenne (consortium EPILYMPH) ont documenté une augmentation modérée du risque de LNH chez les patients VHC positifs comparativement aux sujets contrôles (Relative Risk ou RR=2-3)[102,103]. Ces données ont été confirmées par une méta-analyse reprenant 15 études cas-témoins et 3 essais prospectifs[104]. Enfin, une autre méta-analyse récemment publiée par le consortium InterLymph (regroupant des pays européens, des centres nord-américains et australiens) a confirmé cette association (Odds Ratio ou OR=1,78 ; 95% CI=1,40-2,25)[105]. Une étude japonaise a par ailleurs montré sur une cohorte de patients VHC positifs suivis sur une période de 15 ans que 2,5% des patients avaient un risque de développer un LNH[106]. De façon tout à fait intéressante, aucun patient ayant obtenu une PCR VHC négative sous traitement antiviral n'a développé de lymphome contre un risque similaire entre les patients non traités et ceux dont la PCR est restée positive[106]. Tous les sous-types histologiques ne sont pas représentés de façon homogène chez les patients VHC positifs. Ce sont plus particulièrement les lymphomes de la zone marginale (notamment spléniques) (OR=2,47 ; 95% CI=1,44-4,23), les lymphomes B diffus à grandes cellules (OR=2,24 ; 95% CI=1,68-2,99) ou les lymphomes lympho-plasmocytaires (OR=2,57 ; 95% CI=1,14-5,79) dont l'incidence est augmentée tandis que la fréquence des lymphomes folliculaires (OR=1,02 ; 95% CI=0,65-1,60) ou des lymphomes T ne semble pas différer de celle de la population générale[105,107,108]. L'association épidémiologique apparaît donc claire même si une grande variabilité géographique a été relevée. Notamment, une surincidence dans les pays à forte prévalence est observée et certains facteurs de susceptibilité (environnementaux, génétiques ?) aujourd'hui inconnus expliquent probablement cette disparité géographique[109,110].

Les études interventionnelles ont permis d'asseoir un peu plus le rôle du virus dans la physiopathologie des LNH. En particulier, l'étude princeps publiée par Hermine *et al.* en 2002 a montré la régression de la pathologie lymphomateuse (lymphome de la zone marginale splénique) chez 9 patients après traitement antiviral par interferon alfa-2b associé ou non à un traitement par ribavirine[111]. En revanche, aucun des 6 patients présentant un lymphome de la zone marginale splénique VHC négatif n'a pu obtenir de réponse clinique sous traitement par interferon. Une autre série de 18 patients publiée par le même groupe en 2005 a confirmé les résultats précédents[112]. Il est intéressant de noter dans cette étude l'existence d'une corrélation entre la qualité de la réponse virale et la qualité de la réponse clinique ainsi que la rechute de la pathologie tumorale chez un patient en

rechute virologique. Deux autres séries, l'une publiée par l'équipe de l'hôpital Cochin, l'autre par une équipe italienne, ont montré des résultats superposables[113,114] (tableau 3).

	Nombre de patients (n)	Age au diagnostic (median or mean)	Cryoglobulinémie de type II (n)	Type de lymphome (n)	Traitement (n)		Réponse hématologique (n)			
					IFN	IFN/RBV	RC	RP	MS	MP
Hermine *et al.* 2002	9	55.0	6	SLVL (9)	9	0‡	7	-	2	-
Kelaidi *et al.* 2004	8	50.0	7¶	MZL splénique (2) SLVL (3) MZL extranodal (2) Autres$^{\Sigma}$ (2)	1	7	5†	-	2	1
Saadoun *et al.* 2005	18	58.0	18	SLVL (18)	8	10	14	4	-	-
Vallisa *et al.* 2005	13	57.6	5	MZL nodal (2) MZL splénique (4) MZL extranodal (2) Folliculaire (1) Plasmocytaire (4)	0	13	7	2	2	1∞

‡Les 2 patients en réponse virale incomplète ont par la suite reçu un traitement par IFN+RBV permettant l'obtention d'une réponse hématologique;
∞Un patient n'avait pas de données disponibles concernant la réponse hématologique;
¶Le dernier patient avait une cryoglobulinémie de type III;
$^{\Sigma}$Incluant un patient avec MZL leucémisé et un MZL disséminé;
†2 patients ont reçu des cures additionnelles de PEG IFN + RBV pour l'obtention d'une réponse complete;
Abréviations: IFN, interferon; RBV, ribavirine; RC, réponse complète; RP, réponse partielle; MS, maladie stable; MP, maladie progressive; SLVL, lymphome de la zone marginale splénique à lymphocytes villeux; MZL, lymphoma de la zone marginale.

Tableau 3. Résultats des différents essais cliniques évaluant l'impact d'un traitement antiviral sur la réponse hématologique dans les lymphomes non-hodgkiniens associés au virus de l'hépatite C *(d'après Bachy et al.[115])*.

D'un point de vue physiopathologique, plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer l'association entre la pathologie virale et la pathologie tumorale. Peu de crédit a pour l'instant été accordé aux hypothèses de transformation directe même si, *in vitro* et *in vivo*, la capacité du virus à infecter directement les lymphocytes B a été démontrée. Ainsi, plusieurs études ont montré que, d'une part, le CD81 est un récepteur porté à la surface du lymphocyte B permettant l'entrée du virus dans la cellule *in vitro*[116] et que, d'autre part, l'infection de lignée cellulaire B par le virus était susceptible d'entraîner des mutations somatiques au niveau de gènes suppresseurs de tumeur ou d'oncogènes tels que *TRP53*, *BCL6* ou le gène codant pour la ß-caténine (figure 4)[117,118]. L'expression des protéines virales C (core protéine) ou NS3 (non-structural protein 3) sont associées à l'induction de NOS (nitric oxide synthase) potentiellement responsable de ces mutations[117]. Plusieurs anomalies chromosomiques, notamment une polyploïdie, ont été retrouvées dans les PBMC de patients VHC positifs de même que dans les splénocytes de souris transgéniques exprimant constitutivement la protéine C (core) du virus[119]. Dès lors, il a été avancé que l'infection par le virus pourrait être responsable d'un défaut dans le contrôle du cycle cellulaire. *In vivo*, l'identification d'un ARN complémentaire négatif au brin d'ARN positif du virus est un intermédiaire permettant d'identifier une réplication active du virus au sein d'un sous-type cellulaire particulier. A l'aide d'une méthode sensible et spécifique, Sansonno *et al*. ont démontré la présence d'une réplication active au sein des PBMC de certains patients VHC positifs, et notamment dans 50% des patients présentant une cryoglobulinémie mixte de type II, c'est-à-dire l'existence d'un composant monoclonal IgM ayant une activité de type facteur rhumatoïde (IgM anti-IgG), associée ou non à une vascularite cliniquement parlante[120]. En revanche, aucun des patients sans cryoglobulinémie mixte ne présentait de réplication active du virus. Par ailleurs, une réplication virale n'a jamais été mise en évidence au niveau des cellules lymphomateuses (hormis un cas rapporté dans la littérature[121]) chez des patients VHC positifs. En définitive, même si la capacité d'infecter des lymphocytes B *in vitro* et *in vivo* semble établie, le rôle physiopathologique d'une telle infection dans la lymphomagénèse reste largement remis en question.

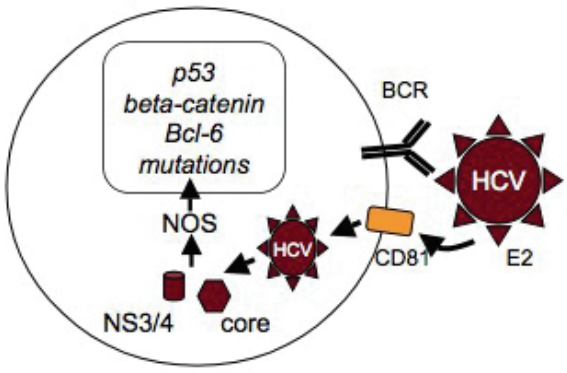


Figure 4. Modèle de transformation directe par le virus de l'hépatite C via son entrée intracellulaire par interaction CD81-E2 *(Suarez et al.[122])*.

Au contraire, l'hypothèse d'une transformation par un mécanisme indirect résultant d'une stimulation chronique de lymphocytes B matures est soutenue par de nombreuses études. A cet égard, un modèle multi-étapes a été proposé où la survenue d'une cryoglobulinémie mixte de type II pourrait être considérée comme un stade pré-lymphomateux. L'association cryoglobulinémie mixte et hépatite C est clairement établie puisque 50 à 90% des patients atteints de cette pathologie sont VHC positifs. Inversement, près de 40 à 50% des patients VHC positifs ont une recherche de complexes cryoprécipitants qui s'avère positive. De la même façon que la thérapie antivirale est associée, en cas de réponse, à une rémission de la pathologie lymphomateuse, il existe très souvent une disparition de la cryoglobulinémie chez les patients répondeurs au traitement par IFN +/- ribavirine[123-126]. Le risque de développer un lymphome B chez les patients porteurs d'une cryoglobulinémie est de 8 à 10%, soit près de 35 fois supérieur au risque de la population générale (on rappelle que le risque global, d'après les études cas-témoins et les méta-analyses citées précédemment, de développer un lymphome B chez les patients VHC positifs ne dépasse pas 3 fois celui des patients VHC négatifs). De même, si la présence d'une population lymphocytaire B monoclonale ou oligoclonale est fréquemment mise en évidence chez les patients VHC positifs, que ce soit au niveau du sang périphérique, de la moelle osseuse ou du foie, elle l'est plus particulièrement chez ceux atteints d'une cryoglobulinémie. Néanmoins, tous les patients VHC positifs porteurs de cryoglobulinémie ne développent pas systématiquement de lymphome et le mécanisme exact d'un tel *continuum*, s'il existe, reste à élucider.
L'analyse du répertoire V(D)J des patients porteurs d'une cryoglobulinémie ou d'un lymphome B non-hodgkinien a permis de progresser dans la compréhension de la physiopathologie de ces pathologies associées au virus de l'hépatite C. Ainsi, l'existence d'un biais de répertoire avec utilisation préférentielle des familles V_H1-69 et V_K3-20/15 retrouvée dans ces 2 pathologies semble confirmer l'hypothèse d'une stimulation antigénique chronique du BCR[127]. Le séquençage des régions variables a montré la présence de mutations somatiques suggérant un processus de maturation compatible avec une pression de sélection par l'antigène[128]. Par ailleurs, d'autres arguments sont venus conforter cette hypothèse, notamment la démonstration d'une cross-réactivité du BCR porté par certains clones de patients atteints d'une hépatite C (compliquée de cryoglobulinémie ou de lymphome) reconnaissant à la fois certaines protéines du virus (comme E2 ou NS3) et le fragment constant des IgG (IgG-Fc)[129,130]. Dès lors, on peut imaginer le modèle multi-étapes suivant : i) une stimulation chronique initiale de certains sous-clones lymphocytaires B par des protéines virales (E2 ou NS3) aboutissant ii) au développement d'une cryoglobulinémie par mimétisme antigénique et rupture de tolérance, iii) avant que les IgG ne constituent en elles-mêmes le moteur de la stimulation avec iv) apparition *in fine* d'une pathologie lymphomateuse liée à l'acquisition d'évènements pro-oncogéniques. Enfin, le rôle de certaines protéines virales ne s'arrêterait pas à un mimétisme croisé avec les IgG puisque l'interaction E2-CD81, en agissant à la fois avec le BCR et le CD81 permet d'associer le complexe co-activateur CD81-CD19-CD21 au BCR, diminuant ainsi son seuil

d'activation[131]. Qui plus est, la liaison d'une protéine E2 recombinante à ce même CD81 est capable d'entraîner *in vitro* l'apparition de mutations somatiques au niveau du locus du gène des immunoglobulines (figure 5)[132]. La protéine E2 étant exprimée à la surface du virion, on comprend aisément qu'une infection directe du lymphocyte B par le virus n'est nullement requise pour aboutir théoriquement à sa transformation.

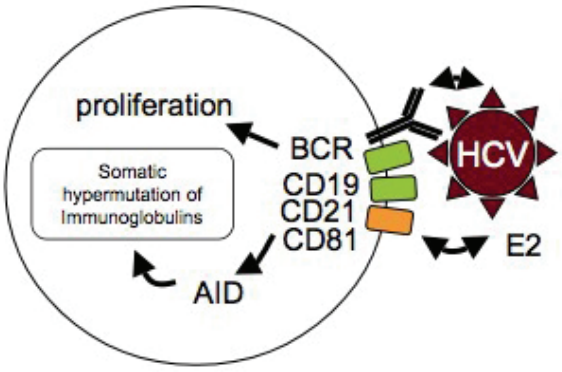


Figure 5. Modèle de transformation indirecte par le virus de l'hépatite C via, d'une part, l'engagement répété du BCR et, d'autre part, la formation d'un complexe CD19-CD21-CD81 par interaction entre CD81 et E2 *(Suarez et al.[122])*.

Certaines cytokines telles que BAFF, dont le rôle clé dans la survie des lymphocytes B transitionnels est clairement documenté[133], notamment via l'activation de la voie alterne de NF-κB, semblent également susceptibles d'intervenir dans la physiopathologie de la maladie. Une dérégulation de BAFF a ainsi été documentée dans l'infection par le virus de l'hépatite C[134,135]. Par ailleurs, les patients VHC positifs atteints de cryoglobulinémie et ayant développé un lymphome non-hodgkinien ont des taux sériques de BAFF significativement supérieurs à ceux des patients indemnes de pathologie tumorale.

Toujours en faveur d'un processus multi-étapes (infection virale par le VHC → cryoglobulinémie mixte → lymphome B), l'existence d'anomalies cytogénétiques particulières telles que le gain du bras long du chromosome 3 (+3q) ou une trisomie 3 ont été documentées dans les lymphomes de la zone marginale associés au VHC[136]. Une perte en 2q a, quant à elle, été décrite dans certains cas de lymphomes agressifs (B diffus à grandes cellules) associés au virus. De plus, alors que la réponse complète sur le plan virologique peut se traduire par une disparition du clone dans la cryoglobulinémie mixte, la persistance du clone tumoral dans la pathologie lymphomateuse est la règle, en accord avec l'idée que, malgré une dépendance à l'antigène, l'accumulation d'événements oncogéniques a permis l'autonomisation de certains sous-clones (voir figure 6)[112,124,137].

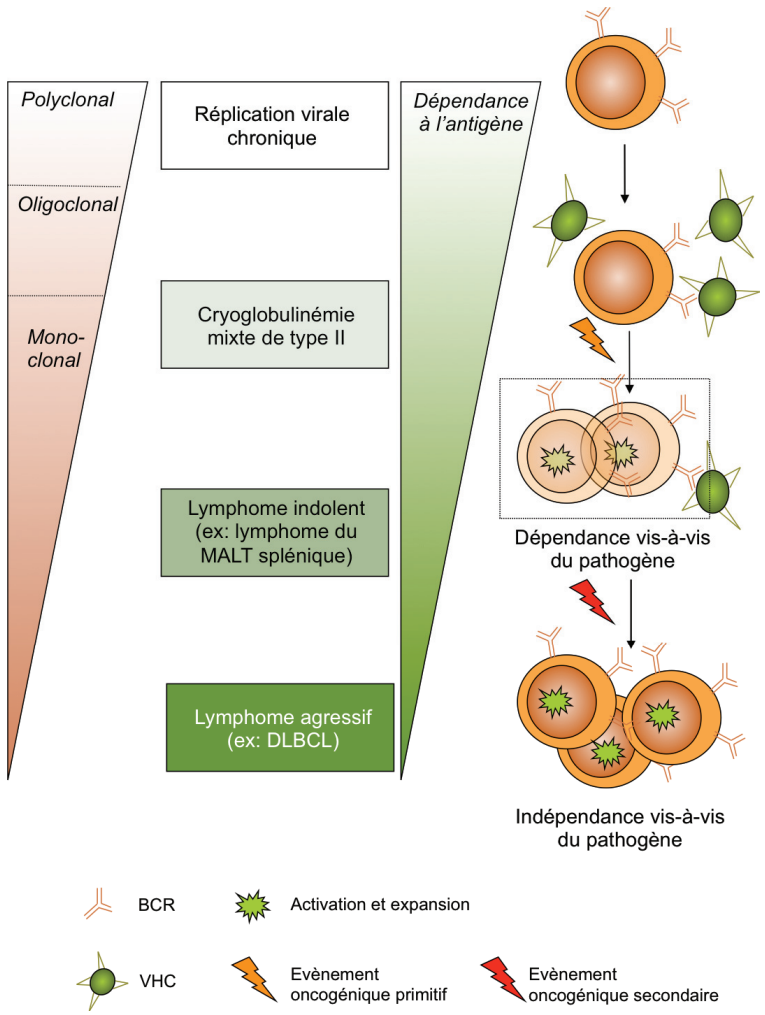


Figure 6. Modèle multi-étapes de transformation indirecte associée à l'infection chronique par le virus de l'hépatite C *(d'après Bachy et al.[115])*.

3.1.3. Lymphome cutané et infection à Borrelia burgdorferi

Le lien entre maladie de Lyme et lymphomagénèse est suspecté depuis près d'un siècle puisque les premiers cas décrivant l'association entre les manifestations cliniques de la maladie telles que la dermatite chronique atrophiante et certains lymphomes cutanés ont été décrits dès 1921. La découverte en 1982 de l'agent responsable de la maladie de Lyme par Burgdorfer[138], un spirochète baptisé par la suite *Borrelia burgdorferi* et transmis par les piqûres de tique, a conduit à reconsidérer la physiopathologie de ces lymphomes à la lumière du modèle de lymphomagénèse associée à l'infection par *H. pylori*. En effet, la plupart de ces lymphomes cutanés associés à la maladie de Lyme présentent les caractéristiques histologiques des lymphomes dérivés du MALT. Les premiers cas décrivant l'association lymphome cutané et infection à *Borrelia burgdorferi* datent de 1991. De façon notable, seul un des quatre patients décrits présentait une manifestation clinique de type acrodermatite chronique atrophiante permettant d'élargir l'association initiale faite entre manifestations cliniques de la maladie de Lyme et lymphome cutané à un concept plus large d'association entre infection chronique à *Borrelia* et lymphome. L'ADN du pathogène a pu être détecté dans 18 % (3/16) des cas de lymphomes B cutané de type MALT[139] dans une série en zone non endémique (la maladie de Lyme

est essentiellement rencontrée dans certaines zones endémiques d'Amérique du Nord ou d'Europe centrale) et également 18% (9/50) dans une autre série de patients atteints de lymphome B cutané primitif de sous-types histologiques divers : folliculaires, zone marginale ou diffus à grandes cellules[140]. Par ailleurs, certaines études ont rapporté récemment une association entre l'infection à *Borrelia burgdorferi* et des cas de lymphome du manteau et de *mycosis fongoïde*. Néanmoins, le faible taux de réponse de la pathologie tumorale après éradication du pathogène par traitement antibiotique[141] fait douter du réel lien physiopathologique sous-jacent. Une première approche par antibiothérapie, notamment par fluoroquinolone, dans les cas de lymphome cutané associé à *B. burgdorferi* avant l'administration d'une éventuelle radiothérapie ou d'un traitement cytoréducteur est cependant recommandée.

3.1.4. Lymphome des annexes oculaires et infection à Chlamydia psittaci

Une nouvelle fois, l'association épidémiologique entre certains lymphomes non-hodgkiniens et une sérologie positive à *Chlamydia species* décrite en 1998 sur une petite série cas-témoins par Anttila *et al.* (72 cas, OR=7,3 ; 95%=CI 2,2-25))[142] – inspirée elle-même d'une association décrite entre infection à *Chlamydia pneumoniae* et cancer du poumon[143] – va alimenter la réflexion sur ce possible nouveau modèle de lymphomagénèse en contexte d'infection chronique. Sans reprendre le détail des caractéristiques de ce type de lymphome superposable dans son ensemble au modèle de lymphomagénèse associé à *H. pylori*, certaines similarités mais aussi quelques spécificités méritent néanmoins d'être précisées. Le lymphome de type MALT est largement surreprésenté dans cette localisation (70%), suivi du type histologique folliculaire (20%) puis diffus à grandes cellules (10% environ). Contrairement aux lymphomes cutanés primitifs, l'association entre l'agent infectieux et le processus tumoral n'a été quasi-exclusivement décrite que pour le type histologique MALT. Les 2 études pivots concernant l'association évoquée ont été publiées par Ferreri *et al.*. La première décrit la présence d'ADN de *Chlamydia psittaci* dans 80% (32/40) des biopsies de lymphome du MALT des annexes oculaires de cette série (à noter qu'aucune positivité à *C. pneumoniae* ou *trachomatis* n'était retrouvée) contre 0% (0/20) dans les tissus orbitaires contrôles non-néoplasiques. De façon intéressante, l'ADN du pathogène était détecté, chez 43% (9/21 testés) des patients positifs au niveau oculaire, également au niveau des cellules mononuclées du sang périphérique, pouvant expliquer éventuellement les rechutes contro-latérales ou à distance. La seconde montrait comment l'éradication du pathogène (par 3 semaines de doxycycline) était associée chez 7 patients à 2 réponses complètes, 2 réponses partielles et 3 maladies stables.

D'un point de vue physiopathologique, la région V_H du gène des immunoglobulines est, comme pour les autres lymphomes du MALT supposés liés à une infection chronique, le plus souvent mutée et il existe un biais d'utilisation du répertoire VDJ. Les familles V_H3 (54% des cas) et V_H4 (27%) sont les plus fréquemment retrouvées[144]. L'analyse du taux de mutations « silent » *versus* « replacement » (S)/(R) dans les régions CDR et FR, comme détaillé précédemment pour le lymphome du MALT gastrique, témoigne également d'un rôle possible de la stimulation antigénique dans le processus de

lymphomagénèse de ces néoplasies des annexes oculaires, au moins dans 60% des cas[144]. Les familles V_H utilisées sont par ailleurs des familles fréquemment retrouvées dans des maladies autoimmunes (*DP-8 (VH1-69*06), DP-10 (VH1-69*01), DP-53 (VH3-74*01), DP-63 (VH4.21), DP-49 (VH3-30*18)*) : polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé ou maladie des agglutinines froides[145-147]. Il semble donc, comme pour le lymphome du MALT gastrique associé à *H. pylori,* que le stimulus antigénique conduisant à la lymphomagénèse B soit de nature autoantigénique ou cross-réactif entre des antigènes du soi et du pathogène, dans un contexte inflammatoire chronique généré par l'infection.

Les données sur l'association entre *C. psittaci* et lymphome du MALT des annexes oculaires restent, avec celles concernant *B. burgdorferi* et les lymphomes cutanés primitifs, relativement controversées. Plusieurs études n'ont effectivement pas confirmé les résultats précédents en terme d'association épidémiologique (notamment en France, en Allemagne et aux Etats-Unis où strictement aucune association, sur des séries cumulant au total près de 150 patients, n'a été retrouvée[148-154]), ont signalé potentiellement d'autres association avec *C. pneumoniae*[61,67] ou surtout avec *H. pylori*[150,155-158] (avec un éventuel mimétisme antigénique croisé entre des autoantigènes au niveau des annexes oculaires et certains déterminants antigéniques de *H. pylori* pouvant expliquer cette association à distance pour le moins inattendue)[149,155], voire avec le virus de l'hépatite C[159]. Il est avancé par les auteurs des 2 études princeps mentionnées précédemment que les techniques de détection par PCR sur ADN extrait de tissu fixé en formol et inclus en paraffine[160,161], de même qu'une fréquente antibiothérapie de courte durée souvent instaurée devant une symptomatologie de conjonctivite banale initiale et passée inaperçue, pourraient expliquer les contradictions apparentes des différentes études. Il reste que les données thérapeutiques concernant l'efficacité du traitement antibiotique par cyclines sont également moins convaincantes que celles obtenues après éradication de *H. pylori* dans le lymphome du MALT gastrique. Néanmoins, et contrairement à d'autres types de lymphomes dont l'étiologie est possiblement reliée à un agent infectieux (comme les IPSID et *C. jejuni* par exemple), *C. psittaci* est l'un des rares pathogènes (avec *H. pylori*) à avoir été isolé et cultivé *in vitro* à partir du tissu de biopsie tumorale des annexes oculaires.

Enfin, de façon anecdotique, des études de cas ont rapporté une possible association entre infection à *C. psittaci* et lymphome B diffus à grandes cellules de localisation amygdalienne ou cutanée.

3.2. Lymphome B diffus à grandes cellules et infection chronique à *H. pylori* ou HCV

Il existe essentiellement 2 types de lymphomes B diffus à grandes cellules rencontrés au niveau gastrique. Le premier est associé à un contingent de bas grade de type MALT détectable sur les coupes histologiques et est supposé dériver de la transformation en une forme histologique de haut grade du lymphome indolent. Le deuxième correspond à un lymphome B diffus à grandes cellules extra-nodal supposé *de novo*, c'est-à-dire présentant histologiquement les caractéristiques de ce type de lymphome de haut grade de malignité sans aucun contingent de bas grade associé sur un minimum de 10 biopsies endoscopiques de la lésion tumorale (critères du European GastroIntestinal Lymphoma Study Group

consensus (EGILS)[162]). La classification OMS ne fait pas de distinction entre ces 2 types de lymphomes, les regroupant sous la dénomination commune de lymphome B diffus à grandes cellules de localisation extra-nodal sans autre précision, basée essentiellement sur le fait que, d'un point de vue thérapeutique, la transformation histologique du lymphome du MALT gastrique associé à *H. pylori* signe son autonomisation vis-à-vis du pathogène et l'inefficacité du traitement antibiotique. Par ailleurs, malgré la multiplicité des biopsies, il est impossible d'éliminer formellement l'hypothèse d'une transformation à partir d'un contingent de bas grade dans le lymphome B diffus à grandes cellules gastrique dit *de novo*. Des données récentes semblent néanmoins remettre en question l'inefficacité du traitement antibiotique à la fois dans les cas de transformation à partir d'un lymphome du MALT mais aussi dans les cas *de novo* lorsqu'ils sont associés à *H. pylori*. En effet, plusieurs études ont montré au début des années 2000 que certains patients porteurs de lymphome du MALT gastrique transformé pouvaient être mis en réponse complète histologique de façon durable à l'aide d'un traitement antibiotique seul[163,164]. De façon superposable mais plus inattendue, plusieurs études ont montré des résultats similaires dans des cas de lymphomes B diffus à grandes cellules gastriques *de novo,* dont des travaux récents sur une cohorte rétrospective de 16 patients avec une réponse histologique complète dans 68% des cas après éradication d'*H. pylori* sans rechute après une médiane de suivi de 7,7 ans pour la cohorte[165]. Même s'il est impossible d'éliminer formellement un composant de bas grade de type MALT, il apparaît donc à la fois que les critères histologiques de grade de malignité ne rendent pas compte de la dépendance du clone tumoral au pathogène mais aussi qu'un traitement éradicateur doit être initié dans les formes histologiques de haut grade en cas d'infection à *H. pylori,* même sans contingent de bas grade visualisé. Il va de soi qu'une surveillance endoscopique rapprochée dans ce type de lymphome est indispensable afin d'envisager le plus rapidement possible une alternative par immuno-chimiothérapie en cas de non-réponse à l'antibiothérapie dans ces types histologiques agressifs.

De la même façon, l'association de certains lymphomes B diffus à grandes cellules avec le virus de l'hépatite C est documenté même si les caractéristiques clinico-biologiques de ces lymphomes et notamment le stade disséminé initial (contrairement au stade localisé extra-nodal IE/IIE usuel des lymphomes B diffus à grandes cellules gastrique associé à *H. pylori*) rend l'approche d'un traitement anti-infectieux initial non-associé à une immunochimiothérapie quasiment impossible. Qui plus est, et comme pour l'infection à *H. pylori*, l'association fréquente avec un contingent de bas grade de malignité (7/22 cas dans la série rapportée par Besson *et al*.[166]), de même que la localisation splénique fréquente, supportent l'hypothèse d'une transformation à partir d'un lymphome du MALT sous-jacent.

3.3. Leucémie lymphoïde chronique et lymphome du manteau : vers une extension du modèle ?

3.3.1. Leucémie lymphoïde chronique

La LLC est la leucémie de l'adulte la plus fréquente dans les pays occidentaux[167]. Elle est caractérisée par l'accumulation de petits lymphocytes d'apparence mature au niveau du sang, de la moelle osseuse, des ganglions lymphatiques et des autres tissus lymphoïdes. D'un point de vue immunophénotypique, les cellules expriment à leur surface une faible densité de BCR, le plus souvent sans commutation isotypique (IgM ou IgM/IgD), ainsi que plusieurs marqueurs pan-B non spécifiques (CD23, CD19, CD20 faible) et le CD5. L'expression des marqueurs FMC7, CD22 et CD79b est habituellement négative ou faible[168]. D'un point de vue physiopathologique, la séparation de la maladie en 2 groupes de caractéristiques et de pronostics différents, basée sur le statut mutationnel du gène des immunoglobulines (notamment la partie variable de la chaîne lourde usuellement séquencée –*IGVH*) et correspondant probablement à 2 mécanismes de lymphomagénèse distincts, a radicalement modifié la compréhension de la LLC[169-171]. Comme décrit précédemment une limite arbitraire à 98% (pourcentage d'homologie par rapport à la séquence germinale) a été établi pour déterminer le statut muté ou non des gènes codant pour les différents segments des immunoglobulines[172]. Il est maintenant clairement établi que les patients porteurs d'une LLC avec un statut mutationnel dit « non muté » ont un pronostic largement plus péjoratif. Une zone dite « grise », comprenant les patients dont le pourcentage d'homologie oscille entre 97 et 98%, définit une catégorie de malades ayant un pronostic intermédiaire. Les différences biologiques sont également majeures entre ces sous-groupes de LLC. Le taux d'expression de protéines adaptatrices clés de la voie du BCR que sont ZAP70 et SYK est étroitement corrélé au statut mutationnel et, par voie de conséquence, au pronostic (un niveau d'expression de ces 2 protéines élevé étant associé à un pronostic péjoratif). Les cellules de LLC ayant une région *IGHV* mutée se caractérisent par une faible signalisation en aval de la voie du BCR et une relative anergie. Il existe également des différences de structure du BCR entre ces 2 sous-types de la maladie. En effet, la présence de réarrangements V(D)J dits stéréotypés est largement surreprésentée dans les LLC dites non mutées[173-175]. On parle de stéréotypie lorsque plusieurs BCR, utilisant le plus souvent les mêmes chaînes variables V lourdes et légères (IGHV1-69 et IGHV3-21 notamment), partagent une région CDR3 structurellement très proche caractérisée par une longueur similaire ou une composition de certains acides aminés très proche, notamment au niveau des jonctions V-J ou V-D). Ainsi, plus de 20% des LLC portent un BCR stéréotypé (et près de 1% portent un BCR quasiment identique, bien au-delà de la probabilité purement combinatoire de rencontrer 2 BCR identiques qui avoisine $1/10^6$)[176]. Le degré d'homologie des BCR exprimés par les cellules de LLC de différents patients est clairement évocateur d'antigènes particuliers restreints et communs reconnus par ces récepteurs et suggère tout aussi clairement que la LLC est une maladie « drivée » par l'antigène (c'est-à-dire qu'il existe une sélection particulière de certains clones au cours de leur développement par quelques épitopes antigéniques)[177]. Dans le cas des LLC non mutées, il a été démontré que le BCR est polyréactif (comme dans le cas des lymphomes du MALT) et reconnaît notamment une variété

d'autoantigènes protéiques ou lipidiques générés, par exemple, dans un contexte de stress oxydatif. Dans le cas des LLC mutées, le BCR est globalement plus sélectif, oligo- ou monoréactif et la stéréotypie est moins fréquente. Néanmoins lorsque la séquence « germinale » correspondante est déterminée, ces BCR s'avèrent tout aussi polyréactifs, suggérant que les 2 formes de LLC pourraient émerger d'un stade de développement commun avec une évolution ultérieure divergente[178].

La contrepartie cellulaire normale dans la LLC reste débattue. Initialement, l'hypothèse que les cellules tumorales dérivent de la transformation de lymphocytes B $CD5^+$ s'est imposée en raison de l'expression quasi-systématique de ce marqueur dans la maladie. De plus, chez l'animal, il a été démontré que certaines souches de souris qui accumulent cette population de lymphocytes B $CD5^+$ en vieillissant développent régulièrement une pathologie proche de la LLC[179]. Néanmoins, il n'existe pas de stricte correspondance entre les cellules B murines $CD5^+$ (dites B1a) impliquées notamment dans la réponse thymo-indépendante et exprimant un répertoire autoréactif, et la population B $CD5^+$ humaine[180]. Ainsi, la plupart des cellules B $CD5^+$ humaines ne répondent pas aux antigènes thymo-indépendants, expriment rarement un BCR autoréactif et ne sont pas mutées (alors que près de 50% des LLC le sont)[181]. Deux contreparties cellulaires normales, l'une pour les LLC mutées et l'autres pour les LLC non mutées ont été proposées. La première entité pourrait correspondre aux cellules $IgM^{+I}gD^+CD27^+$ décrites par l'équipe de JC Weill comme des lymphocytes B naïfs de la zone marginale splénique, dont l'importance dans la réponse thymo-indépendante est clairement établie. L'un des écueil dans ce model est que ces cellules de LLC sont mutées alors qu'AID n'est pas exprimée dans les cellules B de la zone marginale splénique{Willenbrock, 2005 #1098}. Néanmoins l'équipe de JC Weill a montré que les cellules circulantes $IgM^+IgD^+CD27^+$ pourraient utiliser le processus d'hypermutations au cours de leur développement pour la (pré-)diversification de leur répertoire comme le font les lymphocytes B de la plaque de Peyer chez le mouton[182]. Bien que cette population impliquée dans une réponse thymo-indépendante puisse correspondre à la contrepartie cellulaire normale des LLC mutées, il existe, à l'heure actuelle, plus d'arguments en faveur d'une transformation de cellules post-centre germinatif, somatiquement mutées mais non-switchées, $IgM^+IgD^+CD27^+$ mémoires. En effet, les rares cas de LLC « switchées » expriment une IgG1 ou une IgG3, et non une IgG2 connue pour signer les réponses Ac thymo-dépendantes. De plus, en terme de profil d'expression génique, les cellules mutées de LLC présentent une plus grande proximité avec des cellules B à mémoire qu'avec des lymphocytes B naïfs ou $CD5^+$. Qui plus est, ce sous-type muté de LLC présente souvent des mutations du gène BCL6, dont l'expression est induite lors de la réaction du centre germinatif[183]. Or, l'introduction sur un mode « bystander » de mutations somatiques cible les gènes transcrits de façon concomitante lors de l'expression de la protéine AID, laissant supposer que le processus de transformation a été initié dans les centres germinatifs[184]. De façon intrigante, les LLC non mutées présentent aussi un profil d'expression génique proche de cellules à mémoires post-centre germinatif[25]. Il a été démontré que le passage du lymphocyte B au sein du centre germinatif n'est pas systématiquement associé à l'acquisition d'un statut muté, notamment lorsque ce même lymphocyte porte à sa surface un BCR autoréactif[185]. Il est en fait supposé que ce type de LLC non mutée pourrait

émerger à la fois d'une population autoréactive en réponse à une stimulation thymo-indépendante, mais aussi d'une population ayant débuté la réaction du centre germinatif en réponse à un antigène thymo-dépendant avec un arrêt précoce en raison de cette même autoréactivité[186,187]. La présence d'événements oncogéniques précoces permettrait d'outrepasser la délétion par apoptose qui est le sort habituel des clones B acquérant de novo une autoréactivité dans les centres germinatifs suite au processus d'hypermutations somatiques. Au final, même si la contrepartie cellulaire normale exacte du clone tumoral dans les LLC mutées ou non mutée reste débattue, il existe un consensus sur le fait qu'il s'agit dans les 2 cas de lymphocytes B ayant rencontré l'antigène. L'expression du CD25 et la sécrétion d'IL-10 par certains clones de LLC font actuellement évoquer à certains la possibilité que la contrepartie cellulaire normale serait un lymphocyte B régulateur[188].

Même si l'autoréactivité de la plupart des Igs portées à la surface des clones de LLC fait peu de doute, plusieurs études ont souligné le rôle éventuel d'un mimétisme croisé avec certains antigènes bactériens, notamment dans les rares formes de LLC portant une Ig switchée (non-IgM). Ainsi Ghiotto *et al.* ont montré, en étudiant 25 cas de LLC non-IgM, que 5 cas IgG présentaient une stéréotypie remarquable (même segments pour les chaînes lourde et légère variables et mêmes motifs CDR3)[189]. Le screening à partir de banques de données publiques révèle une similitude possible avec des Igs fixant soit des autoanticorps soit des carbohydrates de capsule bactérienne telle que celle de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* ou *Haemophilus influenzae* type b. Ainsi, contrairement à la nature polyréactive de certains clone, ces 5 cas de LLC non-IgM semblent reconnaître de façon particulière un autoantigène particulier et de façon croisée un carbohydrate bactérien (responsable peut-être de la rupture de tolérance vis-à-vis de cet autoantigène)[189]. Il est d'ailleurs intéressant de noter que certains autoanticorps peuvent réagir avec des carbohydrates et générer une protection efficace contre des bactéries encapsulées[190,191], et qu'inversement la modification de quelques acides aminés au niveau de la région variable peut convertir des anticorps anti-pneumococciques en anticorps anti-dsDNA (anticorps anti-ADN double brin)[192].

Une autre étude publiée dans Blood en 2008 a confirmé ces données en montrant la reconnaissance, par l'Ig de certains clones de LLC, d'antigènes tels que la phosphorylcholine retrouvée dans les polysaccharides de *Streptococcus pneumoniae* mais dans certains LDL oxydés (low-density lipoprotein)[193].

Enfin, il a été démontré un lien d'association significatif entre des épisodes répétés d'infection respiratoire (donc potentiellement liées au pneumocoque) et le développement ultérieur d'une LLC, même si l'hypothèse inverse d'une immunodépression sous-jacente précédant le diagnostic ne peut être écartée[194].

3.3.2. Lymphome du manteau

La plupart des études portant sur l'analyse du BCR dans les lymphomes à cellules du manteau (LCM) ont montré, pour la majorité des cas, une absence de mutation de la région variable de la chaîne lourde des immunoglobulines (*IGHV*) ou de rares mutations ne passant pas sous la barre des 98%

d'homologie avec la séquence germinale, seuil requis pour parler d'un statut muté. La contrepartie cellulaire normale est donc supposée être un lymphocyte B naïf et a été considérée comme telle dans la classification OMS 2008 des pathologies lymphoïdes[195,196]. Néanmoins, toutes les études ont rapporté dans une proportion variable (16 à 38% des cas) des cas de LCM ayant un statut muté[197-201].

Une étude récente portant sur l'analyse du gène *IGHV* et le statut mutationnel de 807 cas de LCM a révélé un biais en faveur de l'expression de certaines familles, les gènes *IGHV3-21*, *IGHV4-34*, *IGHV1-8* et *IGHV3-23* représentant 46,3% de la cohorte[202]. L'utilisation d'un BCR stéréotypé a été mise en évidence dans cette étude dans 10,4% des cas et un statut muté dans 23%. Les stéréotypies, familles préférentielles utilisées et remplacements nucléotidiques liés au processus d'hypermutation somatique étaient différents de ceux retrouvés dans la LLC, signant des caractéristiques propres au LCM. Surtout, pour une part non négligeable de cas, cette étude remet en question la nature pré-centre germinatif de certains lymphomes à cellules du manteau[202].

4. Lymphomagénèse T et infection chronique : quels exemples ?

Bien que nettement moins évoqué dans la littérature, le lien potentiel entre infection chronique et/ou stimulation antigénique chronique et lymphomagénèse de type T sera abondamment détaillé dans cette partie introductive du travail de thèse puisque le modèle murin établi dans le laboratoire nous est apparu comme un probable modèle de lymphomagénèse T dans ce contexte. En effet, alors que le modèle initial p53 déficient chroniquement injecté par une souche inactivé de pneumocoque -partie « résultats » de ce travail- a été initialement pensé pour développer des lymphomes B matures, notamment de type zone marginale (puisque les souris p53 KO sont décrites comme développant de façon « spontanée » un certain nombre de lymphomes de ce type), nous avons observé une surincidence de lymphomes T périphériques matures dont le phénotype et les caractéristiques sont évocateurs de rencontres répétées avec l'antigène[a]. A la lecture de la littérature sur le sujet et comme nous allons le voir, il apparaît néanmoins tout à fait légitime d'attribuer une part substantielle de la lymphomagénèse T à une possible stimulation antigénique chronique, notamment infectieuse mais pas seulement, même si la faible incidence des lymphomes T dans leur ensemble et le modèle archétypal du lymphome du MALT dans la tumorigénèse B ont plus ou moins éclipsé un tel mécanisme physiopathologique pour la tumorigénèse T. Le modèle de la leucémie à grands lymphocytes granuleux T sera en particulier largement détaillé puisque nous avons actuellement axé notre démarche translationnelle du modèle murin vers la pathologie humaine sur cette pathologie.[b]

Nous traitons ici, comme pour la lymphomagénèse B, des hypothèses de transformation indirecte par stimulation antigénique chronique et non des hypothèses de transformation directe. Le cas de l'ATLL associée au virus HTLV ne sera donc pas abordé.

4.1. Leucémie T à grands lymphocytes granuleux (T-LGL)

4.1.1. Caractéristiques clinico-biologiques

La leucémie LGL a été initialement décrite en 1985 comme une lymphoprolifération clonale avec envahissement systémique, notamment médullaire, splénique et hépatique[203]. La délimitation exacte de la pathologie n'est cependant pas évidente au sens où il existe un *continuum* entre proliférations de type LGL (englobant des situations de proliférations réactionnelles, notamment infectieuses ou autoimmunes) et véritables leucémies à LGL. Même si les lymphoprolifération à LGL apparaissent comme un précurseur logique des leucémies à LGL, il existe cependant tout un éventail de situations où cette lymphoprolifération est transitoire et spontanément résolutive. De façon intéressante, certains auteurs ont évoqué le concept de « lymphocytose monoclonale T de signification indéterminée »[204] à la manière dont la gammapathie monoclonale de signification indéterminée potentiellement associée à la progression vers le myélome a déjà été élargie à la lymphocytose monoclonale B de signification indéterminée apparaissant comme un état pré-néoplasique antérieur à la LLC. La maladie est

[a] Ces lymphomes se sont par la suite avérés de type NKT invariant.

[b] L'identification de la nature NKT de nos lymphomes murins nous fait actuellement pencher plus en faveur du syndrome de Sézary comme équivalent humain du modèle animal même si nous poursuivons la recherche d'une inactivation de la voie p53 dans la leucémie T-LGL.

essentiellement retrouvée chez le sujet âgé (médiane de 60 ans au diagnostic). Cliniquement, les manifestations initiales de la maladie sont une splénomégalie dans 25 à 50% des cas, rarement associée à une hépato- et/ou des adénomégalies[205]. L'association à une polyarthrite rhumatoïde, précédant le plus souvent la leucémie à LGL, est fréquente, de l'ordre de 11 à 36% des cas. L'ensemble des pathologies autoimmunes observées dans les leucémies T-LGL est résumé dans le tableau 4. Biologiquement, une neutropénie est observée dans 15 à 56% des séries, fréquemment associée à des épisodes infectieux, la plupart du temps respiratoires ou cutanéomuqueux, faisant la gravité de la maladie. Dans une série française de 229 cas, des stigmates d'autoimmunité tels que des anticorps anti-nucléaires ou un facteur rhumatoïde sont observés dans 40 à 60% des cas, de même que la présence d'une hypergammaglobulinémie ou d'une gammapathie monoclonale dans 38 et 15% des cas respectivement[206].

PATHOLOGIE AUTOIMMUNE	FREQUENCE (%)
Maladie autoimmune	**15-40**
Polyarthrite rhumatoïde	11-36
Syndrome de Sjogrën	Etude de cas
Polymyosite	Etude de cas
Pseudo-polyarthrite rhizomélique	Etude de cas
Multinévrite	Etude de cas
Vascularite	Etude de cas
Endocrinopathie	Etude de cas
Maladie coeliaque	Etude de cas
Maladie inflammatoire chronique de l'intestin	Etude de cas
APECED	Etude de cas
Cytopénie autoimmune	**5-10**
Erythroblastopénie	5
Anémie hémolytique autoimmune	<2
Purpura thrombopénique idiopathique	Rare

Tableau 4. Liste non-exhaustive des pathologies autoimmunes associées aux leucémies T-LGL *(d'après Lamy et al.[207]).*

4.1.2. Critères diagnostiques

Le diagnostic de la leucémie à LGL de type T (par opposition à la leucémie LGL de type NK qui ne sera pas discutée ici) repose sur la mise en évidence de lymphocytes caractéristiques à la fois d'un point de vue morphologique mais aussi immunophénotypique. Les grands lymphocytes granuleux sont de grande taille (15 à 18 µm, voir figure 7) contenant des granulations azurophiles typiques associées à un noyau rond ou réniforme. Alors qu'un taux de LGL supérieur à 4 G/L était anciennement requis pour parler de leucémie T-LGL, les techniques d'immunophénotypage par cytométrie en flux montrent actuellement que le diagnostic peut être posé à des seuils nettement plus bas (>0.5 G/L), d'autant plus aisément qu'il existe une symptomatologie clinique associée évocatrice (splénomégalie, cytopénie, maladie autoimmune…).

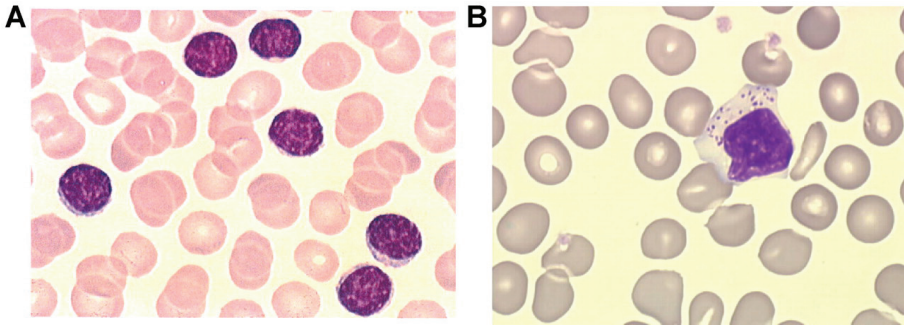


Figure 7. Frottis sanguins montrant des petits lymphocytes matures (A) ou des grands lymphocytes à grains (B) *(d'après Lamy et al.[207])*.

Le phénotype des leucémies T-LGL est relativement homogène, caractéristique –si l'on suppose une persistance des marqueurs phénotypiques de la cellule tumorale vis-à-vis de sa contrepartie cellulaire normale- d'une lymphoprolifération issue d'un lymphocyte T $CD3^+TCR\beta^+$ $CD62L^{low}CD45RA^+$ mémoire activé, essentiellement de phénotype $CD8^+$ (même si certaines leucémies T-LGL $CD4^+/CD8^{-/dim}$ ou certains clones γδ (<10% des cas) sont décrits). L'expression de marqueurs tels que le CD57 ou la perte du CD28 ont ainsi amené à considérer ces lymphocytes T CD8 comme différenciés de façon terminale, chroniquement stimulés, voire sénescents ou «exhausted »[208]. Contrairement à des lymphocytes T cytotoxiques normaux activés, les T-LGL tumoraux expriment certains marqueurs NK tels que le CD16 (80% des cas), le CD57 (100% des cas) déjà évoqué, le CD94, ou d'autres récepteurs de la famille des KIRs (Killer Immunoglobulin-like Receptors) tels que le CD158a, b ou c[209]. Les T-LGL sont $CD122^+$ (chaîne α du récepteur à l'IL-15 et ß à l'IL-2) mais $CD25^-$ (chaîne α du récepteur à l'IL-2). Les granulations observées en cytologie correspondent à des granules cytotoxiques $granzymeB^+$ ou $perforine^+$ qui peuvent être mis en évidence par marquage intracellulaire. L'expression de certains marqueurs est souvent aberrante avec une down-régulation du CD5 usuelle, mais aussi du CD7, du CD3 et/ou du CD2. Une up-régulation aberrante du CD5 et/ou du CD7 a aussi été rencontrée[210-212].

L'analyse de clonalité aujourd'hui réalisée par PCR fait le diagnostic de leucémie à T-LGL, notamment par l'analyse du réarrangement du gène *TCRG* (codant pour la chaîne γ du TCR réarrangée à la fois dans les LGL de type T γδ mais aussi αβ)[213] *versus* celui de simple lymphoprolifération T-LGL. La démonstration de la clonalité peut éventuellement se faire par l'analyse en cytométrie de flux de la restriction mono- ou oligoclonale d'utilisation de la chaîne légère Vß même si le panel d'anticorps utilisé ne couvre que 75% environ des familles utilisées. La délimitation nosographique des cas frontières chez les sujets âgés présentant une expansion LGL modérée mono- ou oligoclonale reste difficile et est une situation fréquemment rencontrée en pratique. Bien que la limite de 0,5 G/L de LGL à la numération puisse sembler arbitraire, elle permet cependant une délimitation formelle similaire à celle rencontrée dans les cas de lymphocytose ou de gammapathie monoclonale dite bénigne ou de signification indéterminée.

4.1.3. Hypothèses physiopathologiques

Bien que la contrepartie cellulaire normale n'a pu être formellement établie dans les leucémies T-LGL, le phénotype T effecteur mémoire (T_{EM}) $CD45RA^{+}CD62L^{low}$ de la prolifération tumorale laisse supposer qu'une stimulation antigénique chronique pourrait être impliquée dans le processus[214]. D'autres éléments qui seront détaillés par la suite sont en faveur du rôle d'une potentielle stimulation antigénique, comme le biais de répertoire rapporté par certaines études, quoique controversé, ou l'efficacité d'un traitement par cyclosporine dans cette pathologie -évoquant une dépendance du clone tumoral quant à la voie de signalisation du TCR. Par ailleurs, l'émergence de clones T-LGL dans un contexte de pathologie autoimmune telle qu'une polyarthrite rhumatoïde, un lupus érythémateux aigu dissséminé ou une thyroïdite de Hashimoto ont suggéré le rôle d'une stimulation antigénique par des autoantigènes dans la physiopathologie de la maladie[205,215].

Des données contradictoires quant à l'existence d'un biais d'utilisation du répertoire Vß par les cellules T-LGL ont été retrouvées dans la littérature. Alors que certaines études ont montré l'existence d'une utilisation préférentielle des familles Vß2 et Vß3[216] voire Vß13.1[217] ou encore Vß6 (dans un contexte d'association à la polyarthrite rhumatoïde)[218], d'autres n'ont pas retrouvé un tel biais, montrant notamment que les familles principalement exprimées dans les T-LGL étaient celles utilisées majoritairement dans la population contrôle analysée[219,220].

Permettant une analyse plus fine du site de reconnaissance antigénique, l'analyse clonotypique (par séquençage de la région CDR3) apporte de précieuses informations. En effet, d'un point de vue théorique, l'homologie clonotypique suggère que les différents clones tumoraux ont pu être générés en réponse à un même antigène (du soi ou du non-soi) jouant probablement un rôle étiopathogénique dans la maladie. En revanche, la restriction d'un clonotype à quelques patients seulement évoque soit une restriction HLA-médiée soit l'existence d'une stimulation par plusieurs antigènes (d'un même pathogène sans immunodominance particulière par exemple) de façon propre à chaque patient. L'absence de motif particulier de la région CDR3 évoque quant à elle un processus sporadique écartant *a priori* l'hypothèse d'une médiation de la transformation par une stimulation antigénique, ou du moins l'hypothèse d'une stimulation par un antigène commun.

En ce qui concerne les leucémies à T-LGL, l'analyse clonotypique précise de 28 clones chez 25 patients a montré que si la séquence précise était rarement retrouvée entre patients ou chez des sujets contrôles, il existait un fort degré d'homologie[220]. Une des explications séduisantes pour expliquer cette homologie à la fois entre patients et entre patients et contrôles serait, comme expliqué dans le paragraphe précédent, l'existence d'un déterminant antigénique commun répandu dans la population (viral ou bactérien par exemple) combinée à une réponse dérégulée chez les patients développant une leucémie T-LGL. A l'origine de cette dérégulation, on peut imaginer l'existence de polymorphismes ou l'émergence de mutations somatiques survenant dans des gènes impliqués dans l'apoptose des lymphocytes T activés comme nous le préciserons ultérieurement. Néanmoins, comme pour l'éventuel restriction d'expression Vß, l'homologie de la région CDR3 peut correspondre seulement à la présence d'un clone dominant contenu dans la population normale qui, de par sa seule sur-

représentation, a plus de chance de donner naissance au clone transformé, sans pour autant jouer un rôle direct dans la tumorigénèse. Néanmoins, une autre étude publiée par la même équipe ultérieurement et étudiant les clonotypes de 56 patients porteurs de T-LGL a montré que chez certains patients présentant plusieurs clones, il existait des similarités entre la région CDR3 du clone dominant et du clone co-dominant de même qu'avec les autres populations T polyclonales résiduelles (qualifiées de « supporting » clonotypes) suggérant plus clairement un biais global du répertoire T vers un déterminant antigénique rendant peu probable l'hypothèse d'une émergence stochastique d'un clone[221]. Enfin, une autre étude a montré que dans un sous-type particulier $CD4^+$ de T-LGL, parmi 15 patients exprimant le TCR-Vß13.1, tous étaient HLA-DRB1*0701 (P=0.004 par comparaison avec 21 patients non-TCR Vß13.1). A ceci peut s'ajouter chez ces patients une région CDR3 de faible longueur présentant de fortes homologies, l'utilisation préférentielle de la région « joining » Jß1.1 et l'utilisation d'une séquence peptidique consensus aux niveaux des jonctions 3'-Vß et 5'-Jß[222].

Jusqu'à présent, aucun antigène particulier et unique n'a pas pu être identifié comme étant spécifiquement reconnu par le TCR des clones T-LGL. Il apparaît d'ailleurs peu probable qu'un déterminant antigénique unique (auto-antigène ou peptide immunodominant d'un pathogène) soit impliqué dans la physiopathologie de la maladie au regard de l'hétérogénéité retrouvée des régions CDR3, et ce malgré leur degré d'homologie. En revanche, des travaux semblent avoir identifié certains antigènes ou peptides viraux comme probablement reconnus par certains clones T-LGL. Bien que concernant des patients atteints d'une forme différente de LGL appelée NK-LGL (prolifération clonale de lymphocytes NK), la première étude montrant une association entre ce type de pathologie et un antigène commun possible a été publiée par Loughran *et al.* en 1997 et montre la séroréactivité de 11 patients sur 15 (soit 73%) pour la protéine d'enveloppe p21E (épitope BA21) du virus HTLV, sans pour autant d'infection par le virus (contre 13% dans un panel de donneurs sains et 23% dans un groupe de patients HBV positifs). Ces travaux suggèrent pour la première fois une réactivité croisée potentielle, avec un autre virus que HTLV non identifié par exemple, des clones LGL même si la nature NK exclut ici la possibilité d'une transformation TCR-spécifique. Ultérieurement, les mêmes auteurs ont montré en 2005 que 30% des sérums de patients atteints de T-LGL étaient réactifs contre p21E, et plus particulièrement le décapeptide 417-426 de la protéine, contre 10% de la population saine contrôle. Des travaux plus récents ont démontré la prolifération et/ou la sécrétion de cytokines telles que l'IFN-γ ou le TNFα par des clones particuliers de T-LGL $CD4^+$ en réponse à des lysats totaux de CMV puis d'un peptide spécifique du virus (chez 4 patients porteurs d'un HLADRB1*0701 capable de présenter le peptide) démontrant pour la première fois une spécificité du TCR de clones T-LGL à un antigène donné[223].

Si l'hypothèse d'une stimulation antigénique chronique semble donc expliquer l'émergence de clones particuliers, initialement dans un profil poly- puis oligoclonal, elle ne suffit pas à rendre compte de l'évolution vers une monoclonalité définissant le stade leucémique de la pathologie à T-LGL. Afin d'expliquer l'émergence d'un tel clone majoritaire, il est aujourd'hui clairement démontré qu'il existe une résistance augmentée à l'apoptose, notamment médiée par la voie FasL-Fas. Des analyses de

microarrays ont montré l'existence d'une signature unique retrouvée dans les leucémies à LGL, caractérisée par une dissociation entre fonctions effectrices et mise en œuvre d'un programme pro-apoptotique caractéristique de l'AICD (activation-induced cell-death)[224]. En effet, la leucémie à LGL semble caractérisée d'un côté par l'acquisition de marqueurs d'activation -comparativement à des lymphocytes T naïfs- et de l'autre par une répression/extinction de gènes pro-apoptotiques et une induction/surexpression de gènes anti-apoptotiques -comparativement à des cellules T normales activées.

Un certain nombre de voies de signalisation sont dérégulées dans les LGL, dont un résumé est présenté dans le tableau 5, notamment les voies Ras-Mek-Erk, PI3K-Akt, NF-κB ou la voie des sphingolipides. Contrairement à la voie Fas-FasL dont le rôle prépondérant sera développé au paragraphe suivant, ces différentes voies de signalisation ne seront pas abordées ici pour 2 raisons. La première est que les différentes interventions thérapeutiques sur ces diverses voies de signalisation permettent, dans la majorité des cas, avant tout de restaurer la sensibilité à la mort induite par Fas, confirmant le rôle fondamental de cette dernière. La deuxième est que l'ensemble de ces perturbations des différentes voies de signalisation provient vraisemblablement du microenvironnement tumoral et non d'anomalies intrinsèques. En effet, l'ensemble de ces perturbation peut être modélisé par la combinaison de 3 signaux exogènes à la cellule[225] : la présence d'IL-15, de PDGF et un engagement du TCR qui ont été validés expérimentalement et chez des patients (au moins pour l'IL-15)[226].

ETUDE	VOIE DEREGULEE
Epling-Burnette *et al.*[227] Epling-Burnette *et al.*[228]	Ras-Mek-Erk
Schade *et al.*[229] Zhang *et al.*[225]	PI3K-Akt
Zhang *et al.*[225]	NF-κB
Epling-Burnette *et al.*[230]	JAK-STAT
Shah *et al.*[224]	Sphingolipides
Zhang *et al.*[225]	PDGF

Tableau 5. Résumé des principales voies de signalisation dérégulées dans la leucémie à LGL (*d'après Shah et al.*[231])

Tout comme les lymphocytes activés, les T-LGL leucémiques expriment fortement à leur surface le récepteur Fas et son ligand FasL. Néanmoins, alors qu'une telle coexpression devrait logiquement entraîner leur mort apoptotique par AICD, les clones T-LGL semblent résistants à une telle apoptose Fas-FasL médiée. Ceci suggère que, soit les LGL sont déficients pour l'une des composantes de cette voie, soit que d'autres signaux (inhibiteurs de la voie Fas par exemple) sont en jeu. Certaines similarités entre les LGL et le syndrome dit ALPS (Autoimmune LymphoProliferative Syndrome dû à des mutations inactivatrices de Fas ou de FasL) chez l'homme existent : a) comme l'accumulation de lymphocytes T double négatifs $CD4^-CD8^-$ (phénotype parfois rencontré dans les LGL), b) la présence d'une hépatosplénomégalie ou c) l'association à certaines pathologies autoimmunes (bien que, dans le cas des LGL, elles semblent précéder l'expression clinique de la maladie alors que dans le cas de

l'ALPS elles apparaissent vraisemblablement secondairement). Néanmoins, il existe rarement de lymphadénopathies (caractéristiques des ALPS) dans les LGL, de même que la présence d'expansions clonales $CD8^+$ majoritaires dans les LGL ne sont pas retrouvées dans les ALPS. Surtout, il n'existe pas de mutation de Fas ou de FasL documentée à ce jour dans les LGL. Par ailleurs, l'adjonction d'IL-2 *in vitro* à des cultures de clones T-LGL permet de restaurer la sensibilité à l'apoptose médiée par un anticorps anti-Fas, preuve que la voie de signalisation reste intacte, ou tout du moins fonctionnelle. Plusieurs explications sont proposées pour expliquer ce déficit fonctionnel de la voie Fas. La première est la présence en quantité importante dans le sérum de patients LGL de Fas soluble (sFas) qui est suspecté de bloquer la liaison entre FasL et son récepteur membranaire Fas-FasL normale. Ce sFas est lui-même sécrété par le clone tumoral et semble correspondre à une forme épissée alternative de Fas qui, exprimée en quantité anormalement élevée, est alors sécrétée en extra-cellulaire. De la même façon, une sécrétion anormale de sFasL est observée. Elle correspond soit à une forme directement sécrétée par le clone tumorale soit à une forme résultant du clivage de FasL membranaire par des métalloprotéinases de la matrice extra-cellulaire. Il est paradoxal que les clones LGL exprimant eux-aussi fortement Fas semblent si peu sensibles aux taux élevés de FasL solubles présents dans le sérum des patients atteints de LGL. Toutefois, le défaut d'apoptose des LGL en réponse à l'agrégation des récepteurs Fas *in vitro* par un anti-Fas témoigne d'un défaut intracellulaire de la voie Fas-FasL dans ces cellules. Il a ainsi était démontré un défaut de formation du DISC (Death-Inducing Signaling Complex) en aval direct de la signalisation de la voie Fas, en raison notamment d'un taux basal anormalement élevé de FLIP (FADD-like IL-1 converting enzyme (FLICE)-inhibitory protein) cellulaire (cFLIP), un inhibiteur proximal de la voie Fas. c-FLIP contient en effet, comme les caspases initiatrices, un domaine d'association à FADD, permettant son recrutement dans le DISC mais ne possède pas de capacité protéolytique comme la caspase-8 avec laquelle elle rentre donc en compétition pour la médiation de l'apoptose Fas-dépendante. FLIP est régulé négativement par l'IL-2, expliquant la capacité de l'IL-2 à restaurer la sensibilité des T-LGL à l'apoptose induite par des anticorps anti-Fas{Yang, 2007 #35}.

4.2. Autres lymphomes T

4.2.1. Lymphomes T cutanés (mycosis fongoïde et syndrome de Sézary)

Parmi les autres types de lymphomes T, l'hypothèse d'une association entre lymphomagénèse et infection chronique non directement « transformante » est rarement avancée dans la littérature, tout au moins de prime abord. Néanmoins, pour certains sous-types histologiques et/ou certains tropismes particuliers de lymphomes T, l'hypothèse d'une stimulation antigénique chronique par un pathogène particulier semble se dessiner.

Bien que l'hypothèse soit controversée, c'est notamment le cas pour le *mycosis fongoïde*, type de lymphome T cutané le plus fréquemment observé. En effet, le phénotype T helper $CD4^+$ mémoire de ces lymphomes ($CD3^+CD4^+CD8^-CD45R0^+$) suggère que la contrepartie cellulaire du clone tumoral serait un lymphocyte T ayant rencontré l'antigène[232]. L'hypothèse du rôle d'une infection chronique,

viral ou bactérienne, dans le *mycosis fongoïde*, notamment à la vue de la physiopathologie des lymphomes B de type MALT, a été suggérée dans la littérature de façon répétée. Le rôle potentiel de la bactérie *Borrelia burgdorferi* dans les lymphomes B cutanés, notamment de type MALT, a conduit un groupe du Nord de l'Italie, où la maladie de Lyme associée au pathogène est endémique, à examiner son implication potentielle dans ce type de lymphome T[233]. Par une technique de PCR génomique amplifiant une région du gène de la flagelline de *Borrelia burgdorferi*, ils ont mis en évidence à partir de tissus inclus en paraffine la présence vraisemblable du pathogène dans 18,1% (15/83) des cas de *mycosis fongoïde* contre 0% (0/83) dans un groupe contrôle apparié sur le sexe et l'âge. Comme précisé initialement, ces données restent néanmoins controversées. La raison essentielle en est que, malgré la fréquence de ce type histologique au sein des néoplasies T primitives de la peau, il n'en reste pas moins une entité rare, tout comme la plupart des autres lymphomes T, rendant les études souvent caduques par le faible nombre de patients inclus et leur caractère rétrospectif habituel. Ainsi, d'autres études ont quant à elles suggéré le rôle de certains virus comme HTLV-1 (par southern blot et PCR sur CMN sanguines)[234], EBV (par immunofluorescence et DNA/RNA *in situ hybridization*)[235], voire CMV (par évaluation sérologique)[236], la plupart n'ayant cependant pas été confirmées[237,238]. Dans d'autres travaux, l'hypothèse d'une stimulation par un autre agent bactérien que *Borrelia burgdorferi* a été avancée, comme par exemple *Staphylococcus aureus*. Trente deux patients porteurs de lymphome T cutané étaient positifs sur 42 pour *Staphylococcus spp* dont 16 à *S. aureus* -tous des syndrome de Sezary ou des *mycosis fongoïde*- et 6 sur les 16 étaient porteurs d'un *S. aureus* TSST-1+ associé à un biais de répertoire Vß2 attendu pour ce superantigène[239]. L'hypothèse d'un rôle de *Chlamydia spp* a aussi été évoqué, notamment C. *pneumoniae* (5 cas sur 5 testés par PCR et la démonstration que *C. pneumoniae* peut infecter des kératinocytes, fournissant alors potentiellement un réservoir de stimulation pour les T $CD4^+$ du *mycosis fongoïde*)[240]. Enfin, une autre étude a montré, par l'analyse des gènes *TCRA* (n=11) et *TCRB* (n=18) chez des patients atteints de syndrome de Sezary, une surreprésentation de certaines familles (Vß8, 13, 17, 21, 22) sans surreprésentation Vα ou Jα particulière et sans homologie des régions CDR3, évoquant potentiellement une stimulation superantigénique sans spécificité antigénique particulière[241].

Enfin, de façon tout à fait intéressante et analogue à ce qui a été retrouvé pour la leucémie T-LGL, un défaut de signalisation au niveau de la voie Fas a été démontré. En revanche, quelques cas de mutations du récepteur Fas (6 patients sur 44 rapportés dans une première série[242] et 3 sur 16 dans une autre série[243]) ont été mises en évidence dans cette pathologie, contrairement aux T-LGL.

4.2.2. Lymphome T gastrique primitif

Bien qu'il n'existe à notre connaissance qu'un cas rapporté dans la littérature, l'association décrite entre infection bactérienne à *Helicobacter pylori* et lymphome T gastrique primitif, et surtout sa régression après éradication du pathogène, peuvent suggérer l'existence d'un lien physiopathologique entre le pathogène et la pathologie tumorale. Ce lymphome $CD3^+CD8^{+/-}$, exprimant le récepteur NK $CD56^+$ et dont la clonalité a été confirmée par PCR, a été diagnostiqué chez un patient de 24 ans dans

un contexte de douleurs abdominales, dyspepsie et perte de poids. L'infection par *H. pylori* était quant à elle affirmée en histologie par coloration de Whartin Starry. Après un traitement éradicateur triple (bismuth, métronidazole et amoxicilline associé à un inhibiteur de la pompe à protons), les contrôles endoscopiques réalisés à 2, 3 et 12 mois ont montré une régression complète des lésions histologiques lymphomateuses. La recherche de clonalité n'a, semble-t-il, pas été répétée. A noter que les autres investigations réalisées éliminaient une maladie coeliaque ou une maladie inflammatoire chronique de l'intestin potentiellement associées.

Dans la littérature, les lymphomes T gastriques primitifs sont rarissimes, représentant sur une série japonaise de 237 patients seulement 6% des cas (n=14)[244]. L'association avec *H. pylori* sur une série de 12 patients présentée plus récemment par la même équipe avoisinait les 60% (7/12), ne permettant en tout cas pas de conclure à un lien physiopathologique tel que celui retrouvé pour les lymphomes B du MALT gastrique.

Cette étude de cas, bien qu'isolée, fait néanmoins écho à la spécificité antigénique retrouvée dans le lymphome B du MALT gastrique, spécificité qui, rappelons-le, concerne les clones T réactionnels. En effet, le clone B tumoral apparaît poly- ou cross-réactif avec le pathogène, mais aussi et surtout avec des autoantigènes et dépend de l'aide médiée par ces clones T spécifiques (du moins dans la phase initiale de la maladie).

4.2.3. Lymphome T γδ hépatosplénique

Le lymphome T γδ hépatosplénique est une entité rare, reconnue dans la classification REAL (Revised European American Lymphoma) en 1994[245], survenant chez le sujet jeune avec une atteinte splénique et hépatique prédominante au niveau des sinusoïdes[246], en accord avec le tropisme de leur contrepartie cellulaire normale[247], et associée à un envahissement médullaire constant quoique parfois minime[248]. Quelques cas de lymphomes hépatospléniques présentant morphologiquement une infiltration similaire des sinusoïdes de la pulpe rouge splénique mais de phénotype αβ ont amené à les classer comme un variant de la précédente entité dans la classification OMS 2001 (des données récentes de microarrays ont par ailleurs confirmé la similitude de ces 2 entités[249]).

L'hypothèse du rôle d'une stimulation antigénique chronique dans ce type de pathologie repose essentiellement sur l'association épidémiologique de ce lymphome à un contexte de greffe solide d'organe[250,251] (associé à contexte d'immunosuppression), mais aussi, pour rester sur le plan infectieux, en association avec le paludisme et notamment une forme particulière dite splénomégalie palustre hyperactive[252,253], ou encore en association une infection à EBV[248] ou HBV[254].

Dans le cas des lymphomes T γδ hépatospléniques associés à une splénomégalie palustre hyperactive, il est intéressant de relever que la recherche d'ADN plasmodial s'avère souvent négative, montrant que la transformation tumorale ne requiert pas directement le pathogène ou s'est autonomisée. Il est important de garder en mémoire que la splénomégalie palustre hyperactive est essentiellement caractérisée par une production incontrôlée d'IgM dans un contexte d'activation B polyclonale. Il existe d'ailleurs des arguments pour relier cette pathologie à l'émergence possible d'un lymphome B

de la zone marginale splénique mais ce point ne sera pas développé ici[255]. Une fois encore, la pathologie tumorale T mature n'apparaît pas comme la plus fréquemment rencontrée dans ce contexte de stimulation antigénique.

La reconnaissance antigénique des lymphocytes T γδ ne passe pas, comme pour les T αβ, par une présentation CMH/peptide systématique mais par une variété de ligands directs de type non-peptidiques (se rapprochant en ce sens plus du mode de reconnaissance des lymhocytes B par leur BCR) ou par de larges structures protéiques de type CMH-I-« like ». Il est, dès lors, difficile de corréler l'émergence de ce type de lymphome à une stimulation antigénique récurrente, puisque les outils usuellement disponibles, tels que l'analyse clonotypique, ne rendent pas forcément compte de la spécificité antigénique. Néanmoins, l'utilisation préférentielle de la chaîne Vδ1 dans les clones qui s'expandent fortement dans un contexte de greffe allogénique d'organe[256] (sachant que les lymphocytes T γδ de la rate expriment la chaîne Vδ1 préférentiellement[257]) est cohérente avec l'expression de cette chaîne dans 2 séries de patients transplantés rénaux ayant développé un lymphome T γδ [248,251]. A l'inverse, l'expression de la chaîne Vδ2, principalement retrouvée sur les lymphocytes T γδ de la peau et des tissus muqueux[258], a été mise en évidence chez un patient porteur d'un lupus érythémateux disséminé aigu ayant développé un lymphome T γδ hépatosplénique dans la série publiée par Belhadj *et al.*[248]. Il est par ailleurs clairement démontré que le nombre de lymphocytes T γδ est augmenté dans un large panel de maladie autoimmunes telles que la polyarthrite rhumatoïde[259], la maladie coeliaque[260] ou la polymyosite[261]. L'hypothèse d'une transformation émergeant d'un clone γδ stimulé chroniquement par des allo- ou des autoantigènes voire des antigènes parasitaires (*Plasmodium falciparum* étant susceptible de stimuler *in vivo* des lymphocytes T γδ chez des patients infectés) apparaît donc séduisante à la vue de ces données.

Enfin, des données récentes d'analyses sur puces à ADN publiées par Travert *et al.*[249] révèlent la surexpression de gènes impliqués dans la voie du TCR (*VAV3*, *BCL10, ZAP70, ITK*) en comparaison à d'autres types d'entités telles que les lymphomes T périphériques sans autre spécificité ou les lymphomes T/NK, suggérant potentiellement un rôle particulier de l'activation chronique du récepteur T.

5. Au-delà de l'infection chronique

5.1. Lymphome folliculaire et pesticides

5.1.1. Origine de la cellule tumorale

Le lymphome folliculaire est une lymphoprolifération B mature, résultant de la transformation maligne de cellules B centrofolliculaires. Le développement de ce type de lymphome est en partie initié par l'expression ectopique de l'oncogène *BCL2* résultant dans plus de 85% des cas d'une translocation t(14;18)(q32;q21)[262]. Cette translocation transpose l'extrémité 3' codante du gène *BCL2* au sein du locus des gènes codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines, aboutissant à la dérégulation de son expression. Au niveau du gène *BCL2*, le point de cassure le plus fréquent, appelé Major Breakpoint Region ou MBR (70% des cas), se situe au sein de l'exon 3, situé très à distance des

premiers exons du gène *BCL2*. Un deuxième point de cassure, minor cluster region ou mcr (5% des cas), est situé 20kB en aval. D'autres points de cassure plus rares ont été décrits, situés notamment en 5' du gène. La conséquence de cette translocation est la présence constitutive intracellulaire d'un fort taux de protéine anti-apoptotique Bcl2 conférant un avantage de survie aux cellules porteuses de l'anomalie génétique.

Malgré un aspect histologique et un immunophénotype clairement centro-folliculaire[245], la contrepartie cellulaire normale de la cellule tumorale, c'est-à-dire l'origine exacte de la cellule à l'initiation de la transformation lymphomateuse, n'est pas clairement établie. Les analyses moléculaires ont ainsi montré que l'origine du processus tumoral dans le lymphome folliculaire n'a pas lieu dans le centre germinatif et que la transformation se développe sur une période couvrant plusieurs stades de la différenciation lymphocytaire B. Comme les cellules centrofolliculaires normales, les cellules tumorales centrocytes- et centroblastes-« like » tumorales prolifèrent au sein d'un réseau cellulaire composé de cellules dendritiques folliculaires et de lymphocytes T CD4 helper folliculaires. Les cellules lymphomateuses conservent également une dépendance vis-à-vis de l'expression et de l'activation du BCR, des interactions avec les cellules T et les cellules stromales du microenvironnement tumoral[245]. En raison de l'expression constitutive d'AID, les cellules présentent un fort taux de mutations somatiques à la fois au niveau du gène des immunoglobulines mais aussi au niveau de divers proto-oncogènes. Il est fortement suspecté que AID joue également un rôle prépondérant dans la survenue des nombreuses translocations surajoutées[263,264]. Il est ainsi clairement admis que la translocation t(14;18), ou du moins l'expression ectopique de Bcl2, bien que nécessaire au processus de lymphomagenèse, n'est pas suffisante pour entraîner l'apparition d'un lymphome folliculaire. Pour preuve, la présence d'une translocation t(14;18) peut être détectée par des techniques de PCR suffisamment sensibles chez près de 50 à 75% de la population normale[265-267]. En accord avec cette hypothèse, le modèle murin *Eμ-BCL2*, surexprimant de manière constitutive dans la lignée B l'oncogène *BCL2* (mis sous la dépendance de l'enhancer Eμ du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines), développe une hyperplasie folliculaire mais très rarement un lymphome folliculaire[268,269]. Dans les cas où un lymphome folliculaire apparaît, des anomalies génétiques surajoutées, et notamment une dérégulation de c-myc, sont d'ailleurs systématiquement détectées. Longtemps considérées comme des cellules B naïves non clonalement reliées, il est maintenant montré que ces cellules t(14;18) positives chez des sujets sains ont la plupart des caractéristiques des cellules tumorales folliculaires, notamment la clonalité (malgré une grande diversité intraclonale due à l'action persistante d'AID)[270]. Ces cellules constituent probablement un état pré-néoplasique dont la cinétique d'évolution est suffisamment faible en l'absence de facteurs précipitants, pour l'instant non clairement identifiés, pour entraîner le développement d'une pathologie tumorale franche au cours de la vie de l'individu[270]. Des études récentes montrent cependant que l'exposition aux pesticides accroît à la fois la fréquence d'individus porteurs de cellules présentant la translocation mais aussi le nombre de ces translocations dans les lymphocytes B circulants d'un même individu[271,272]. Finalement, on peut imaginer un processus comportant un événement oncogénique initial responsable de la surexpression

ectopique de *BCL2* via la t(14;18) survenant vraisemblablement lors de la recombinaison précoce des segments V(D)J au cours de l'ontogénie B et conférant un avantage vis-à-vis de processus apoptotiques à ces cellules. Cet événement, combiné à une activation persistante du BCR via une stimulation antigénique chronique actuellement inconnue (agents exogènes comme certains pesticides, autoantigènes, agents infectieux chroniques bactériens ou viraux…) au sein de certaines niches, aboutirait *in fine,* en cas d'événements oncogéniques secondaires (dérégulation de *BCL6*, de la voie p53), au développement d'un lymphome folliculaire à proprement parler.

5.1.2. Rôle d'une éventuelle stimulation antigénique chronique

Plusieurs éléments vont dans le sens du rôle d'une stimulation antigénique chronique dans le lymphome folliculaire, à la manière de l'association entre lymphome de la zone marginale et VHC, *helicobacter pylori* ou *campylobacter jejuni*, avec certaines nuances cependant. Revenons sur le cas des individus exposés à certains génotoxiques tels que les pesticides. On a longtemps cru que l'accumulation de cellules portant la translocation (14;18) résultait d'une plus grande fréquence d'évènements oncogéniques chez ces individus exposés. En fait, les études moléculaires, montrant une relation clonale entre la plupart de ces cellules portant la translocation (variation intraclonale médiée par l'action d'AID), sont en faveur d'une prolifération accrue de ces cellules anormales chez les individus exposés et non d'une plus grande fréquence d'aberrations chromosomiques ou de mutations par instabilité génomique ou action mutagène non médiée par AID[271,272]. De façon similaire, certains patients porteurs du virus de l'hépatite C (VHC) en phase active présentent une fréquence élevée de cellules t(14;18) positives dans le sang[273], fréquence qui diminue en cas de réponse à un traitement antiviral par interferon +/- ribavirine, et qui, la plupart du temps, réaugmente en cas de rechute virale[137]. Néanmoins, les rares lymphomes associés au virus de l'hépatite C sont la plupart du temps des lymphomes de la zone marginale et ne portent pas de translocation (14;18)[111,112]. Les variations synchrones de la fréquence de cellules t(14;18) positives dans le sang des patients et de la charge virale VHC sont donc actuellement considérées comme un effet « by-stander » dont le mécanisme reste mal compris. A la différence de certains lymphomes de la zone marginale, l'association avec une stimulation antigénique chronique reste donc largement plus débattue pour le lymphome folliculaire et, si elle semble jouer un rôle dans la survie du clone tumoral, elle ne semble pas directement impliquée dans la ou les anomalies premières de la cellule tumorale. Le processus multi-étapes retenu à l'heure actuelle serait donc le suivant : i) évènement oncogénique précoce lors de la recombinaison D_H-J_H aboutissant à la t(14;18) au niveau d'un précurseur lymphoïde B[274]; ii) expression ectopique forcée de Bcl2 durant la réaction du centre germinatif permettant l'échappement de ces clones à l'apoptose malgré l'absence de reconnaissance antigénique spécifique de leur BCR[22,172]; iii) arrêt de maturation au stade centrocyte/centroblaste-like avec persistance d'une activité de AID[275] aboutissant à iv) l'accumulation d'événements oncogéniques secondaires et à la transformation[276].

5.2. Lymphomes B et maladies auto-immunes

L'association entre lymphomes et maladies auto-immunes est établie depuis plus d'un demi-siècle. Si les caractéristiques de ces associations sont de mieux en mieux connues, les mécanismes physiopathologiques sont loin d'être compris. Il semble clair que l'association est bidirectionnelle, les maladies autoimmunes faisant le lit de la lymphomagénèse, notamment B, et inversement, les lymphomes entraînant un certain nombre de cas d'autoimmunité. Nous entendons parler ici du développement d'hémopathies lymphoïdes dans un contexte de maladie autoimmune mais il est parfois impossible de démêler le rapport de causalité entre les 2 types de pathologies, l'expression clinique ne signant pas forcément le début de la maladie dysimmunitaire ou tumorale.

Comme nous l'avons vu précédemment, notamment dans les lymphomes B du MALT associés à *H. pylori* ou au VHC, la polyréactivité du clone tumoral, autoréactif, laisse supposer que le stimulus antigénique (pour le lymphocyte B) serait plutôt endogène que bactérien ou viral. Dans le cas du MALT gastrique, seuls les clones T semblent spécifiques du pathogène et favorisent la prolifération des clones B autoréactifs. Dès lors, on peut imaginer que la maladie autoimmune, rassemblant à la fois la stimulation antigénique mais aussi un contexte inflammatoire, est propice à l'émergence d'un processus de transformation au sein de la population lymphocytaire B. Le cas particulier des lymphomes T et notamment du modèle des lymphomes T sur entéropathie sera décrit dans le chapitre suivant.

Parmi les différentes maladies autoimmunes, les pathologies suivantes sont supposées associées à un risque significativement plus élevé de développement de lymphome : la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de Sjögren, le lupus érythémateux disséminé, la thyroïdite de Hashimoto, les polymyosites et dermatomyosites, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et les spondylarthropathies essentiellement. Les données concernant les associations épidémiologiques entres ces maladies et les lymphomes sont synthétisées dans le tableau 6.

	RR (min-max)	Facteurs de risque particuliers	Lymphomes associés
Polyarthrite rhumatoïde[277-279]	1.5-4	Maladie active (inflammation++) Localisation extra-articulaire (Sd de Felty++)	DLBCL
Syndrome de Sjögren[280-282]	9-16	Hypocomplémentémie Purpura, tuméfaction parotidienne	MALT DLBCL
Lupus disséminé[283-285]	3-7	-	DLBCL
Thyroïdite de Hashimoto[286-288]	3-4	-	MALT
Myosites[289]	2-4	Lymphome découvert dans la 1ère année++ (pathologie « paranéoplasique » ?)	-

Tableau 6. Principales maladies autoimmunes associées au développement de lymphomes B.

Hormis les doutes quant au lien de causalité (notamment dans le cas des myosites où le lymphome survient en règle générale dans l'année suivant le diagnostic), il est difficile d'évaluer la part de

responsabilité des différentes composantes suivantes : 1/ l'inflammation ; 2/ la stimulation autoantigénique ; 3/ l'immunosuppression thérapeutique (anti-TNF par exemple) ou 4/ une prédisposition génétique commune à la maladie autoimmune et au lymphome.

5.3. Lymphome T sur entéropathie et maladie coeliaque

Parmi les associations entre lymphomes T et maladies autoimmunes, celle entre lymphome T sur entéropathie et maladie coeliaque nous paraît mériter une attention particulière pour 2 raisons. La première est que, tout comme la leucémie T-LGL, elle apparaît comme le prototype, s'il en est, du lien potentiel entre lymphomagénèse T et stimulation antigénique chronique. La deuxième est que la voie p53 semble fonctionnellement altérée dans près de 100% des cas pour ce type de lymphome[290], ce qui, à la lumière des résultats que nous avons obtenus dans notre modèle murin p53 KO, nous semble particulièrement important –nous reparlerons de ce point dans la « discussion » des résultats et dans la partie « perspectives » de ce travail de thèse.

La description initiale d'une association entre malabsorption et lymphome intestinal a été rapportée en 1937. Il faut néanmoins attendre 1978 pour que Isaacson et Wright décrivent ce type de lymphome comme une entité propre associée à la maladie coeliaque, et 1985 pour que son phénotype T soit identifié. Cette entité très rare (moins de 5% des lymphomes du tractus digestif) semble provenir de la transformation d'un lymphocyte T $CD8^+$ intra-épithélial. D'un point de vue épidémiologique et clinique, la médiane d'âge au diagnostic est de 60 ans, le sex-ratio de 1, et la localisation préférentielle est le jejunum bien que l'ensemble de l'appareil digestif puisse être touché (estomac, grêle dans son ensemble, colon). Le pronostic est éminemment mauvais, avec moins de 30% de survie à 2 ans.

Si l'association entre ce type de lymphome, appelé depuis son introduction dans la classification OMS 2001 ETL (Enteropathy T-cell lymphoma) ou EATL (Enteropathy Associated T-cell Lymphoma), et maladie coeliaque est clairement documentée, le cas du diagnostic de lymphome sur une maladie coeliaque évoluant depuis plusieurs mois ou années est finalement assez rare. Dans la plupart des cas, il existe à l'anamnèse l'apparition de troubles digestifs récents avec malabsorption pouvant tout à fait correspondre aux premières manifestations de la pathologie tumorale. Néanmoins, la présence chez ces patients des haplotypes HLA fréquemment retrouvés chez les sujets atteints de maladie coeliaque (DQA1*0501 et DQB1*0201) et la présence, en zones adjacentes à la lésion lymphomateuse, d'une augmentation des lymphocytes intra-épithéliaux, d'une atrophie villositaire et d'une hypertrophie des cryptes de Lieberkühn rendent l'hypothèse d'une maladie coeliaque sous-jacente fort probable. D'autres arguments viennent conforter l'hypothèse d'une association causale comme la diminution d'incidence des EATL chez les patients atteints de maladie coeliaque en cas de régime sans gluten strict ou la détection rétrospective, dans les biopsies des patients ayant développé ce type de lymphome, du clone tumoral dès le stade de maladie coeliaque réfractaire au régime sans gluten (appelé communément sprue réfractaire).

Dans la plupart des cas, les cellules tumorales sont des lymphocytes T αβ $CD3^+CD7^+CD103^+$ mais $CD5^-CD4^-CD8^-$. Plus rarement les cellules peuvent être $CD3^-$ et certains lymphomes expriment le

CD8. Il existe une forme particulière appelée monomorphique, non associée formellement à une maladie coeliaque sous-jacente, de phénotype $CD3^+CD8^+CD56^+$. Un *continuum* clair a été établi entre maladie coeliaque, sprue réfractaire et EATL, notamment par la démonstration de la présence du clone dès le stade de maladie coeliaque réfractaire par PCR et séquençage, de même que les anomalies phénotypiques de ce clone (phénotype $CD4^-CD8^-$ usuel) dès ce stade.

Le model suivant peut donc être proposé dans lequel : i) une réponse anormale au gluten alimentaire - et notamment l'une des protéines de type prolamine appelée la gliadine- (stade clinico-histopathologique de maladie coeliaque) selon un mode non élucidé conduirait à ii) la prolifération et à l'acquisition d'un phénotype anormal par les lymphocytes intra-épithéliaux ($CD4^-CD8^-$ notamment) suivies de la survenue d'événements oncogéniques assurant l'indépendance du clone tumoral vis-à-vis de l'antigène (gain en 9q33-24 et 9p21 dont nous parlerons dans la discussion) (stade clinico-histopathologique de sprue réfractaire) avant iii) l'apparition de la pathologie néoplasique à proprement parler (stade clinico-histopathologique de lymphome T). A noter que la spécificité antigénique dans ce modèle de lymphomagénèse semble associée avant tout au contingent $CD4^+$ non tumoral de la *lamina propria,* étant donnée la forte corrélation entre le développement de la maladie coeliaque et certains HLA de classe II particulier. Il semble également y avoir un rôle majeur de l'IL-15 dans le développement de la pathologie, au moins dans les stades initiaux, puisqu'il a clairement été démontré que les lymphocytes intra-épithéliaux phénotypiquement anormaux de patients porteurs de sprue réfractaire étaient plus sensibles à l'effet antiapoptotique médiée par la cytokine et sur-exprimaient le récepteur IL-15Rß (CD122) à leur surface. Cet effet anti-apoptotique était principalement médié par i) le récepteur ß à l'IL-15 et non le récepteur α ; ii) la voie Jak3/STAT5 et Bcl-xL (et non la voie STAT3 comme pour les T-LGL) ; iii) et pouvaient être inhibé par la molécule BH3 mimétique ABT-737 (prévenant l'association de Bcl-xL ou de Bcl-2 avec leur cible)[291].

5.4. Lymphome T anaplasique et prothèse mammaire

Le lymphome anaplasique à grandes cellules est un lymphome T composé de cellules pléiomorphes, au cytoplasme abondant et exprimant le CD30[292]. On retrouve la présence caractéristique de grandes cellules avec un noyau réniforme (dit aussi en fer à cheval) prédominant aux abords des vaisseaux[293]. Le CD3 est exprimé dans moins de 25%[294] des cas mais il existe un réarrangement du TCR objectivé dans plus de 90% des cas[295]. Certains cas de lymphomes anaplasiques à grandes cellules surexpriment la protéine ALK[296] (résultant le plus souvent d'une translocation t(2;5) mettant le gène ALK au contact de celui de la nucléophosmine NPM). Il existe une prédominance chez l'enfant ou l'adulte dans la 3ème décade et le lymphome touche principalement les hommes, du moins pour la forme ALK positive qui est également associée à un meilleur pronostic que la forme ALK négative[293].

Alors que la plupart des lymphomes mammaires sont de phénotype B (essentiellement de type B diffus à grandes cellules dans 49% des cas ou de type zone marginale de type MALT dans 17% des cas[297]), plusieurs études font état d'une surincidence relative de lymphomes anaplasiques à grandes cellules associée aux port de prothèses mammaires, principalement en silicone mais aussi en sérum

physiologique[298-300]. La plupart des cas décrits concernent des prothèses avec fuite ou rupture. De façon tout à fait notable, la quasi totalité des cas décrits sont ALK négatifs[301].

A ce jour, peu de choses sont connues concernant le mécanisme physiopathologique de ce type de lymphome mais l'hypothèse d'une stimulation antigénique par l'extravasation de silicone (antigène composants directement le silicone ou autoimmunité locale générée par l'inflammation réactionnelle) a été évoquée. Néanmoins, l'absence de TCR à la surface des cellules de ce type de lymphome et/ou le défaut de signalisation proximal de la voie de signalisation du TCR[294] font remettre en question un tel modèle physiopathologique, même si l'on peut imaginer une autonomisation secondaire avec activation constitutive de cette voie plus en aval (comme pour l'autonomisation secondaire des lymphomes du MALT gastrique par exemple bien que le BCR ne soit alors pas perdu). Une réaction inflammatoire est retrouvée de façon quasi constante à l'ablation de ces prothèses avec extravasation de silicone, au niveau de la capsule fibreuse mais aussi au niveau des ganglions du territoire de drainage[302]. L'hypothèse d'un rôle des cytokines ou des radicaux libres générés par l'inflammation réactionnelle est également largement suspectée.

6. Quels modèles animaux ?

Comme nous l'avons vu au cours des chapitres précédents, le modèle d'une lymphomagénèse B ou T directement « drivée » par une stimulation antigénique, qu'elle provienne d'un pathogène persistant, d'une « intolérance alimentaire », d'un possible matériel inerte ou d'antigènes du soi après rupture de tolérance, est largement évoqué dans la littérature. Cependant, à l'exception du modèle animal de souris Balb/c infecté de façon chronique par *Helicobacter felis* ou *helmanii,* qui permet de reproduire la survenue d'un lymphome de la zone marginale de type MALT au niveau gastrique proche de la pathologie humaine et établissant solidement le lien causal, les autres associations décrites restent pour l'essentiel purement spéculatives. Notamment, il est très difficile de déterminer les contributions respectives de la stimulation antigénique chronique en elle-même (via un BCR ou un TCR spécifique) de celles de l'inflammation générée par le pathogène ou la pathologie autoimmune sous-jacente. Néanmoins, dans le modèle princeps du lymphome du MALT gastrique à *Helicobacter pylori*, comme nous l'avons souligné à plusieurs reprises, la spécificité antigénique semble l'apanage des clones T non tumoraux réactionnels. Ainsi, même dans le cas d'un pathogène causal clairement identifié, la spécificité et la contribution effective d'une interaction entre le BCR du clone tumoral et un ou plusieurs antigènes du pathogène sont loin d'apparaître comme le moteur unique de la transformation. Dès lors, non seulement il apparaît difficile d'identifier dans quelle mesure un pathogène ou un processus auto-immun est capable d'induire la transformation d'un lymphocyte dans un mécanisme indirect, mais la présence d'une spécificité antigénique semble loin d'être une condition *sine qua non* à la démonstration d'un tel mécanisme. D'où l'importance cruciale de modèles animaux dans ce type de démarche afin de déchiffrer les différentes étapes et prérequis de ce mode de transformation tumorale dont on suspecte qu'il repose à la fois sur i) une stimulation directe probable du BCR/TCR mais de façon peut-être plus limitée qu'initialement suspectée, ii) une composante inflammatoire dont

le rôle est probablement majeur et iii) des polymorphismes particuliers (gènes des différentes cytokines pro-inflammatoires par exemple) et certains haplotypes HLA expliquant la susceptibilité de certains individus.

Même s'il n'existe à notre connaissance que le modèle murin précédemment évoqué mimant le développement de lymphome du MALT gastrique chez des souris Balb/c à partir d'un pathogène vivant, quelques rares travaux publiés dans la littérature permettent de déchiffrer certains aspects du modes de transformation indirecte (lymphocytaire B ou T) qui nous intéresse et vont être développés dans les paragraphes suivants.

6.1. Modèle Eμ-*MYC*/BCR^{HEL}

Un article publié en 2009 dans Plos Biology par Refaeli *et al*. aborde de façon tout à fait élégante la contribution d'une stimulation du BCR dans un modèle murin largement exploité comme prototype animal du lymphome de Burkitt, à savoir le model Eμ-*MYC* plaçant le gène *MYC* sous le contrôle de l'enhancer μ du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines[303]. Partant du constat que les arguments s'accumulent concernant le rôle essentiel de l'activation constitutive de la voie du BCR pour la survie du clone tumoral dans les lymphomes B, les auteurs ont croisé ces souris Eμ-*MYC* avec des souris exprimant un BCR transgénique spécifique du peptide HEL (hen-egg lyzozyme) générant ainsi des souris Eμ-*MYC*/BCR^{HEL}. Les premières constatations dérivées de ce modèle sont une accélération du développement tumoral associé à une modification phénotypique. Alors que les souris Eμ-*MYC* sont connues pour développer des lymphomes B de type pré/pro-B, les souris Eμ-*MYC*/BCR^{HEL} ont toutes développées une pathologie proche phénotypiquement de la leucémie lymphoïde chronique humaine, avec notamment un phénotype B mature naïf quoique CD5 négatif. Les auteurs attribuent cette modification phénotypique à une stimulation qualifiée « d'autonome » (ou de « tonic » par d'autres) du BCR c'est-à-dire sans rencontre avec l'antigène spécifique du BCR (HEL n'étant naturellement pas exprimé chez la souris).

Les souris Eμ-*MYC*/BCR^{HEL} ont ensuite étaient croisées avec des souris exprimant de façon ubiquitaire (sous le contrôle du promoteur de la métallothionéine) la protéine HEL pour générer des souris Eμ-*MYC*/BCR^{HEL}/sHEL. Hormis un développement encore plus précoce que précédemment des lymphomes, le phénotype de ces derniers évoquait clairement les caractéristiques du lymphome de Burkitt (larges plages de cellules de grande taille monomorphes, aspect dit de « ciel étoilé » -lié à la présence de nombreuses cellules histiocytaires-, marqueurs centro-germinatifs –PNA^{+}- et d'activation –CD86^{+}CD69^{+}-). Par des expériences de transfert, les auteurs ont également montré la dépendance à l'antigène des tumeurs générées dans les souris Eμ-*MYC*/BCR^{HEL}/sHEL puisque celles-ci n'étaient pas transférables à des souris WT ou à des souris exprimant sHEL mais dont la chaîne Igα avait été invalidée par un shRNA. En revanche, la prise tumorale était systématique dans des souris transgéniques sHEL ou après transfection avec un ShRNA contrôle. De plus, les auteurs ont montré la dépendance des cellules tumorales issues du modèle Eμ-*MYC*/BCR^{HEL}/sHEL *in vitro* et *in vivo* à toute une série d'immunosuppresseurs (cyclosporine A, FK506 et rapamycine) perturbant la voie de

signalisation du BCR. Utilisant un autre modèle contrôlant l'expression du gène *MYC,* toujours dans des lymphocytes B mais sous la dépendance d'un traitement par doxycycline (l'antibiotique donné dans l'eau de boisson inhibant l'expression du transgène), les auteurs ont également montré la dépendance de la tumorigénèse à la surexpression de l'oncogène *MYC*, de même que la survie et la prise tumorale du clone dans des expériences de transfert.

Au final, cette étude est, à notre connaissance, l'une des premières à démontrer de façon formelle le rôle d'une activation (dépendante (cognate) ou non (tonic) de l'Ag) de la voie de signalisation du BCR dans un modèle murin de lymphomagénèse B. Ces résultats semblent tout à fait pertinents au regard de la pathologie humaine puisque les récents résultats de l'équipe de Staudt ont montré une activation chronique de la voie du BCR dans les lymphomes B diffus à grandes cellules de type ABC (activated B-cell like type) via plusieurs mécanismes : mutations activatrices de *CARD11* (10%) ou de *CD79B* (18%) mutuellement exclusives, voire de *CD79A*[304].

6.2. Modèle ITK-SYK

La molécule SYK (spleen tyrosine kinase) est principalement exprimée dans les lymphocytes B et les cellules myéloïdes. Elle est également exprimée dans les lymphocytes T au stade de thymocytes et de lymphocytes T naïfs mais n'est habituellement pas retrouvée dans les lymphocytes T activés[305]. Elle contient 2 domaines SH2 permettant son recrutement au niveau du BCR après liaison avec l'antigène mais aussi à d'autres récepteurs contenant un domaine ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), ainsi qu'un domaine kinase permettant la phosphorylation de molécules proximales et la transduction du signal en aval de ce récepteur.

L'intérêt pour ce gène dans la lymphomagénèse T vient notamment de travaux ayant documenté sa surexpression dans plus de 90% des lymphomes de type PTCL (peripheral T-cell lymphoma). Ces résultats sont plutôt inattendus puisque le phénotype activé de ces lymphomes évoque une contrepartie cellulaire normale où SYK n'est habituellement pas exprimé[306]. Par ailleurs, bien que rare, la translocation t(5;9)(q33;q22) fusionnant les gènes codants pour ITK et SYK, semble récurrente dans les PTCL[45]. Il apparaît que la présence de la protéine ITK dans cette fusion (et notamment sa partie N-terminale PH (pleckstrin homology)) permet la localisation au niveau des radeaux lipidiques membranaires de SYK et par conséquent sa localisation à proximité de SLP-76 et LAT, entraînant une activation constitutive de la voie du TCR. Des travaux récents publiés par l'équipe de Philippe Gaulard suggèrent que SYK est également surexprimé dans les lymphomes T γδ[249].

Partant de ces observations, un modèle murin d'expression conditionnelle via un système Cre-Lox d'un gène de fusion ITK-SYK a été généré[307]. Les auteurs ont montré comment l'expression du transgène (après croisement de souris « positives » pour le transgène de façon ubiquitaire avec des souris Cre-CD4), à partir du stade de développement thymique double positif, entraînait *ex vivo* une activation constitutive de la voie du TCR (avec phosphorylation des protéines SLP-76, LAT, PLCγ1, AKT, ERK1/2 et p38, up-régulation de CD69 et sécrétion d'IL-2 de façon spontanée -mimant un

engagement du TCR reproductible *in vitro* par stimulation anti-CD3/anti-CD28 de façon constitutive) et *in vivo* la génération de lymphomes T matures avec une pénétrance complète.
Bien que ce système utilise l'expression d'un transgène et ne peut mimer un engagement répété physiologique du TCR par un complexe CMH/peptide, il démontre la possibilité d'un mécanisme de transformation tumorale intrinsèque par une activation constitutive de la voie du TCR.

6.3. Modèle Snf5$^{-/-}$

Une étude publiée en octobre 2011, dans le Journal of Clinical Investigation par une équipe du Dana-Farber, nous a semblé particulièrement intéressante au regard des résultats que nous avons obtenus et qui seront discutés dans la partie éponyme[308]. Elle porte sur un modèle de souris invalidé pour le gène *SNF5* connu pour réguler notamment la structure de la chromatine et pour être fréquemment délété dans les leucémies T prolymphocytaires. La pertinence de l'invalidation de ce gène pour la génèse d'un modèle de lymphomagénèse T mature reste à démontrer mais l'intérêt particulier de ce travail réside dans la caractérisation immunologique détaillée du phénotype tumoral et la recherche méthodique de la contrepartie cellulaire normale dont le clone lymphomateux peut avoir émergé, ce qui reste finalement assez rare dans les différentes études de lymphomagénèse T murine publiées. Utilisant plusieurs systèmes de recombinase Cre (hCD2-Cre, Lck-Cre et CD4-Cre) permettant la délétion du gène *SNF5* à différents stades de développement thymique (CLP, DN1 et DP respectivement), les auteurs montrent la survenue dans 100% des cas de lymphomes T matures (TdT$^-$) CD8$^+$ ayant un phénotype composite fait de cellules CD44^{hi}CD122^{lo} et CD44^{lo}CD122^{lo} lorsque la délétion complète intervient après le stade DN3 (c'est-à-dire dans le modèle Lck-Cre -dans lequel la recombinaison est incomplète avant le stade DN3- et le modèle CD4-Cre -où elle intervient au stade DP- mais pas dans le modèle hCD2-Cre -où un blocage complet de différentiation est observé au stade DN3 en raison de l'absence de Snf5). Cette étude démontre, d'une part, comment le contingent initial et propagateur de la lymphomagénèse correspond à celui exhibant le phénotype T mémoire CD44^{hi}, mais aussi les similitudes entre ce contingent mémoire et un programme dit « cellule souche » (SMAD1, STAT3, KLF4, OCT4, NANOG, SOX2, NAC1, ZFP281 et DAX1) par analyse sur puce à ADN. Elle démontre, d'autre part, le rôle fondamental de la voie du TCR dans la prolifération et la survie du clone tumoral, que ce soit *ex vivo,* en montrant la prolifération en co-culture des cellules lymphomateuses avec des splénocytes irradiés, l'inhibition de leur prolifération en présence d'anti-CD8 ou de cyclosporine A, et *in vivo,* en montrant l'absence de prise tumorale dans des souris receveuses déficientes pour le CMH de classe I. En revanche, les éléments démontrant l'implication du TCR dans l'initiation même du processus de lymphomagénèse restent pour le moins contestables.
En définitive, si l'hypothèse d'une stimulation antigénique chronique du TCR dans ce modèle de transformation semble loin d'être évidente, elle souligne néanmoins plusieurs aspects fondamentaux que sont :

i) la dépendance du clone tumoral (une fois la transformation établie) à la voie du TCR, comme en témoigne l'absence de prise tumorale dans des souris CMH-I KO. Il est

probable que cette dépendance soit liée au stade de maturation des cellules lymphomateuses (cellules T mémoires $CD8^{+}CD44^{hi}CD122^{lo}$ dont la dépendance à un signal TCR « tonic » par interaction CMH/peptide-TCR a été clairement démontré[309], contrairement aux cellules T $CD8^{+}$ mémoires usuelles[310] $CD44^{hi}CD122^{hi}$) ;

ii) la proximité, en terme de programme transcriptionnel, de ces cellules avec des cellules souches –notamment les capacités d'« auto-renouvellement »[311], expliquant peut-être pourquoi les lymphocytes mémoires seraient plus susceptibles de se transformer.

C. Développement et réponse immunitaire lymphocytaire T

L'objectif initial de notre projet était de développer un modèle de lymphomagénèse B, par des injections répétées de *Streptococcus pneumoniae* inactivé à des animaux p53 déficients. Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, les résultats obtenus dans ce travail de thèse nous ont amené à nous interroger sur l'impact de stimulations antigéniques répétées sur la lymphomagénèse T et à nous interroger sur la pertinence en pathologie humaine de notre modèle murin. Bien que non exhaustif, le résumé que nous faisons ci-dessous du développement lymphocytaire T permettra d'appréhender de façon plus claire les concepts développés dans la partie « résultats ».[a]

1. Développement lymphocytaire T

1.1. Développement lymphocytaire T au niveau thymique

Les lymphocytes T dérivent d'un progéniteur lymphoïde médullaire commun aux lignages B, T, NK et dendritiques de type lymphoïde (common lymphoid progenitor ou CLP). Certains de ces progéniteurs quittent la moelle osseuse et migrent vers le thymus par voie sanguine selon des mécanismes encore mal compris et qui dépassent le cadre de ce travail. Une fois parvenus au thymus, ces progéniteurs engagent un programme de différenciation lymphocytaire T, probablement sous la dépendance d'un signal initiateur généré par la voie Notch et en réponse à des interactions avec les cellules stromales thymiques (figure 8).

Bien que la plupart des progéniteurs pluripotents les plus immatures entrant au niveau du thymus puissent exprimer de façon transitoire et faible le CD4, les cellules deviennent rapidement double négative (DN), c'est-à-dire n'exprimant ni le CD4 ni le CD8. La maturation s'effectue suivant les stades qualifiés de DN1 à DN4, eux-mêmes étant actuellement subdivisés en stades DN1a-DN1e pour le stade DN1 ou en DN3E et DN3L ou DN3a et DN3b pour le stade DN3 par exemple. Il a été démontré que les populations DN1a et DN1b sont ainsi enrichies en progéniteurs thymiques précoces mais qu'elles sont encore capables de donner naissance à des cellules NK, myéloïdes voire à des lymphocytes B.

[a] Une partie introductive expliquant le développement et les fonctions immunologiques des lymphocytes NKT a été rajoutée dans la partie discussion de cette thèse. La partie qui va suivre reste néanmoins pertinente pour l'approche des lymphomes thymiques immatures rencontrés dans le modèle p53 KO et probablement pour la compréhension de la pathologie humaine. Par ailleurs, l'ensemble des lymphomes T périphériques murins n'ayant pas encore été analysés, nous ne savons pas si certains d'entre eux ne dérivent pas de lymphocytes T conventionnels.

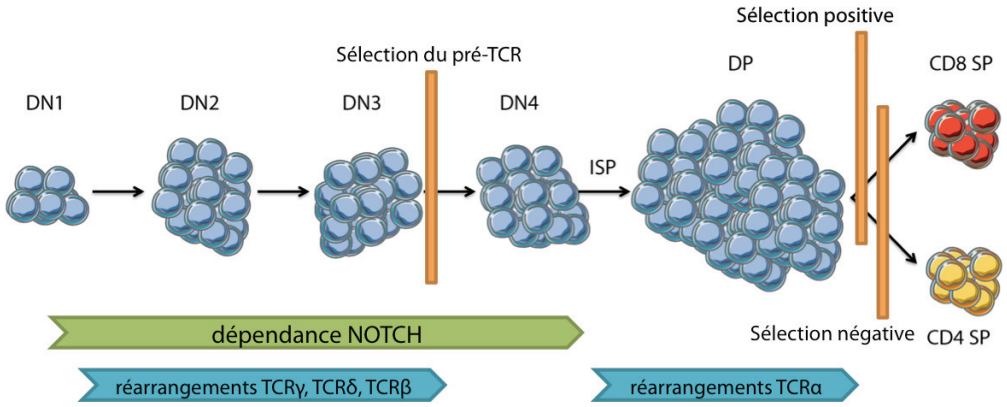


Figure 8. Etapes de développement des lymphocytes T αβ au niveau thymique. Abréviations : DN, double négatif ; ISP, immature simple positif ; DP, double positif ; SP, simple positif.

Le réarrangement somatique des gènes codant pour les chaînes TCRß, TCRγ ou TCRδ débute au stade DN2 pour s'achever au stade DN3. Il permet, dans le cas des lymphocytes Tαβ, une progression vers le stade DN4 à condition qu'un réarrangement au niveau de la chaîne ß ait été productif, permettant alors une association avec la chaîne invariante pré-TCRα. La formation de ce complexe, qualifié de pré-TCR, permet, en association avec divers signaux cytokiniques (IL-7, IL-2 et SCF) et probablement d'autres récepteurs mal connus à ce jour, la survie, la prolifération des thymocytes DN4 et leur différenciation en lymphocytes immatures simple-positifs (ISP pour immature single-positive) exprimant faiblement le CD8. Cette première étape est appelée ß-sélection. Les étapes survenant lors du stade ISP sont mal connues mais il semble que ce soit lors de ce stade qu'est perdue la dépendance développementale à la voie de signalisation Notch[312]. Les lymphocytes up-régulent très rapidement le CD4 pour devenir double-positifs (DP) $CD4^+CD8^+$, population qui représente près de 80% des thymocytes. A ce stade DP, les thymocytes réarrangent le locus *TCRA* codant pour la chaîne α du TCR et expriment dès lors un hétérodimère αβ à leur surface, permettant leur sélection positive puis négative au contact de cellules exprimant le CMH de classe I ou II. Ces lymphocytes T DP deviennent alors simples-positives (SP pour single-positive), prolifèrent brièvement au niveau thymique, avant leur migration en périphérie. On estime la durée de l'ensemble de cette maturation thymique à environ 14 jours chez la souris adulte, celle-ci étant réduite au cours de la vie fœtale et au cours des premières semaines de vie *ex-utero*.

1.2. Localisation spatiale des différentes étapes de différenciation

Le développement des lymphocytes T au sein du thymus ne se fait pas de façon autonome mais requiert de façon constante des interactions avec différents types de cellules dites épithéliales thymique (TEC pour thymic epithelial cells) ainsi qu'avec des cellules mésenchymateuses

fibroblastiques. Lind *et al.* ont montré que les progéniteurs thymiques pénètrent au niveau de la jonction cortico-médulllaire et migrent vers le cortex parallèlement à leur passage du stade DN1 ($CD44^+/CD25^-$) à DN2 ($CD44^+/CD25^+$) puis vers la zone sous-capsulaire lorsqu'ils deviennent DN3 ($CD44^-/CD25^+$)[313]. La divergence entre le lignage γδ –qui ne sera pas traité ici- et le lignage αβ s'effectue à ce stade[314]. Lors du stade DP et après l'acquisition d'un TCR αβ fonctionnel, les lymphocytes T migrent à nouveau vers le cortex. Au passage du stade DP à SP, par down-régulation d'un des 2 corécepteurs, et après une sélection positive puis négative réussie (qui concernent moins de 5% des cellules), s'effectue une migration vers la médulla puis en périphérie.

1.3. Sélections positive et négative

1.3.1. Sélection positive

La recombinaison du locus *TCRA* débute dès le stade DN4 à bas bruit puisque des jonctions Vα/Jα peuvent déjà être détectées à ce stade[315]. Néanmoins, il faut attendre le stade DP pour que les tentatives de réarrangements successives du locus dans son ensemble soient maximales. De façon tout à fait particulière au développement lymphocytaire T et en opposition au développement B[316] (exception faite du mécanisme de « receptor editing » permettant à un lymphocyte B autoréactif de modifier son BCR durant un cours laps de temps au stade pré-B par une nouvelle série de recombinaisons[317]), l'existence d'un réarrangement productif au niveau du locus α n'assure pas l'achèvement de la phase de recombinaison comme en témoigne l'expression persistante de la recombinase RAG dans des lymphocytes T DP exprimant néanmoins un TCR αβ de surface. Le locus α est structuré de façon à ce que de multiples recombinaisons V/J puissent intervenir sur le même allèle, entraînant à chaque fois l'excision du segment réarrangé précédemment[318]. La durée de vie du thymocyte DP étant de l'ordre de 3 à 4 jours (sous la dépendance de RORγ ou TCF-1 contrôlant positivement Bcl-xL[319]), ce dernier dispose donc d'un temps limité pour exprimer un TCR fonctionnel. Il a été démontré que ce laps de temps est suffisant pour que le thymocyte puisse épuiser un set complet de réarrangements possibles le long de son locus *TCRA*[320].

L'événement déterminant la survie du lymphocyte T DP n'est donc pas seulement le réarrangement productif du locus *TCRA* conduisant à l'expression d'une chaîne α et d'un TCR αβ de surface mais la capacité pour cet hétérodimère à reconnaître une molécule CMH de classe I ou II[321]. Cette étape cruciale est appelée sélection positive et permet la survie, la migration médullaire et la différenciation terminale du lymphocyte T.

La question du peptide présenté par les molécules CMH dans le cadre de cette sélection positive est source d'intenses recherches et de questions encore non résolues. Basé sur des expériences utilisant des animaux transgéniques (souris OT-I reconnaissant un peptide de l'ovalbumine dans un contexte CMH classe I restreint, souris P14 exprimant un TCR transgénique pour la gp33 du virus LCMV –résidus 33-41-, souris N15 exprimant un TCR transgénique pour la nucléoprotéine N52 du virus VSV –résidus 52-59), il semblerait que le nombre des peptides du soi permettant d'assurer la sélection

positive d'un clone particulier soit faible (de l'ordre de 2 à 3 peptides identifiés par TCR transgénique dans les modèles expérimentaux) et, dans le cas le plus fréquent, homologue au peptide spécifique de ce TCR transgénique (même s'il existe certaines exceptions comme dans le cas des souris N15 où un peptide non homologue permet la sélection positive du clone TCR transgénique)[322-324]. Dès lors, on peut imaginer que l'absence de certains peptides du soi particuliers permettant la sélection positive de clones spécifiques soit à l'origine de variations du répertoire individuel, expliquant par exemple pourquoi certaines souches murines répondent mal à l'ovalbumine[325,326]. Par ailleurs, l'interaction entre ce peptide du soi, présenté par une molécule CMH, et le TCR apparaît, de façon reproductible, comme de faible affinité[327]. La présentation de ce même peptide aux lymphocytes T matures positivement sélectionnés par ce peptide spécifique est alors incapable de générer un seuil de réponse suffisant pour entraîner une activation du clone[328].

1.3.2. Sélection négative

Tous les types d'interactions TCR-ligand lors du stade DP ne conduisent pas à la survie et la prolifération du lymphocyte T considéré. En effet, contrairement à une liaison peptide du soi/CMH-TCR de faible affinité (et non activatrice pour le clone mature correspondant comme évoqué précédemment), l'engagement du TCR par un complexe CMH/peptide dit du non-soi, ou antigénique, ou encore agoniste, entraîne une délétion clonale lors du développement thymique. Les expériences démontrant ces résultats ont pour la plupart été basées sur la mise en évidence d'une délétion clonale en cas d'activation de type superantigénique[329]. Dans ces travaux, la délétion intervenait de façon tardive, notamment au stade SP au niveau de la médulla, probablement en raison de l'expression spatiale préférentielle de ces superantigènes au niveau médullaire. Les autres modèles couramment utilisés pour étudier la sélection négative sont transgéniques, exprimant d'un côté un TCR spécifique et de l'autre côté son antigène spécifique (sauf pour les souris transgénique HY –antigène mâle- et C5 –composant du complément- où l'antigène est naturellement exprimé). Le stade de sélection négative dans ces différents modèles transgéniques est variable, allant du stade DN au stade SP, dépendant *a priori* de la zone spatiale d'expression de l'antigène (sous-capsulaire ou corticale externe au stade DN, médullaire au stade SP), de l'affinité pour l'antigène (expression faible du TCR au stade DP nécessitant un seuil d'activation sans doute supérieur au stade SP par exemple)[330,331]. Néanmoins, physiologiquement dans des modèles non transgéniques, il est vraisemblable que la sélection négative survient en fin de stade DP.

Dans l'ensemble des travaux étudiant le processus de sélection négative, il a été montré que l'utilisation d'un anti-CD3ε ou d'un superantigène entraînait à la fois une délétion clonale mais aussi un effet « by-stander » résultant des cytokines inflammatoires et des hormones stéroïdes relarguées, rendant les conclusions souvent difficiles à poser[332]. A ce titre, il est par exemple intéressant de noter qu'on observe une mort polyclonale des lymphocytes T DP thymiques lors de l'injection dans une souris B6 WT d'un antigène spécifique d'un TCR transgénique après transfert adoptif de lymphocytes T matures exprimant ce même TCR[333]. L'activation d'une quantité suffisamment élevée de

lymphocytes T matures peut donc de façon surprenante entraîner la mort non spécifique des cellules DP thymiques.

L'apoptose survenant lors de la sélection négative fait intervenir les 2 voies, intrinsèque (via la voie mitochondriale Bcl-2/caspase 9 et notamment la protéine Bim[334,335]) et dans une moindre mesure extrinsèque (via l'engagement du TNFR ou de Fas)[336]. Des données existent concernant l'implication éventuelle d'un cosignal dans le processus de sélection négative comme la nécessité d'un engagement du CD28 ou de LIGHT, une protéine de la famille du TNF[337,338].

1.3.3. Rôle du signal TCR

Au cours des dernières années, les données se sont accumulées en faveur du rôle de l'affinité du TCR pour son ligand CMH/peptide dans les processus de sélections positive et négative. Il est actuellement admis qu'un ligand de faible affinité va plutôt promouvoir une sélection positive tandis qu'un ligand de forte affinité va au contraire entraîner une sélection négative[327]. L'identification des mécanismes permettant la distinction entre les 2 types d'interaction et l'engagement de programmes cellulaires radicalement différents est actuellement la source d'intenses recherches. L'une des pistes actuelles serait une activation différentielle de la voie des MAP kinases par le biais de niveaux d'activation différents de ERK[339,340]. La sélection positive résulterait d'une activation faible mais continue tandis que la sélection négative résulterait d'un pic d'activation de ERK ainsi que de JNK et p38[341,342]. Alors que la traduction dans les lymphocytes T matures d'un niveau d'interaction TCR-ligand différentiel semble être lié au type d'isoforme phosphorylé de la molécule TCRζ (p21 en cas de liaison faible et p23 en cas de forte affinité)[343], en ce qui concerne les thymocytes, il pourrait s'agir des sous-unités CD3δ ou CD3γ (nécessaires à la sélection positive dans le cadre d'une liaison de faible affinité)[344,345].

Enfin, après leur maturation thymique, il est intéressant de noter que les lymphocytes T perdent leur sensibilité aux ligands de faible affinité, pour des questions probables de tolérance, sans perdre leur capacité d'activation en réponse à des ligands de forte affinité, dissociation encore mal comprise à l'heure actuelle[346]. Plusieurs explications ont été proposées comme l'up-régulation de l'expression du TCR à la surface du lymphocyte T[347], la réduction d'association de Lck et TCRζ[348], l'up-régulation de molécules inhibitrices telles que CD2 ou CD5[346] ou la sialylation du CD8[349,350].

2. Développement de la mémoire lymphocytaire

Les cellules spécialisées de l'immunité adaptative que sont les lymphocytes T mémoires, les lymphocytes B mémoires et les plasmocytes à longue durée de vie sont les composants à la base de la mémoire immunologique. Le compartiment mémoire T est composé à la fois de lymphocytes T CD4 et CD8 capables d'acquérir rapidement des fonctions effectrices pour neutraliser directement le pathogène ou sécréter des cytokines pro-inflammatoires inhibant sa réplication ou participant indirectement à sa neutralisation. Les lymphocytes T CD4 servent également de support à la réponse immunitaire B et favorisent le développement des lymphocytes T CD8, notamment via l'activation de cellules présentatrices d'antigènes ou via une sécrétion cytokinique d'IL-2, IL-4 ou d'IL-5. Dans

certaines situations infectieuses, la défense immunitaire est assurée par une seule des composantes de ce système –telles que la défense humorale ou l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8- mais dans la plupart des situations, un contrôle optimal du pathogène est assuré par la conjonction de l'immunité humorale et cellulaire. Dans les prochains paragraphes nous aborderons la génération de la mémoire lymphocytaires T, notamment la mémoire T CD8, d'une part parce qu'elle est mieux caractérisée *in vivo* et parce que la plupart des lymphomes obtenus dans notre modèle de lymphomagénèse, lorsqu'ils ne sont pas double négatif, sont $CD8^{dim}$.

2.1. Activation lymphocytaire T et étapes de la réponse primaire

Le contexte de la reconnaissance antigénique, la durée et l'affinité du contact TCR/CMH-peptide sont autant de déterminants fondamentaux de la réponse lymphocytaire T. Les cellules dendritiques sont les activateurs majeurs des lymphocytes T. Elles sont elles-mêmes activées par la présence d'IFN de type I ou par l'interaction avec des lymphocytes T CD4 helper via un contact CD40/CD154, maximisant leur expression de molécules de CMH et/ou de molécules de costimulation à leur surface. Plusieurs couples récepteurs/ligands (CD28-CD80, CD40-CD154, 4-1BB-4-1BBL, OX40-OX40L ou CD27-CD70) fournissent le deuxième signal requis, en complément du signal d'activation induit par l'interaction TCR/CMH-peptide. Ces récepteurs de costimulation agissent en amplifiant la signalisation TCR dans les étapes d'activation (notamment l'engagement du CD28 ou du CD40) mais aussi de prolifération (par exemple pour l'engagement de OX40 et 4-1BB)[351-354] des cellules T. L'invalidation génétique de ces différents acteurs de costimulation a révélé des effets disctincts selon le type CD4 ou CD8 considéré. Tandis que l'activation T CD4 est très dépendante de la présence des molécules CD28, CD154 et OX40, la réponse anti-infectieuse T CD8 est peu affectée en leur absence. Inversement, 4-1BBL semble avoir un rôle prédominant dans la réponse CD8, contrairement à la réponse CD4. Il a par ailleurs été rapporté que le seuil d'activation par le signal TCR des lymphocytes T CD8 serait inférieur à celui des T CD4, expliquant en partie la moindre dépendance vis-à-vis de ces molécules de costimulation des lymphocytes T CD8. Par exemple, la dépendance à l'engagement du CD28 dans les CD4 peut être contournée par des concentrations supérieures en antigène ou un contact prolongé avec le TCR[355,356]. Qui plus est, la surreprésentation des molécules CMH de classe I (quasiment ubiquitaires) comparativement aux molécules CMH de classe II pourrait expliquer, qu'*in vivo*, le seuil d'activation soit atteint largement plus rapidement pour les CD8 que pour les CD4 (figure 9).

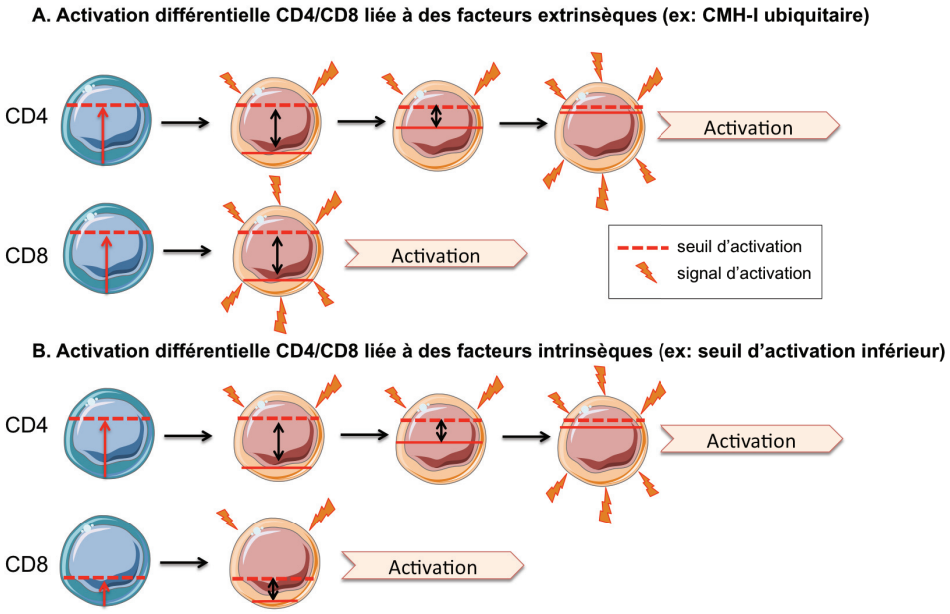


Figure 9. Hypothèses expliquant l'activation différentielle des lymphocytes CD8 comparativement aux lymphocytes CD4.

L'étape d'activation du lymphocyte T constitue la porte d'entrée vers 3 phases distinctes au cours de la réponse primaire anti-infectieuse[357]. La première, qualifiée de phase d'expansion, est initiée dans les ganglions lymphatiques et se caractérise par une prolifération et une différenciation du lymphocyte T naïf en lymphocyte T effecteur –cytotoxique pour les CD8 (CTL pour cytotoxic T lymphocyte) ou Th1/Th2 (T helper) pour les CD4 (nous n'aborderons pas les caractéristiques particulières propres à ces effecteurs CD4). La seconde, intervenant après l'éradication du pathogène, qui survient en général en quelques jours après le début de l'infection, est appelée phase de contraction, au cours de laquelle plus de 90% des effecteurs générés vont mourir. Les lymphocytes qui survivent à cette phase de contraction vont entrer dans la troisième et dernière phase de cette réponse primaire, à savoir la phase mémoire, au cours de laquelle le nombre de cellules spécifiques du pathogène va rester quasiment constant pendant une période prolongée voire durant la vie entière de l'individu (figure 10).

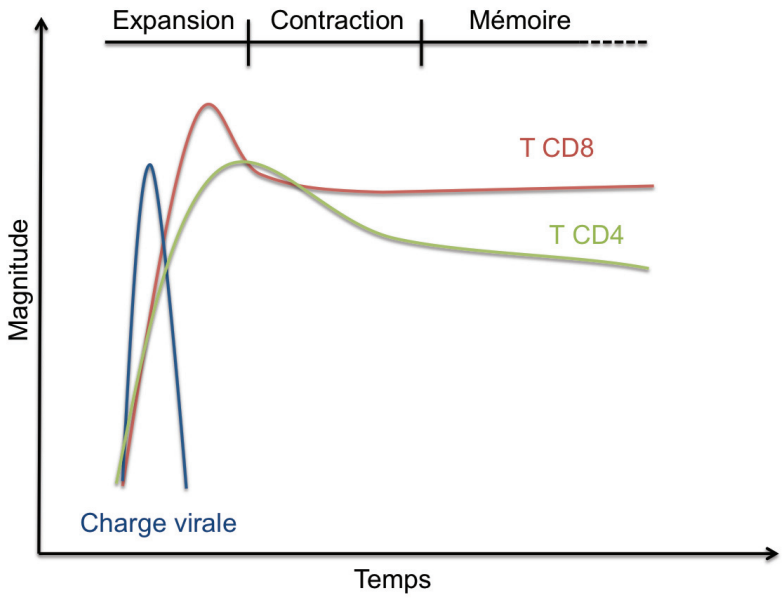


Figure 10. Etapes de la réponse antivirale lymphocytaire T CD4 et CD8.

2.2. Principes de la mémoire lymphocytaire T

Il est clairement établi que la réponse lymphocytaire générée par les lymphocytes T CD4 et CD8 mémoires est plus rapide et efficace que la réponse primaire. L'association de cette réponse T secondaire rapide à une réponse humorale, elle-même améliorée, entraîne une élimination le plus souvent rapide et complète du pathogène. Ce processus est à la base de la stratégie vaccinale. La comparaison des caractéristiques fonctionnelles des lymphocytes T naïfs et mémoires a permis au cours des dernières décennies de mieux comprendre la base de cette réponse secondaire.

Premièrement, il a été démontré qu'après une réponse primaire, le nombre de lymphocytes T spécifiques d'un antigène pouvait être augmenté d'un facteur de 10 à 100 fois chez un animal immunisé par rapport à un animal naïf[358-361]. Deuxièmement, la différenciation d'un lymphocyte T naïf en lymphocyte T mémoire est associée à de nombreux remaniements de la structure chromatinienne et à une modification du profil des facteurs de transcription actifs, montrant ainsi que le principe de la mémoire lymphocytaire T ne reposait pas tant sur une amplification du pool de lymphocytes potentiellement répondeurs que sur une modification de leur capacité fonctionnelle[362]. Par exemple, les gènes codant pour l'IFN-α ou pour les molécules cytotoxiques telles que la perforine ou le granzyme B ne sont pas exprimés par les T CD8 naïfs alors qu'ils sont exprimés de façon constitutive par les T CD8 effecteurs et mémoires[363-365]. Bien que la synthèse protéique de ces molécules ne soit enclenchée que lors de la rencontre antigénique, la présence de transcrit ARN en grande quantité assure une réponse massive et rapide en cas de rencontre secondaire[363,365,366]. Troisièmement, la modification du pattern de molécules d'adhésion et de récepteurs aux chimiokines à la surface du lymphocyte T mémoire assure sa capacité à patrouiller et surveiller les organes non-lymphoïdes et les tissus muqueux où les infections microbiennes sont généralement initiées. Ces lymphocytes T mémoires résidant au niveau des tissus non lymphoïdes ont été dénommés lymphocytes T mémoires effecteurs (T_{EM} ou T effector memory) par opposition aux lymphocytes T mémoires résidant aux

niveau des organes lymphoïdes secondaires qualifiés de T mémoires centraux (T_{CM} ou T central memory)[367-371]. Les caractéristiques de ces 2 types de lymphocytes T mémoires sont détaillées dans le chapitre suivant. Enfin, quatrièmement et dernièrement, l'homéostasie de cette population mémoire est finement régulée par un taux basal de divisions faible mais constant, contrebalançant la mort cellulaire et permettant d'assurer une remarquable constance dans le nombre de ces lymphocytes T mémoires au cours de la vie de l'individu[360,372]. Les interleukines IL-2, IL-7 et principalement IL-15 semblent jouer un rôle majeur dans la survie et la prolifération de cette population bien que non complètement élucidé à l'heure actuelle[373-375]. L'homéostasie de la population T CD8 mémoire sera reprise plus en détail ultérieurement, notamment les facteurs extra- et intracellulaires contrôlant la survie et l'apoptose à ce stade de différenciation, puisque nos travaux suggèrent un rôle jusqu'à présent non évoqué de p53 dans la mort spécifique de ce contingent, peut-être dans un contexte de stimulations chroniques.

Contrairement aux lymphocytes T CD8, il semble que les T CD4 mémoires diminuent progressivement au cours du temps. Les cytokines assurant la survie et la prolifération des lymphocytes mémoires T CD4 sont moins bien identifiés que pour leur contrepartie CD8 mais l'absence de réponse à l'IL-15 de cette population pourrait expliquer les différences observées[372,373].

En définitive, la conjonction d'une augmentation du nombre de cellules spécifiques de l'antigène, d'une fonctionnalité préétablie (ARNs codant pour le granzyme B et la perforine exprimés en grande quantité), d'une longévité accrue et d'une localisation stratégique rend compte de la protection conférée par la mémoire lymphocytaire sur le long-terme.

2.3. Lymphocytes T « central memory » et « effector memory »

En 1999, l'équipe de Lanzavecchia propose, dans un article publié dans Nature, la distinction entre 2 sous-types de lymphocytes mémoires basée sur l'expression de la L-sélectine (CD62L) et du récepteur à la CC-chimiokine 7 (CCR7), déterminant leur localisation anatomique mais aussi leurs propriétés fonctionnelles[370].

CD62L interagit avec l'adressine PNAd au niveau des HEV (high endothelial venules) du ganglion, permettant l'attachement et le « roulement » du lymphocyte[376,377], tandis que CCR7 reconnaît les chimiokines CCL19 et CCL21 présentes en grandes quantités au niveau de la surface luminale de l'endothélium, permettant l'arrêt définitif des lymphocytes puis leur extravasation[378]. Les lymphocytes T mémoires $CD62L^{hi}CCR7^{+}$, qualifiés de T_{CM}, migrent efficacement vers les ganglions lymphatiques[371,379] tandis que les T mémoires $CD62L^{lo}CCR7^{-}$, qualifiés de T_{EM}, sont retrouvés principalement au niveau d'autres sites tels que le poumon ou le foie[371].

D'un point de vue fonctionnel, il existe également certaines différences notables entre ces 2 contingents cellulaires[370]. La stimulation *in vitro* de T_{CM} humains entraîne une production rapide et importante d'IL-2 mais faible d'IFN-γ, d'IL-4 ou d'IL-5, contrairement au T_{EM} dont la stimulation entraîne une production cytokinique inverse associée à la synthèse intracellulaire de perforine.

Le schéma qui prévaut à l'heure actuelle est donc celui d'une population T_{EM} présente au niveau des sites potentiels d'infection, pouvant répondre de façon quasi-immédiate lors de la rencontre

antigénique, et d'une population T_{CM} résidant au niveau ganglionnaire, permettant de fournir une aide à la réponse B ou générer une seconde vague de T effecteurs. Il a ainsi été montré *in vitro* comment la restimulation de lymphocytes T CD4 mémoires $CD62L^{hi}CCR7^{+}$ générait une population $CD62L^{lo}CCR7^{-}$, suggérant que les lymphocytes T_{CM} pouvaient donner naissance à des lymphocytes effecteurs ou T_{EM}. Existe-t-il une homéostasie différentielle de ces 2 types de lymphocytes mémoires ? Comment sont-ils générés lors de la réponse primaire ? Quels sont les interactions et les passages phénotypiques et fonctionnels de l'un vers l'autre ? Autant de questions qui restent pour l'instant mal comprises.

2.4. Genèse de la mémoire lymphocytaire T

S'il existe un consensus à la fois sur la notion de mémoire lymphocytaire T et sur l'existence de 2 sous-types de T mémoires (T_{CM} et T_{EM}) tels que présentés par Sallusto *et al.* (même si, depuis, plusieurs raffinements dans ces sous-types ont été proposés), le débat concernant la mémoire lymphocytaire T, la possibilité d'évolution d'un phénotype T_{CM} vers un phénotype T_{EM}, et réciproquement, ou la naissance d'un T mémoire à partir d'un lymphocyte T activé ou naïf est loin d'être clôt.

Il a été clairement démontré, en ce qui concerne la mémoire CD8, que le transfert d'un unique lymphocyte antigène-spécifique naïf dans un animal receveur était associé à la genèse de cellules effectrices mais aussi de l'ensemble des différents phénotypes de cellules mémoires en réponse à un challenge microbien[380]. Ceci démontre qu'un lymphocyte T naïf antigène-spécifique possède bien intrinsèquement les capacités à générer à la fois des populations effectrices et mémoires.

Les premières données, basées sur l'utilisation d'un système Cre-lox ou d'un transfert adoptif de lymphocytes T effecteurs, ont clairement démontré que des lymphocytes T mémoires pouvaient émerger de la population précoce effectrice générée au cours de la réponse primaire au pathogène[381,382]. Par ailleurs, des expériences de marquages par CFSE ou BrdU ont montré que très peu de cellules se divisaient au cours de la phase de contraction, démontrant que la plupart des lymphocytes T mémoires étaient générés au cours de cette phase d'expansion, et non par prolifération isolée d'un contingent particulier de cellules effectrices lors de la phase de contraction[383]. L'engagement vers un programme de différenciation mémoire semble même déterminé très tôt dans la réponse puisque 24h de contact avec l'antigène sont suffisantes non seulement pour engager une expansion et une différenciation des lymphocytes T CD8 en CTL (témoignant de l'absence de nécessité formelle de contact antigénique ultérieur pour la genèse de la réponse primaire) mais aussi pour générer une mémoire lymphocytaire T de longue durée[384,385]. Dès lors, il apparaît qu'un engagement précoce des effecteurs lymphocytaires T lors de la rencontre antigénique (dans un contexte de costimulation particulier et par le biais de certaines cytokiniques spécifiques probablement) puisse être très rapidement associé à une programmation vers un programme mémoire pour un certain nombre d'entre eux, sans que l'on sache aujourd'hui quels signaux orientent précisément vers tel ou tel devenir. Ce modèle, dans lequel toutes les cellules rencontrant l'antigène

passeraient par un stade effecteur, avant que certaines seulement ne deviennent mémoire est usuellement qualifié de linéaire (figure 11A). Il pose néanmoins la question de savoir si une cellule engagée dans un programme effecteur est capable de maintenir des capacités d'auto-prolifération caractéristiques des cellules mémoires, notamment de type « central memory », ce qui a été très largement débattu. Un modèle animal permettant de tracer les cellules T ayant exprimé le gène granzyme B a été utilisé dans le cadre d'une infection à *Haemophilus influenzae* et a formellement montré que des cellules mémoiresT_{CM} pouvaient émerger d'une population ayant acquis, à un moment de la réponse immunitaire, un phénotype effecteur. Non seulement ces cellules exprimaient un phénotype T_{CM} mais étaient également capables de proliférer à une infection secondaire, confirmant leur caractère fonctionnel et démontrant que l'acquisition de propriétés effectrices n'est pas forcément associée à la perte des capacités d'auto-renouvellement.

Des travaux sont venus compléter ces données en montrant que des lymphocytes T mémoires pouvaient également être générés sans passer par un stade effecteur[386]. Ces résultats sont notamment basés sur les travaux de Chang *et al.* et concernent la notion de division asymétrique[387]. Dans ces travaux, les auteurs montrent que, suivant une interaction prolongée entre le lymphocyte T (ici CD8) et une cellule dendritique présentant l'antigène microbien spécifique du lymphocyte, se développe une ségrégation asymétrique donnant naissance d'une part à une cellule effectrice (Ganzyme B^+, IFN-γ^+, $CD62L^{lo}$, $CD127^-$) –incapable par la suite de conférer une mémoire immunitaire après transfert adoptif dans une souris naïve- et d'autre part à une cellules de type T_{CM} (Ganzyme B^-, IFN-γ^-, $CD62L^{hi}$, $CD127^+$). Ce modèle vient donc compléter la vision linéaire initiale en proposant un modèle alternatif de genèse de la mémoire dit non-linéaire dans lequel le passage par un phénotype effecteur serait contingent (figure 11B).

Des variations de ces modèles ont été proposées qui relient le nombre de contacts avec l'antigène aux caractéristiques de la mémoire lymphocytaire T générée. Par exemple, alors qu'un contact antigénique bref et unique serait associé à un engagement vers un phénotype T_{CM} sans passage par une différenciation en cellule effectrice, des contacts répétés avec l'antigène seraient à l'origine, dans un premier temps, d'un engagement vers un phénotype effecteur puis lors de la phase de contraction de la persistance de certaines de ces cellules effectrices en cellules T_{EM} (figure 11C).

Des modèles encore plus fins de ce type, notamment dans le cas des infections chroniques avec persistance du pathogène sous forme latente, ont également été proposés. Dans ceux-ci, il n'existe non pas un état à 2 niveaux de mémoire, comme dans le modèle précédent, mais une multitude de niveaux directement liés aux nombres de contacts entre un lymphocyte T et son complexe CMH-peptide « cognate » ou apparenté. Cette hypothèse appelée « decreasing-potential hypothesis » suppose que plus un lymphocyte T est stimulé plus les probabilités qu'il entre en apoptose (délétion), ou qu'il persiste mais soit dysfonctionnel –absence d'activité cytotoxique ou incapacité à sécréter de l'IFN-γ, du TNF ou de l'IL-2- (exhaustion)-, sont importantes[357]. Ces données sont basées à la fois sur des résultats en modèle animal (infection par le virus LCMV ou des modèles double transgéniques pour le TCR et son antigène) mais aussi en clinique humaine (infection par le VIH ou le VHC)[388-391]. Les 2

questions centrales, à savoir dans quelle mesure cette exhaustion est réversible et de quelle façon les différents types de lymphocytes T effecteurs générés dans le cadre de ces infections chroniques sont capables de donner naissance à des T mémoires fonctionnels, sont non résolues à l'heure actuelle (figure 11D).

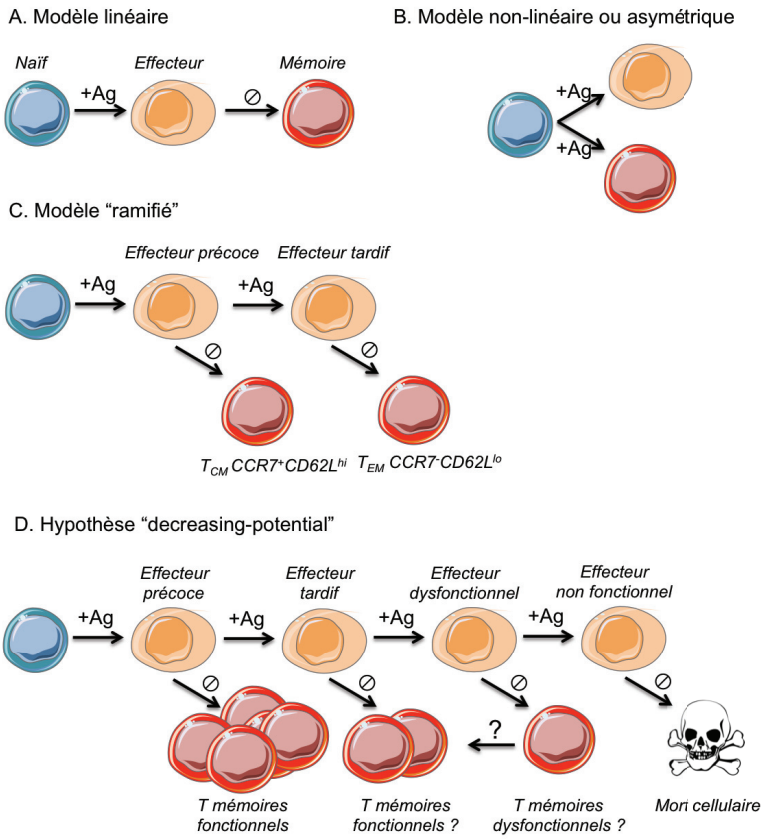


Figure 11. Modèles de différentiation des lymphocytes T mémoires (*d'après Kaech et al.*)

2.5. Homéostasie des populations lymphocytaires T naïves et mémoires

Il est maintenant connu que le nombre total de lymphocytes T chez l'homme ou l'animal est finement régulé. En effet, ce nombre est relativement constant au cours de la vie de l'individu, et ce malgré une production continue et soutenue de nouveaux lymphocytes à partir du thymus -tout du moins dans l'enfance[360]. Par ailleurs, au cours d'une infection, le nombre de cellules T spécifiques du pathogène peut atteindre 50% du répertoire pour les CD8 dans certains cas, nécessitant la mise en route de mécanismes régulateurs contrebalançant cette expansion pour maintenir un effectif constant.

La compréhension de l'homéostasie du compartiment lymphocytaire T est complexifiée par la diversité des populations lymphocytaires T (CD4/CD8/TCRαβ/TCRγδ/NKT) et des mécanismes de régulation propres à chaque sous-type de lymphocytes (naïf/activé/mémoire lorsqu'ils existent). Etant donnés les résultats obtenus dans ce travail de thèse, et notamment dans la perspective de comprendre le rôle éventuel de p53 dans l'homéostasie lymphocytaire T, nous détaillerons les différentes

composantes intervenant dans la survie et l'apoptose de cette population, en illustrant notre propos essentiellement par le cas des lymphocytes T $CD8^+$, les mieux caractérisés à l'heure actuelle.

2.5.1. Homéostasie des lymphocytes T naïfs

Alors que l'intérêt de la sélection positive thymique discutée précédemment est longtemps resté débattu, il apparaît aujourd'hui que la sélection de lymphocytes T susceptibles de recevoir un signal TCR tonique par engagement avec des complexes CMH-peptides du soi permet surtout leur survie en périphérie[392-394]. Ce signal tonique associé à la présence d'IL-7 assure la survie des lymphocytes T naïfs en maintenant une expression suffisante de Bcl-2, prévenant ainsi la mise en route d'un programme apoptotique par la voie intrinsèque mitochondriale. La démonstration de la nécessité de ces 2 signaux a été faite par l'utilisation de modèles murins IL-7R KO[392,395-397] ou déficients pour l'un des adaptateurs clés de la voie du TCR (Vav1, WASP, Nck, hnRNPLL ou Dock8 par exemple)[398-402] en montrant une diminution de la survie des lymphocytes T naïfs en l'absence d'IL7-R (malgré les biais liés au rôle de l'IL-7 dans la maturation thymique) ou proportionnelle à la diminution de la signalisation TCR. Il a également été démontré que l'initiation du signal TCR ne résultait pas d'une activation autonome mais bien de son engagement via une molécule du CMH, comme en atteste la mort rapide (en une dizaine de jours environ pour les CD8[403] et 30 à 40 jours pour des CD4[404,405]) des lymphocytes T (CD4 ou CD8) transférés dans des souris CMH (classe II ou I respectivement) KO[310,404-406]. L'évaluation de ces modèles reste néanmoins sujette à caution car potentiellement biaisée par la présence de molécules de classe I résiduelles sur les lymphocytes T CD8 transférés[403] (capables en théorie de présenter des complexes CMH-peptides du soi aux autres lymphocytes T CD8) ou la possibilité dans les modèles de classe II KO via délétion de la chaîne ß (souris Aβ KO) de la formation d'hétérodimères atypiques Aα-Eβ[407]. Ce signal du TCR reste infraliminaire en terme d'activation du lymphocyte, c'est-à-dire assure la survie cellulaire sans entraîner d'expansion clonale. Il a déjà été discuté précédemment de quelle façon un « TCR-tuning » permet d'expliquer comment un signal activateur lors de la sélection thymique (se traduisant par exemple par l'expression de CD69[408]) peut devenir non-activateur en périphérie (absence d'expression de CD69 pour le même ligand par exemple) permettant d'assurer la quiescence des lymphocytes T naïfs en absence de pathogène et évitant des réactions autoimmunes[409,410]. Ce seuil peut être modulé en fonction du contexte, cytokinique par exemple, puisque lors du transfert de lymphocytes T CD8 naïfs dans un hôte vide en lymphocytes T (souris irradiées, CD3ε KO, $RAG^{-/-}$), il existe une activation et une prolifération lymphocytaire IL-7 et CMH dépendante qualifiée de prolifération homéostatique. La restauration d'un seuil d'activation suffisamment abaissé dans ce contexte n'est cependant pas systématique puisque des lymphocytes T CD8 de souris portant un TCR transgénique contre le peptide HY, avec un engagement du TCR de très faible affinité, sont incapables de proliférer de façon homéostatique[411,412]. Du fait de l'importance des marqueurs suivants dans les résultats que nous avons obtenus, rappelons ici que ce « tuning » du TCR repose en partie sur les molécules CD5, CD8 ou CD127 de la façon suivante : l'up-regulation du CD5 ou la down-regulation du CD8 et du CD127 augmentent le seuil d'activation via un

engagement du TCR (donc diminuent la sensibilité du lymphocyte T CD8 à l'activation) et inversement. Des travaux publiés par Park *et al.* dans Nature Immunology en 2007 caractérisent ainsi une boucle de régulation dans laquelle un engagement de haute affinité du TCR inhibe la voie de signalisation du récepteur à l'IL-7 (CD127), entraînant elle-même à la fois un rétrocontrôle transcriptionnel positif sur l'expression du CD127, mais aussi une down-régulation du co-récepteur CD8[413]. Mis à part l'IL-7 qui joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie des lymphocytes T naïfs[392,396], un rôle minoritaire de l'IL-15[414] (notamment pour les T CD8, les CD4 étant dépourvus du récepteur ß CD122) et de l'IL-2[415] a été rapporté.

Tandis que la fonction de l'IL-7, en maintenant un niveau d'expression suffisant de Bcl-2 mais aussi en activant la voie PI3K/AKT/mTOR, semble claire, celui de la signalisation tonique du TCR l'est moins. Des travaux récents suggèreraient que cette dernière servirait essentiellement à moduler la sensibilité des cellules T matures aux cytokines dont notamment l'IL-7[416]. En effet, alors que la boucle régulatrice décrite précédemment (engagement fort du TCR → inhibition de la voie de l'IL-7) diminue la sensibilité du lymphocyte T à la signalisation des cytokines γ_c comme l'IL-7, un engagement de faible intensité sensibiliserait au contraire le lymphocyte à l'IL-7[413].

Au final, l'homéostasie des lymphocytes T naïfs reposerait sur une compétition vis-à-vis de l'IL-7 principalement (le nombre de T naïfs étant directement proportionnel à la quantité d'IL-7 disponible) et, dans une moindre mesure, vis-à-vis des contacts TCR/CMH-peptide endogène (l'administration de cellules dendritiques syngéniques à des souris receveuses vides augmentant directement la prolifération homéostatique).

2.5.2. Homéostasie des lymphocytes T activés

La phase d'expansion est essentiellement contrôlée par les cytokines γ_c, notamment l'IL-2, mais aussi l'engagement du CD28 qui permet la surexpression de la molécule anti-apoptotique Bcl-xL[417,418]. La phase de contraction (aussi appelée délétion) suit la phase d'expansion de façon très rapprochée et est responsable de la mort de plus de 90% de la population répondeuse en quelques jours. Le rôle du récepteur Fas[419-421] (et d'autres récepteurs de la voie du TNF comme p50-TNF-R ou TRAIL[422]) dans cette phase a été démontré il y a maintenant plus de 20 ans mais l'idée que la voie Fas-FasL contrôle seule cette étape de contraction a été largement remise en question. Notamment, le fait que les animaux ou les hommes déficients pour la voie Fas-FasL ne présentent pas d'accumulation de lymphocytes T activés CD4 ou CD8 mais présentent l'expansion d'une population $CD4^-CD8^-B220^+$ dont l'origine est mal établie[423,424] (venant probablement d'une population autoréactive ayant diminué l'expression du CD8) ou que ces mêmes lymphocytes activés expriment la molécule inhibitrice FLIP[425,426] suggère que cette voie ne serait pas la clé de voûte de la mort cellulaire dans cette situation.

Ainsi, plusieurs travaux ont suggéré l'importance de la voie mitochondriale et des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans l'apoptose des lymphocytes T activés. La famille Bcl-2 peut être décomposée en 2 catégories[427]. La première, représentée par les protéines anti-apoptotiques contenant 3 ou 4 domaines dits BH (Bcl-2 Homology), englobe Bcl-2 elle-même, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1,

Boo et Bcl-B notamment. La deuxième famille est constituée de molécules pro-apoptotiques et peut elle-même être subdivisée en 2 classes : 1/ l'une contenant des protéines à 2 ou 3 domaines BH est constituée des molécules Bax, Bak, Bcl-xS, Bok et Bcl-Gl ; 2/ l'autre, dite BH3 « only », est constituée essentiellement par des molécules intermédiaires dans cette voie apoptotique telle que Bad, Bid, Bik, Blk, Bim, Bmf, Puma, Hrk et Noxa[428].

Plusieurs équipes ont ainsi suggéré le rôle des protéines de type Bcl-2 dans l'apoptose des lymphocytes T activés[429]. Notamment, les lymphocytes T déficients pour la molécule Bim ou pour Bax et Bak sont protégés en partie de l'apoptose en contexte d'activation[430-433]. Par ailleurs, *in vivo*, il existe une down-régulation de Bcl-2 et de Bcl-xL juste avant que ces cellules activées ne meurent. Dans les lymphocytes T activés, Bcl-2, Bim et Bak, qui semblent les plus impliquées dans ce processus de mort cellulaire, sont toujours situées au niveau de la mitochondrie (contrairement à d'autres types cellulaires où Bim, par exemple, est tenu à distance de la mitochondrie en se liant aux microtubules via le complexe moteur dynéine/dynactine), suggérant que la voie mitochondriale pourrait jouer un rôle majeur[434].

Trois article publiés en « back to back » dans Immunity en 2008 ont permis de mieux comprendre les mécanismes de mort cellulaire des lymphocytes T activés[435-437]. Une fois de plus se dégage la notion tout à fait fondamentale de la distinction entre une réponse aiguë avec disparition rapide et précoce de l'antigène et une persistance chronique de l'antigène à l'origine d'engagement probablement répétés du TCR[438]. En générant, par croisement, des animaux déficients pour Bim et mutés pour la voie Fas-FasL, les auteurs ont montré le rôle prépondérant de Bim (et donc de la voie apoptotique intrinsèque) dans la phase de contraction suivant une infection aiguë –dans un mécanisme d'apoptose par déprivation cytokinique- et l'action synergique de Fas et Bim dans le cadre d'infections chroniques. Fas jouerait donc un rôle prépondérant dans le cadre d'infections chroniques avec engagements répétés du TCR mais Bim (et plus généralement la voie Bcl-2) serait aussi essentielle dans cette situation. Quelle est exactement la place de Bim dans ce processus ? Est-on dans une situation de déprivation cytokinique comme dans le cas d'une infection aiguë ou est-ce qu'un autre rôle particulier de la voie apoptotique intrinsèque entre en jeu dans ce processus –notamment en régulant le flux calcique provoqué par l'engagement répété du TCR ? Ces questions restent, pour l'heure, en suspens.

Même lors des phases de contraction les plus drastiques, il existe un petit nombre de lymphocytes T activés capables de survivre, à l'origine de la mémoire lymphocytaire T. Les mécanismes à l'origine de cette survie sélective de certaines cellules sont mal compris mais impliqueraient les signaux de costimulation fournis par les APC (via Ox40, 4-1BB ligand, ou CD27) via l'activation de la voie NF-κB et la molécule Bcl-3[439-441].

2.5.3. Homéostasie des lymphocytes T mémoires

L'homéostasie des lymphocytes T CD8 semble relativement bien comprise à l'heure actuelle tandis que celle des lymphocytes T mémoires CD4 reste à élucider. Dans le milieu des années 90, l'équipe de Sprent a montré comment l'homéostasie des lymphocytes T CD8 mémoires reposait sur une

prolifération à bas bruit ponctuellement amplifiée par l'adjonction d'IFN de type I[442]. La même équipe a par la suite démontré comment l'IFN de type I servait en fait de médiateur à la sécrétion d'IL-15 (notamment par les macrophages), cytokine clé de la prolifération des lymphocytes CD8 mémoires[373,374,443]. L'IL-7 joue également un rôle dans l'homéostasie des lymphocytes T mémoires, quoique dans une moindre mesure. La confirmation du rôle clé de l'IL-15 a été démontrée dans les animaux déficients pour l'IL-15 ou pour son récepteur IL-15Rα, dans la mesure où le nombre de lymphocytes mémoires CD8 était largement diminué[444,445].

Le rôle d'un signal tonique du TCR reste controversé. Alors qu'il a été démontré que les contacts TCR/CMH-peptide n'étaient pas nécessaires à la survie des lymphocytes T mémoires de façon générale[446], certaines sous-populations ou certaines conditions particulières d'infection pourraient exiger ce type d'interactions. Il a ainsi été démontré, toujours par l'équipe de Sprent il y a quelques années, que la population mémoire particulière $CD8^{+}CD44^{hi}CD122^{lo}$ était par exemple dépendante d'un signal tonique du TCR pour sa survie[447].

Concernant le contrôle de la mort cellulaire des lymphocytes T mémoires, les données sont encore plus parcellaires. Alors qu'on pourrait supposer un rôle majeur des molécules telles que Bim ou Fas dans ce processus, les animaux déficients pour l'une ou l'autre de ces protéines ne présentent que peu ou pas d'accumulation de ces populations mémoires. En effet, l'origine de la population $CD4^{-}CD8^{-}B220^{+}$ dans les souris gld ou lpr déficientes pour FasL ou Fas respectivement est débattue et ne présente pas forcément les caractéristiques d'une population mémoire[423,424]. De la même façon, dans les souris Bim KO, il existe une expansion de l'ensemble du compartiment T sans réelle surreprésentation d'une population spécifique, notamment mémoire.

Comme pour les lymphocytes T naïfs, la compétition vis-à-vis des différents facteurs de survie (IL-7 pour les CD4 et les CD8, IL-15 pour les CD8 notamment) semble jouer un rôle majeur dans l'homéostasie des lymphocytes T mémoires[375]. Il a ainsi était démontré dans des modèles animaux comment des infections virales successives, en générant une nouvelle population mémoire spécifique du pathogène, causent l'attrition du pool des lymphocytes mémoires spécifiques d'un autre virus antérieurement rencontré, à la manière de vases communicants[448]. Freitas et Rocha ont largement documenté ce concept de niche où les lymphocytes T, qu'ils soient naïfs, activés ou mémoires, entrent en compétition pour leur survie notamment via un engagement « cognate » répété de leur TCR[449].

2.6. Genèse de la population T mémoire « non conventionnelle »

Nous avons parlé jusqu'à présent de la genèse de la mémoire qu'on peut qualifier de conventionnelle, c'est-à-dire en réponse à un agent pathogène et dont la compréhension est la clé de voûte des thérapies vaccinales. Nous allons à présent aborder la question de l'origine des cellules d'un organisme qui présentent un phénotype « mémoire-like », c'est-à-dire notamment $CD44^{hi}$. La raison pour laquelle nous abordons cette question provient des résultats que nous avons obtenus au cours de ce travail de thèse. En effet, comme nous le développerons dans la partie « résultats » de ce manuscrit, des injections répétées de *Streptococcus pneumoniae* inactivé à la chaleur chez des souris p53 déficientes

ont entraîné un biais de développement tumoral vers la lymphomagénèse T périphérique, la contrepartie cellulaire normale de ces lymphomes semblant correspondre à un lymphocyte T mémoire effecteur chroniquement stimulé via son TCR. Néanmoins, nous montrons qu'il existe chez ces souris une incidence non négligeable spontanée de lymphomes T périphériques de phénotype globalement superposable (à quelques différences près qui seront détaillées). Dès lors, il apparaît fondamental de savoir comment, chez une souris élevée en conditions « propres » (animalerie SPF : specific-pathogen free) se développe cette population T de phénotype mémoire.

Etant donné la similitude phénotypique entre les cellules T de « phénotype mémoire » et les lymphocytes T mémoires spécifiques d'un antigène, il a longtemps été supposé que cette population constitue la descendance de cellules T ayant répondu à un antigène environnemental. Néanmoins, cette conception est largement remise en cause par la présence de ce type de cellules bien avant la naissance chez l'homme[450,451] et chez des souris maintenues en conditions « germ-free » voire « antigen-free »[452-454]. Actuellement, on pense que l'origine vraisemblable de ces cellules serait des lymphocytes T ayant répondu à une stimulation auto-antigénique. L'acquisition, lors de la prolifération de lymphocytes T naïfs transférés dans une souris receveuse lymphopénique (appelée prolifération homéostatique), d'un phénotype mémoire vient largement soutenir cette hypothèse[392,455]. Cette prolifération homéostatique est dépendante à la fois de contacts TCR/CMH-peptide du soi et de la présence en fortes quantités d'IL-7[456,457]. Un parallèle a donc été proposé entre cette population de phénotype mémoire et le processus de prolifération homéostatique pour expliquer la présence de ces cellules de phénotype mémoire dès la période fœtale ou chez des souris élevées en conditions « stériles »[458]. Ainsi, près de 10 à 30% des lymphocytes T CD8 spécifiques pour un tétramère particulier sont de phénotype mémoire chez une souris n'ayant pourtant jamais été préalablement immunisée contre l'antigène correspondant à ce tétramère[459]. Ces résultats ne semblent pas dus à une réactivité croisée contre ce tétramère (par ressemblance à un antigène environnemental rencontré par l'animal) puisqu'ils sont vérifiés quel que soit le tétramère et chez des souris élevées en conditions « germ-free »[460]. Des données similaires sont retrouvées chez la plupart des animaux exprimant un TCR transgénique dans un fond RAG KO alors qu'ils n'expriment pas l'antigène spécifique de ce TCR[460].

L'ensemble de ces études a porté en majorité sur les populations CD8, les CD4 étant largement moins sensibles à la prolifération homéostatique et l'origine des CD4 de phénotype mémoire étant probablement largement plus complexe[392]. A titre de comparaison, la quasi-totalité des lymphocytes T CD4 spécifiques d'un antigène contre lequel l'animal n'a pas été immunisé (identifié par un marquage tétramère spécifique comme précédemment) sont de phénotype naïf[461].

Ces cellules T CD8 de phénotype mémoire étant capables de répondre, proliférer et sécréter de l'IFN-γ rapidement en réponse à un pathogène, leur prédominance aux âges extrêmes de la vie (chez le nouveau-né probablement en réponse à une prolifération homéostatique et chez le sujet âgé en réponse à des stimulations répétées auto-antigéniques au cours de la vie de l'individu) pourrait permettre de contrebalancer une vulnérabilité accrue par ailleurs[460]. Pourtant, à l'heure actuelle, la question de savoir exactement pourquoi et comment une proportion de cellules T naïves se différencie en

lymphocytes de phénotype mémoire en réponse à des auto-antigènes, chez des animaux non immunisés, reste un mystère. Plusieurs explications ont été avancées parmi lesquelles une augmentation transitoire de concentration en cytokines γ_c telles que l'IL-7, l'IL-15 ou l'IL-2, puisque l'ajout exogène des 2 dernières ou l'hypersécrétion de la première dans la prolifération homéostatique reproduisent l'acquisition d'un phénotype mémoire similaire. Ainsi, la présence de cosignaux activateurs –des cellules T naïves sont ainsi capables d'acquérir un phénotype mémoire en présence de cellules dendritiques pré-activées par une coculture préalable avec un pathogène[462]-, la perte de cosignaux inhibiteurs (PD-1, CTLA-4)[463] ou encore la modulation du signal TCR ont été avancées comme autant d'explications plausibles.

D. Conclusion

Comme nous avons pu le constater dans cette introduction bibliographique, l'hypothèse d'une transformation oncogénique indirecte favorisée par des agents pathogènes responsables d'infections chroniques fait peu de doute dans la lymphomagénèse B. Le modèle princeps du lymphome du MALT gastrique associé à *H. Pylori* a largement contribué à la compréhension de ce type de mécanisme physiopathologique. En revanche, la lymphomagénèse T, murine ou humaine, reste, de manière générale, largement moins bien comprise que la lymphomagénèse B. Plusieurs raisons peuvent l'expliquer :

1/ La fréquence nettement plus faible des hémopathies lymphoïdes T comparativement aux hémopathies lymphoïdes B ;

2/ La complexité du système immunitaire adaptatif lymphocytaire T, comprenant de nombreux sous-types (CD4, CD8, DN) eux-mêmes subdivisés en multiples catégories aux fonctionnalités diverses (naïf, mémoire, cytotoxique, Th1, Th2, T_{FH}, régulateurs…) ;

3/ L'absence de répartition anatomique définie pour chaque sous-type, rendant la détermination de la contrepartie cellulaire normale délicate dans le cas des lymphomes T matures ;

4/ L'absence de marqueurs univoques permettant d'identifier de façon simple et reproductible un type donné de lymphocyte T, notamment en immunohistochimie, technique la plus à même d'être utilisée en routine pour le diagnostic ;

5/ L'absence de thérapeutique particulière dans cette pathologie jusqu'au début des années 2000, l'ensemble des lymphomes T ayant été traité jusque là, peu ou prou, de façon identique quel que soit le sous-type.

Néanmoins, comme nous avons pu le voir dans cette partie introductive, il existe un rationnel fort pour que certaines hypothèses physiopathologiques, telles que le rôle de la stimulation antigénique chronique, soient également vérifiées dans le cas de la lymphomagénèse T. Comme nous le verrons dans la partie « Résultats » de cette thèse, le modèle murin étudié vient conforter cette hypothèse et ouvre de nouvelles perspectives à la fois quant au démembrement des lymphomes T humains mais aussi quant à de nouvelles cibles thérapeutiques telle que la voie du TCR ou un rétablissement fonctionnel de la voie p53.

RESULTATS

Chronic TCR stimulation by bacterial antigens promotes natural-killer T cells lymphomagenesis in p53-deficient mice.

Emmanuel Bachy[1,6], Gabriel Bricard[1], Alexandra Traverse-Glehen[2,3], Sophie Gazzo[2,4], Lucile Baseggio[2,5], Martine Ffrench[2,5], Paul Mondière[1], Morgan Taillardet[1], Gilles Salles[2,6], Patrice Marche[7], Thierry Defrance[1], Laurent Genestier[1]

[1]INSERM U851, Lyon, France
[2]UMR CNRS 5239, Lyon, France
[3]Department of pathology, Hospices civils de Lyon, Lyon, France
[4]Department of cytogenetics, Hospices civils de Lyon, Lyon, France
[5]Department of cytology, Hospices civils de Lyon, Lyon, France
[6]Department of hematology, Hospices civils de Lyon, Lyon, France
[7]Institut Albert Bonniot, INSERM/UJF U823, Grenoble, France

Corresponding author:
Laurent Genestier, INSERM U851, 21 avenue Tony Garnier, Lyon France.
Tel: +33 (0)4 3728 2455 / Fax: +33 (0)4 3728 2341
Email: Laurent.genestier@inserm.fr

Key words: peripheral T-cell lymphoma, TCR, chronic antigenic stimulation, p53.

INTRODUCTION

From 1950 to 1990, a 50% increase in age-adjusted incidence of non-Hodgkin lymphomas (NHL) has been documented in the United States. The incidence appeared to slow in the late 1990s but is still increasing for some particular subtypes (eg, marginal zone or mantle cell lymphomas).[1] No clear explanation has been given to understand such an increase. Ageing of the population, improvement of diagnostic technologies or emergence of lymphomas associated to immunosuppression in human immunodeficiency virus (HIV)-positive patients are not sufficient to explain this increase over time.[2,3] Among several other explanations, relationships between infectious agents and lymphoproliferative disorders have been suggested for the increased incidence of NHL. Although these relationships have been extensively studied for the last two decades, no clear pathological model has emerged so far. Infection-driven lymphomas might be thought of as being split into 2 distinct mechanisms.[4] On one hand, direct lymphocyte transformation by a given agent such as lymphotropic transforming viruses (eg, EBV, HHV8, or HTLV1) expressing viral oncogenes has been clearly demonstrated. On the other hand, a more recently described mechanism referred to as the indirect transformation model has emerged, among which *Helicobacter Pylori*-associated gastric MALT lymphoma might be the best characterized. In addition to *H pylori*, several other pathogens are suspected to indirectly promote B-cell lymphoma development (eg, *Campylobacter jejuni*, *Borrelia burgdorferi* or *Chlamydia psitacci* among others)[5] or T-cell lymphoid malignancies development (eg, the cytomegalovirus)[6]. According to this model, the microbial or viral pathogen is neither intrinsically transforming nor oncogenic, but can be viewed as a chronic source of antigens increasing the proliferative rate of lymphoid effectors, hence fuelling the transformation process. A role for B-cell (BCR) or T-cell receptor (TCR) signaling in B- or T-cell lymphomagenesis, respectively, has indeed been inferred recently from several studies either in engineered mouse models[7-9] or by indirect evidence in humans.[10,11] Collectively, growing body of evidence is accumulating lately in favor of a crucial role of BCR/TCR stimulation with various self or exogenous antigens for a broad variety of mature lymphomas. Precise elucidation of the mechanism underlying this indirect lymphomagenesis may provide important clues for diagnosis and therapy of this type of lymphomas.

Streptococcus Pneumoniae (*Spn*) is an extracellular polysaccharide-encapsulated bacteria whose role in promoting lymphoid malignancies has been proposed.[12,13] However, identifying a pathogen as a putative cause of lymphoma development requires that it can trigger the disease in an animal model. To the best of our knowledge, only chronic infection with *Helicobacter felis* or *H helmanii* in Balb/c mice is able to reproduce gastric marginal zone lymphoma development resembling the human pathology and fulfills such a requisite.[14,15] Therefore, animal models are critically lacking to explore the link between indirectly transforming infections and lymphomagenesis.

p53-deficient mice are prone to solid or hematopoietic tumor development.[16,17] Aside from basic studies into the mechanisms of p53 function, p53-deficient mice are suitable to develop more sensitive rodent models of tumorigenesis in response to environmental factors such as carcinogens, inflammation or radiations.[18,19] Given that p53-deficient mice spontaneously develop mature lymphoid

malignancies at low rate[20] we hypothesized chronic stimulation with *Spn*-derived antigens might promote or accelerate lymphoma development arising from chronically stimulated lymphocytes.

Consistent with this hypothesis, repeated stimulations with heat-killed (HK)-*Spn* lead to a marked and significant increase of peripheral T cell lymphomas (PTCL) in both $p53^{-/-}$ and $p53^{+/-}$ mice. Phenotype was consistent with a transformation process occurring from stimulated effector memory-phenotype T cells. Further investigations demonstrated that those PTCL arose from antigen-experienced invariant natural killer T (iNKT) cells and indirect evidence suggests that development of PTCL after repeated HK-*Spn* injections might be TCR-specific for *Spn* glycolipids. This study demonstrates for the first time that iNKT cells can give rise to lymphoma in mice. Furthermore, aside from its well-described function to prevent immature thymic T-cell lymphoma development, our results also suggest a pivotal function of p53 to prevent transformation of stimulated mature iNKT cells. The extent to which previously unspecified PTCL in humans derive from iNKT cells remains under investigation.

RESULTS

Repeated injections of heat-killed *streptococcus pneumoniae* increase PTCL in p53-deficient mice.

$p53^{-/-}$ or $p53^{+/-}$ mice were chronically injected by intraperitoneal (IP) route every 2 weeks until disease development either with PBS (control group) or HK-*Spn* (further on referred to as *Spn*). Three different types of lymphoma were observed based on macroscopic and flow cytometry findings (Figure 1A). In agreement with previous reports[16,17], the first type was thymic lymphomas (TL) that could be subdivided into localized TL, when only thymus was macroscopically involved or generalized TL, when it has spread to liver and spleen. The second was defined as PTCL since no macroscopic thymic involvement was observed as opposed to a massive hepatomegaly and splenomegaly (confirmed also on immunophenotypic, cytogenetics and gene expression profile characteristics, see latter). The third was B-cell lymphoma characterized mainly by enlarged mesenteric lymph nodes and mild liver and spleen enlargement. T-cell *vs* B-cell determination was established by flow cytometry using anti-CD3 and anti-CD19 staining on single-cell suspensions from involved organs (Figure 1A). Strikingly, both in $p53^{-/-}$ and $p53^{+/-}$ mice, PTCL were significantly overrepresented in the *Spn*-injected group compared to the control group (P=.03 and P=.01 respectively, Figure 1B). No difference both in terms of survival or tumor spectrum (solid *vs* hematopoietic) was observed in $p53^{-/-}$ mice between the PBS-injected control group and the *Spn*-injected experimental group (Supplemental Figure 1A). Conversely, in $p53^{+/-}$ mice, repeated *Spn* injections shortened survival (P=.004) primarily by accelerating the development of solid tumors (P=.007) (Supplemental Figure 1B). Of note, the increased frequency of B-cell lymphomas in the control group of $p53^{+/-}$ mice was in fact due to the bias generated by accelerated development of solid tumors in the *Spn* group. Hence, the late onset of those B-cell lymphomas (none appeared before 450 days of life) precluded their development within similar proportions in the *Spn*-injected group in which the number of mice at risk after day 450 was greatly diminished (Supplemental Figure 1C). No such a bias was observed for PTCL development in $p53^{-/-}$ mice (Supplemental Figure 1D).

Negative TdT staining was observed across all PTCL samples analyzed and whatever the organ (thymus, spleen, liver, lymph node, lung and kidney) as opposed to a strong positive staining in all TL examined (Figure 1C), confirming the post-thymic (ie mature) origin of PTCL. Furthermore, all PTCL stained negative for c-kit by flow cytometry (data not shown). At the microscopic level, all organs examined (liver, spleen, lung, lymph nodes, bone marrow and kidney) were involved by a polymorphic infiltrate of small, medium and predominant large cells. Architecture was nodular and diffuse with massive infiltration leading to the effacement of the normal structure (Figure 1D). Mitoses were frequently observed.

We assessed clonality as well as transferability of these PTCL either in immunodeficient or immunocompetent mice (ie CD3ε KO or C57Bl/6 wild type mice respectively) (Figures 1E and 1F).

Thus, repeated *Spn* injections in p53-deficient mice significantly promote PTCL development.

PTCL are phenotypically different from TL and exhibit features of stimulated T cells.

Among PTCL observed across the study, TCRαβ bearing cells were much more frequently encountered (n=15) than TCRγδ (n=3). All PTCL had decreased expression of CD4 or CD8 co-receptor molecules, most of them being double negative, $CD8^{lo}$ or CD4 (Figure 2A). Cells were $CD44^{hi}CD25^{-}CD62L^{lo}CCR7^{-}$ in favor of an effector-memory T-cell phenotype (T_{EM}) and stainings were consistent across the different organs involved (ie spleen, liver, blood, lymph node and bone marrow) (Figure 2B and not shown). Activation markers such as CD69 or CD54 were significantly up-regulated in PTCL (Figure 2C) compared to TL and normal T cells. Strikingly, B220, a pan-B cell as well as an activation marker in T cells, was only expressed in virtually all PTCL at low or intermediate levels (Figure 2D). While the MFI of the different surface markers used were consistent across involved organs, B220 expression varied substantially with a usual negative expression in the liver and the blood, a low/intermediate level in spleen and bone marrow and an intermediate/high level in lymph node (Supplemental Figure 2A). Cytogenetic alterations of PTCL were examined using multicolor fluorescence *in situ* hybridization (M-FISH). In sharp contrast to the well documented aneuploidy observed in TL (and confirmed in 2 such lymphomas considered as positive controls),[21] no clonal translocation or chromosomes number alteration were observed in PTCL, giving strong support to a distinct pathophysiological transformation process (Table 1 and Figure 3).

Gene expression profile and *ex vivo* experiments confirm that PTCL is a distinct entity whose survival depends on TCR pathway activation.

We compared the gene-expression profiles (GEP) of freshly isolated and sorted TL, PTCL and normal T cells (either resting or activated *ex vivo* for 3 days with anti-CD3/anti-CD28 coated-beads). GEP analysis showed that the proliferative marker Ki67 was one of the highest overexpressed gene in PTCL compared to normal resting T cells (Supplemental Figure 3A) and that was confirmed by immunohistological staining with anti-KI67 antibody (Supplemental Figure 3B). In keeping with surface staining analysis by flow cytometry, CCR7 and CD62L were among the most down-regulated genes in GEP analysis (Supplemental Figure 3A). Using unsupervised hierarchical clustering and principal component analysis (CPA), we confirmed that PTCL were distinct from TL and that both of these tumors differed from normal resting or activated T cells (Figures 4A and 4B). We next performed gene set enrichment analysis (GSEA)[22] using annoted gene sets from the Molecular Signatures Database (MSigDB)[23] to determine the concordance between significantly changed genes in PTCL and known gene signatures. We found that MYC was overexpressed in PTCL compared to resting T cells and that genes upregulated by MYC were significantly overexpressed (Figure 4C). GSEA also showed that gene expression profile was enriched for genes with established importance in antigen response[24] in PTCL compared to resting normal T cells (P=.005), supporting that PTCL might arise from antigen-experienced T cells (Figure 4D). Moreover, GSEA indicated a significant down-regulation of genes in the TCR signaling pathway (P=.009) previously reported in chronically

stimulated T cells. In particular, CD247 (CD3ζ), LCK and LAT are known to be down-regulated upon repeated stimulations arising in a context of chronic infection, autoimmunity of inflammation[25] and were found highly under-expressed compared to resting T cells (Figure 4D).

A key property of memory T cells generated after acute infection is their ability to persist without persistent antigen encounter. Conversely, during chronic infections such as HIV or HCV viral infections, survival of specific T cells relies on persistence of cognate antigens through repeated TCR engagements[26]. As a first approach to investigate this property in PTCL, 10^6 $CD8^{lo}$ PTCL cells (experiments were conducted either with cells from *Spn*- or PBS-PTCL) were transferred into WT or ß2-microglobulin homozygous deficient mice ($ß2m^{-/-}$, deficient for MHC class I or class I-like expression). In keeping with chronically stimulated T cells, practically no PTCL engrafted in $ß2m^{-/-}$ compared to WT mice ($P<.0001$, Figure 5A). To further test the role of TCR signaling in PTCL, we demonstrated that in vitro PTCL cells viability decreased in the presence of cyclosporin A (CsA), suggesting that their survival strongly relied on the calcineurin/NFAT interaction downstream of the TCR signaling pathway (Figure 5B). To examine the possible translation of this result in vivo, CsA was daily injected in mice transferred with 10^6 PTCL cells either to prevent lymphoma development (from d1 to d15 after the PTCL cell transfer) or to treat well advanced lymphomas (during 15 days after lymphomas became clinically apparent). In both cases, CsA significantly delayed PTCL development and prolonged mice survival (Figure 5C).

Collectively, the data demonstrate that PTCL is a distinct entity arising in p53-deficient mice from chronically TCR-stimulated T cells.

PTCL from *Spn*-injected and PBS-injected mice are similar entities but exhibit features of distinct TCR engagement.

As PTCL developed not only in *Spn*-injected $p53^{-/-}$ or $p53^{+/-}$ mice but also in PBS-injected $p53^{-/-}$ mice at a low frequency (ie, 6 out of 27 mice) and exhibited in both cases activation and chronic stimulation characteristics, we next evaluated if those 2 types of lymphomas (referred to as *Spn*-PTCL and PBS-PTCL thereafter, respectively) were perfectly similar or not. Based on GEP analysis, *Spn*-PTCL and PBS-PTCL were indistinguishable using unsupervised hierarchical clustering (Figure 6A). Similarly, CPA did not unequivocally segregated *Spn*-PTCL and PBS-PTCL giving support that the transformation occurred in a similar cell type and that oncogenic events driving the process were similar (Figures 6B). However, an unsupervised hierarchical clustering based on the MFI of different surface markers showed that at least some entities in *Spn*-PTCL might derive from cells which have been differently activated (Figure 6C). In particular, a cluster composed of 6 PTCL distinctly appeared as *Spn*-related lymphomas. Among selected markers, CD5 and CD127 were up-regulated whereas CD44 and CD122 were significantly down-regulated in *Spn*-PTCL compared to PBS-PTCL (Figure 6D).

Since CD5 and CD127 expressions are known to be associated to the strength of the TCR engagement on the surface of T cells, we hypothesized that both PBS- and *Spn*-PTCL arose similarly from the

transformation of stimulated T cells (as indicated by similar GEP) but that *Spn*-PTCL might result from the transformation of a T cell specific for the pathogen. As an indirect indication that PTCL following repeated *Spn* injections might be caused by a particular and specific TCR engagement by *Spn* antigens, a striking $V_ß$ repertoire usage bias was observed. Hence, 7 of 7 *Spn*-PTCL expressed $V_ß8$ as assessed by surface staining or RT-PCR instead of 1 out of 6 in PBS-PTCL ($P<.001$) (Figure 6E). Since complementary determining regions 3 (CDR3) of the TCR $V_ß$ chain is highly unique and can be used as a marker of the antigenic peptide, we sequenced the CDR3 region of all $V_ß8$ Spn-PTCL. Two of 6 CDR3 sequences of $V_ß8$ Spn-PTCL were identical (Figure 6F), suggesting a skewed TCR pattern indicative of an immunodominant antigenic stimulation of these clones.

PTCL thus result from the transformation of memory-phenotype stimulated T cells and evidence suggests *Spn*-PTCL could arise from a T cell bearing a TCR specific for a peculiar antigen of *Spn*.

***Spn*- and PBS-PTCL derived from invariant natural killer T (iNKT) cells**

Given the strong Vß8 repertoire bias observed in *Spn*-PTCL despite the absence of known pneumococcal superantigens, we hypothesized that PTCL in p53-deficient mice might arise from a population expressing a pre-determined Vß repertoire. Furthermore, recent data indicated an increased proportion of iNKT cells in spleen of $p53^{-/-}$ mice.[27] Besides, diacylglycerol-containing glycolipids from *Spn* were shown to bind invariant TCR of iNKT cells.[28] Collectively, these data lead us to consider that PTCL might derive from the transformation of iNKT cells. Staining with a CD1d-α-galactosylceramide (α-GalCer) tetramer showed that 3 of 3 TCRαβ *Spn*-PTCL tested so far were positive (Figure 7A and Table 1). Consistently with our previous GEP results which did not differentiate *Spn*- from PBS-PTCL, 3 of 3 TCRαβ PBS-PTCL were also positive for CD1d-α-GalCer tetramer staining (Table 1). Although cancer cells might undergo substantial evolution after an initial oncogenic event, identifying CD1d-restricted tumoral T cells unambiguously reflected their NKT derivation. Of note, the transcription factor PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger or ZBTB16), which directs the effector program of the NKT cell lineage, was significantly overexpressed in all analyzed PTCL either at the transcriptional (Figure 7B) or the protein level (figure 7C). Furthermore, high restriction of the Vß repertoire in favor of the Vß8 chain support those NKT cells are invariant. Analysis of the Vα repertoire of PTCL is awaited to confirm their iNKT nature.

Moreover, iNKT tumoral cells expressed typical low level of TCRβ and classical features of activated iNKT cells were observed such as PD-1 up-regulation and loss of NK1.1 expression (Figure 7D and not shown).[29,30] Consistent with a state of anergy, no proliferation either by ^{3}H-thymidine incorporation or CTV (cell trace violet) dilution could be observed after ex vivo stimulation of *Spn*-PTCL by anti-CD3/anti-CD28 coated-beads, PMA/ionomycin and irradiated splenocytes loaded for 12 hours with HK-*Spn* whole bacteria or lysates (data not shown). In step with the surface expression of CD122 and CD127 and like their iNKT normal counterpart,[31] survival of PCTL cells was highly dependent upon IL-15 and IL-7 (Figure 7E).

Sézary syndrome might derive from type II NKT cells

Recent data indicated that the transcription factor PLFZ could be overexpressed in human T-cell lymphomas/leukemias such as mycosis fungoides[32] and its leukemic variant Sézary syndrome (SS).[33] Moreover, gain as well as derepression of cMYC[34,35] and functional p53 inactivation are observed in a vast majority of Sézary syndrome cases.[36] Strikingly, an association between mycosis fungoides and *Borrelia burgdorferi* infection has been suggested[37] and NKT have been shown to recognize glycolipids from the bacteria.[38] Key function of IL-7 and IL-15 has also been described in those cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) entities[39] and, finally, CD1d expression level in non-tumoral peripheral blood mononuclear cells was described as one of the top 5 genes permitting the most accurate diagnosis of Sézary syndrome.[39]

We confirmed that PLZF was highly expressed in two SS cell lines (ie SeAx and HuT-78 cell lines, Figure 8A). However no staining with CD1d-α-GalCer tetramer was observed (Figure 8B). Since $V_{ß}$ and, to a lesser extent, V_{α} repertoire in T-cell malignancies have been investigated and no semi-invariant chain usage has been observed in a specific entity, it is however rather unlikely that CTCL could derive from invariant NKT cells. Rather, they could derive from the more recently characterized type II NKT cells that are CD1d-restricted as well but express a more variable TCR repertoire and lack a universal ligand such as α-GalCer. Such a difference between the p53-deficient mouse model and humans might be explained by the prevalence of type II NKT in humans.[40] Definitive confirmation using specific type II NKT tetramers is awaited.

DISCUSSION

Identifying the cell of origin from which lymphomas arise is a field of intense research and has been fruitfully applied for B-cell lymphoma classification.[41] Hence, unraveling the correlations between B-cell lymphoma subtypes and normal B-cell development helped understanding transformation mechanisms and formed the basis for current classification in humans as well as for differential therapies. Such a correspondence between normal development stages and the initiating cell in T-cell lymphoma is still lacking. Except for angio-immunoblastic T-cell lymphoma (AITL) whose normal counterpart was identified as follicular helper T cells (T_{FH}), the normal cellular derivation of most mature T-cell malignancies is still merely speculative.[42] The complexity of the T-cell adaptative immune system encompassing numerous subsets with effector, memory and regulatory functions might explain why PTCL remain still poorly defined. In the present study, we demonstrate for the first time that PTCL deriving from NKT cells (referred to as NKTL for NKT cells lymphoma) can develop in mice.

NKT cells recognize antigens presented by the non-classical MHC class I-like CD1d protein and are categorized as type I or type II NKT cells. Type I express a semi-invariant TCR (Vα14-Jα18 in mice or $V_{\alpha}24$-$J_{\alpha}18$ in humans paired with a limited repertoire of Vβ chains: $V_{ß}8.2$, $V_{ß}2$ or $V_{ß}7$ in mice and $V_{ß}11$ in humans) and was therefore referred to as invariant NKT (iNKT) cells.[43] All iNKT cells bind the potent TCR ligand α-GalCer. Type II NKT cells are CD1d-restricted as well but express a more variable TCR repertoire and lack a universal ligand such as α-GalCer thus hampering their full characterization.[43] NKT cells recognize both self lipid-based and foreign lipid-based antigens bound to CD1d. iNKT cells participate in the response to many microbial pathogens mostly after activation by inflammatory cytokines and self-antigens presented by CD1d. However, *Borrelia burgdorferi*[38] and more recently *Spn*[28] were reported to have glycolipid antigens specifically binding the iNKT cell TCR. Moreover, not only iNKT cells are able to recognize *Spn* glycolipids but $J_{\alpha}18$-deficient mice[44] and CD1d-deficient mice[45] which lack iNKT cells specifically or CD1d-restricted T cells, respectively, are more susceptible to *Spn* infection indicating those cells play a pivotal role in vivo in host defense. Whether in vivo activation of some iNKT cells in a context of pneumococcal infection is due partly to self-antigens presented by CD1d or strictly limited to specific *Spn* glycolipids remains under investigations.[28]

Repeated injections by heat-killed *Spn* significantly promoted the development of NKTL both in $p53^{+/-}$ and $p53^{-/-}$ mice. Unlike well described $CD4^{+}CD8^{+}$ double positive thymic T-cell lymphomas developed in p53-deficient mice, NKTL exhibited a normal or minute size thymus, a widespread involvement of all analyzed organs (bone marrow, lung, kidney, spleen and liver) and a lack of immature markers (TdT). Altogether, these findings lead us to consider these lymphomas as of post-thymic origin. Of note, a mild involvement by these peripheral lymphoma cells was found in the thymus without any enlargement, which is in line with the widespread involvement of virtually all organs and possibly the known capacity of mature T cells to re-enter the thymus.[46] Liver was predominantly involved in all diseased mice in agreement with the known preferential localization of

normal NKT cells. Several lines of evidence suggested a contribution of TCR engagement to the development of these NKTL: 1/ the cells expressed typical features of activated iNKT cells such as PD-1 up-regulation or NK1.1 loss of expression; 2/ cyclosporin A, a strong TCR signaling inhibitor, decreased cell survival *in vitro*, and prolonged mice survival following transfer of lymphoma cells into recipient mice; 3/ engraftment in ß2m$^{-/-}$ mice of NKTL was significantly reduced compared to engraftment in wild type mice (P<.0001). Although CD1d may exist as a ß2m independent form, CD1d is generally composed of a transmembrane glycoprotein (heavy chain) associated non-covalently with ß2m to form a heterodimer. We believe NKTL cells displayed a poor engraftment in ß2m-deficient mice because they rely on specific CD1d/TCR interactions to survive and/or proliferate. Transfers of NKTL cells into CD1d-deficient mice to assess a specific dependence on CD1d/TCR engagement are ongoing. Although survival of NKT cells does not require CD1d expression,[31] stimulated (repeatedly?) NKT cells could become addicted to their cognate antigen and use TCR signaling for long-term maintenance, hence resembling exhausted memory CD8$^+$ T cells in chronic infections.[47]

Although NKTL frequency dramatically increased in a context of chronic *Spn* stimulation, a quite unexpected finding was its low incidence in p53$^{-/-}$ PBS-injected mice thereby stressing that heat-killed pathogen injections were not mandatory. Characteristics were also in line with an activated NKT cell phenotype in this group of mice raising the question of whether the initiating cell might be the progeny of cells that have responded to various environmental or self-antigens. In this regard, it is tempting to speculate that the up-regulation of CD5 expression (which is tightly and positively correlated to the strength of the TCR engagement in conventional T cells)[48] and of CD127 (also described to be up-regulated in response to strong TCR signaling)[49] in Spn-NKTL, could reflect a cognate and strong engagement by *Spn* antigens compared to a tonic and weaker signaling by CD1d-self glycolipids complexes in spontaneously arising NKTL. However, CD1d-dependent but *Spn*-independent engraftment in wild type recipient of Spn-NKTL rises concerns about their precise TCR specificity. Whether tumoral cells became independent of CD1d-*Spn* glycolipids interaction but dependent of CD1d-self ligand interaction with their TCR or whether the TCR of these NKTL was not specific for *Spn* glycolipids is unsettled. However, our preliminary data demonstrating two identical Vß8 CDR3 sequences in *Spn*-NKTL of 6 tested so far, strongly suggest a skewed TCR repertoire, which might result from an identical *Spn*-glycolipid stimulation. This hypothesis will be directly investigated by assessing the binding of CD1d-*Spn* tetramers on *Spn*- *vs* PBS-NKTL. Moreover, although anergy of these NKTLs might hamper proper evaluation, specific stimulation with purified *Spn* glycolipids[28] could formally demonstrate *Spn*-specificity and is under investigation.

As opposed to humans in whom up to 50% NKT cells express CD8α,[50] mouse NKT cells generally do not express the CD8α molecule.[51] This view has been however recently challenged by demonstrating the presence of CD1d-α-GalCer tetramer CD8$^+$ NKT cells in Jα14 transgenic mice as well as in wild type mice at a very low frequency.[52] Even if a broad majority of NKTL in the present study were DN T cells and to some extent CD4$^+$ T cells (n=2), at least one NKTL developed in an *Spn*-injected p53-

deficient mice was clearly $CD8^+$ (Figure 2A), hence reinforcing the fact that NKT cells in mice can express $CD8^+$.

Conflicting results on a potential role of p53 in normal mature T-cell immune response have been published to date. p53 and p53-dependent genes have been shown to be up-regulated in T cells in response to mitogenic stimulation.[53] Studies published during the last 2 decades demonstrated no impairment in the ability of preactivated $p53^{-/-}$ T cells to undergo apoptosis following TCR engagement in an IL-2 and Fas-dependent manner (called activation-induced cell death)[54] and only a minor role in regulating antiviral T cell responses using lymphocytic choriomeningitis virus infection model.[55] However, more recent work indicated that naïve p53-deficient T cells exhibit higher proliferation and reduced apoptosis compared to WT T cells following TCR activation without CD28 costimulation, with CD28 engagement partially rescuing WT T cells from this p53-mediated apoptosis.[56] Other intriguing observations have been published confirming a potential role of p53 in mature T-cell immune response. Hence the accumulation of memory-phenotype T cells have been described as soon as after 5 weeks of age in $p53^{-/-}$ mice compared to WT counterpart.[57] Moreover, increased generation of $CD8^+$ T cell clones from p53-mutant compared to WT T cells after immunization of mice with peptides of either Sendai or influenza virus origin have been documented.[58] Finally, the former description of a specific role of p53 as a negative regulator of intestinal mucosal T cell cycling (comprising among others mucosa-associated invariant T cells or MAIT) compared to peripheral blood T cells[59] or the higher number of iNKT cells in spleen of p53-deficient mice might stand for a previously unrecognized and specific role of p53 in unconventional T cells homeostasis.

Repeated engagements by self or non-self antigens as well as constitutive signaling downstream of the BCR now emerge as mechanisms by which human B-cell type lymphomas might develop and expand.[60] An analogous role of chronic antigenic stimulation *via* TCR signaling in mature T-cell malignancies development is far less documented. However, recent data in mouse model indicated that constitutive TCR signaling by the fusion kinase ITK-SYK drives transformation of mature T cells[61] or that $SNF5^{-/-}$ mice develop TCR-dependent PTCL arising from a peculiar $CD8^+CD122^{lo}$ IL-15 independent memory T cell.[62] In humans, chronic T cells stimulation by pathogens or self-antigens is speculated for various types of lymphomas: enteropathy-associated T-cell lymphoma in patients suffering from coeliac disease,[63] T-cell large granular lymphocyte leukemia,[64] hepatosplenic γδ T-cell lymphoma[65] and mycosis fungoides[37] or its leukemic variant called Sézary syndrome. Our preliminary data strongly support that the Sézary syndrome indeed derives from type II NKT cells but definitive confirmation is awaited. As the TCR from NKT cells might recognize a large panel of antigens, direct or indirect (by cytokines and self-glycolipids) chronic stimulation of this particular cell population could arise in host defense against many pathogens and might explain why the role of other pathogens than *B. burgdorferi* have been proposed.[66-70] Aside from NKT cells, other unconventional T cells recognize non-classical MHC molecules such as CD8αα TCRαβ intra-epithelial lymphocytes or MR1-specific mucosal invariant T (MAIT) cells. In addition to mycosis fungoides and Sézary syndrome, it

is therefore tempting to speculate that a previously unsuspected number of T-cell lymphomas could derive from the transformation of non-conventional T cells since the cell of origin is yet undetermined. Hence, it is striking that in enteropathy-associated T-cell lymphoma, which is supposed to be a key model for an antigen driven process, virtually all cases present with a functional p53 pathway impairment.[71]

In conclusion, our work describes a previously unrecognized lymphoma entity emerging from iNKT cells in mice. Moreover and aside from its known role in immature T-cell lymphoma development and in progression of B-cell malignancies, it sheds light on an unsuspected function of the p53 pathway in preventing "unconventional" T-cell lymphomagenesis. The present work also highlights the potential contribution of chronic or repeated infections in the disease, taken the broadly admitted concept of chronic stimulation for B-cell lymphoma to an all new level for T-cell lymphoma. Identifying iNKT cell lymphomas in humans await confirmation but might alter current classification, prognosis assessment and therapy.

MATERIALS AND METHODS

Mice

P53$^{-/-}$ mice (B6.129S2-*Trp53*^{tm1Tyj}/J) were purchased from The Jackson Laboratory. P53$^{+/-}$ mice were generated by crossing p53$^{-/-}$ mice with WT mice. WT mice were purchased from Charles River Laboratories (l'Arbresle, France). CD3ε$^{-/-}$ mice were obtained from Dr M. Malissen (Centre d'Immunologie Marseille-Luminy, France). Mice with a mutation in the β2 microglobulin gene (MHC class I-and class I-like-deficient) or in the I-Aβ gene (MHC class II-deficient) were provided by Christophe Benoist and Diane Mathis. All these mice were on the C57BL/6J background and were maintained in specific pathogen-free conditions at the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (Ecole Normale Supérieure de Lyon, Fance). All studies and procedures were approved by the Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale.

S. pneumoniae injections

The encapsulated serotype 3 WU2 strain of *S. pneumonia* was grown in Todd-Hewitt broth supplemented with 0.5% yeast extract to mid-log phase, then enumerated by plating the suspension on blood agar plates. Bacteria were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and heat-inactivated by a 1 hours incubation at 60°C. Aliquots of this suspension were stored at -80°C until use. At the time of injection, $5x10^6$ bacteria were diluted in 200µL sterile PBS for intraperitoneal injection as previously described[72]. Challenges were performed in a biosafety level 2 animal facility.

Flow cytometry analysis

Single-cell suspension prepared from spleen, mesenteric and/or mediastinal lymph nodes, liver and bone marrow were stained with a panel of fluorescent-labeled antibodies. Before staining, Fc receptors were blocked for 15 minutes at 4°C with 24G2 hybridoma supernatant. The following membrane antibodies (mAbs) reactive with murine cells were purchased from BD Biosciences: CD3ε (145-2C11), CD4 (GK1.5), CD8a (53-6.7), B220 (RA3-6B2), CD69 (H1.2F3), CD62L (MEL-14), CD54 (3E2), CD44 (IM7), CD25 (PC61), TCRß (H57-597), TCRγδ (GL3), CD5 (53-7.3), CD30 (mCD30.1), CD117 (2B8), CD24 (M1/69), CD95 (Jo2), CD103 (M290), CD19 (1D3), CD127 (A7R34), CD122 (TM-ß1), Vß5.1+5.2 (MR9-34), Vß8.1+8.2 (MR5-2), Vß8.3 (1B3.3). All antibodies used were used as direct conjugates to FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy5.5, APC, PE-Cy7, APC-Cy7, or AlexaFluor-647. PerCP-conjugated anti-Thy1.2 (30-H12) mAb reactive with murine cells was purchased from Biolegend. APC-conjugated anti-CCR7 (4B12), PE-conjugated anti-PD-1 (J43) and PE-conjugated anti-PLZF (Mags.21F7, anti-mouse and human) were purchased from eBioscience. PE-conjugated CD1d-α-GalCer tetramer (PBS57) was obtained from the NIH (NIH Tetramer Core Facility, Atlanta, GA) or APC-conjugated CD1d-α-GalCer tetramer (PBS57) from Proimmune (Oxford, UK). Empty tetramers were used as control. For all antibodies, corresponding isotype controls were purchased from the same supplier. Data were collected using a LSRII flow cytometer (BD) and analyzed with FlowJo software (Tree Star).

Clonality assessment

Peripheral T-cell lymphoma cells from involved spleen or liver were sorted on a BD FACSAria sorter. Murine T lymphocyte repertoire diversity was measured using Immun'Ig® tests (ImmunID Technologies, Grenoble, France). Genomic DNA was extracted using standard techniques and Multi-N-plex PCR were performed using an upstream primer specific of all functional members of a given TRBV family and a downstream primer specific of a given TRBJ segment (international ImMunoGeneTics information system, www.imgt.org). This assay allows the simultaneous exhaustive detection of V–J rearrangements in the same reaction. Each Vx–J1, J2, J3, J4, Jn product was separated as a function of its size and the Constel'ID® software (ImmunID Technologies, Grenoble, France) was used for further analytical studies including generation of 3D repertoires illustrations.

Tumor transplantation and cyclosporin A in vivo experiments

If not otherwise specified, $3x10^6$ freshly isolated whole splenocytes from lymphoma-bearing animals were transferred intravenously by retro-orbital injection into immunocompetent (ie C57BL/6J WT animals) or immunocompromised (ie $CD3\varepsilon^{-/-}$ mice) mice. For transfers into MHC class I-deficient (ie $ß2m^{-/-}$) or MHC class II-deficient (ie $Aß^{-/-}$) mice, 10^6 thawed tumoral cells from $CD8^+$ or $CD8^-CD4^-$ lymphomas isolated from liver and subsequently cryopreserved in 10% DMSO in liquid nitrogen were injected. For therapeutic trials, 20mg/Kg of cyclosporin A (Novartis Pharma) diluted in 200µL of PBS were injected dayly by intraperitoneal route for 15 days from day 1 following transfer of 10^6 thawed tumoral cells or when tumors became clinically apparent in the transplant-recipient mice (ie at day 21). All groups of mice were age- and sex-matched.

Immunostaining

For immunohistochemistry, mouse tissues (thymus, spleen, liver, kidney, lung and mesenteric or mediastinal lymph nodes) were fixed in 10% formaldehyde and paraffin-embedded. Sections of 4-µm thickness were stained for H&E or immunostained with the following antibodies: anti-TdT (A3524, Dako) and anti-Ki67 (SP6, Lab Vision). Sections were viewed using a Leica DMR microscope and images captured with a Nikon Digital Camera, DXM 1200C (Nikon, Tokyo, Japan).

Microarray analysis

Cell sorting. Thymic and peripheral T-cell lymphoma tumoral cells from thymus or liver, respectively, were sorted on a FACSAria sorter (BD). Purity was constantly over 98% (not shown). Pooled normal T cells from spleen and mesenteric lymph nodes from age-matched WT animal were used as control. For normal T-cell activation, anti-CD3/anti-CD28 coated beads (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) were used at a 1:1 bead-to-cell ratio in a 3-days culture.

Target labeling. Total RNA was extracted using TRIZOL Reagent (Invitrogen) and was amplified by two rounds of in vitro transcription (IVT) using ExpressArt® C&E mRNA amplification nano kit

(AmpTec GmbH, Hamburg, Germany). During the second IVT amplification RNA was biotin-labeled using BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, New York, USA). Before amplification, spikes of synthetic mRNA (GeneChip® Eukaryotic Poly-A RNA Controls, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) at different concentrations were added to all samples; these positive controls were used to ascertain the quality of the process. Biotinylated antisense cRNA quantification was performed with a Nanodrop 1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA) and quality checked with Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, Inc, Palto Alto, CA, USA).

Arrays hybridization, scanning and normalization. Hybridization was performed following Affymetrix protocol. Briefly, 15 µg of labeled cRNA was fragmented and denaturated in hybridization buffer, then 10 µg was hybridized on GeneChip® Mouse Genome 240 2.0 array (Affymetrix) during 16 hours at 45°C with constant mixing by rotation at 60 rpm in the Hybridization Oven 640 (Affymetrix). After hybridization, arrays were washed and stained with streptavidin-phycoerythrin (GeneChip® Hybridization Wash and Stain Kit) in the Fluidics Station 450 (Affymetrix) according to the manufacturer's instruction. The arrays were read with a confocal laser (GeneChip® Scanner 3000 7G, Affymetrix). The CEL files were generated using the Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC) software 3.0. The obtained data were normalized with Affymetrix Expression Console software using MAS5 statistical algorithm.

M-FISH

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

IL-7, IL-15 and cyclosporin A in vitro experiments

Lymphoma T cells viability was assessed after 24 hours of culture in medium alone or in medium supplemented with 10ng/mL of IL-7 (R&D) or IL-15 (R&D) or with increasing concentrations of cyclosporin A (Sigma-Aldrich). Viability was assessed by staining T cells with FITC-conjugated anti-AnnexinV at the indicated time.

Statistical analysis

All analyses were performed using GraphPad (GraphPad Software Inc) version 5.0. Histograms represent mean and error bars in all figures represent standard deviation (SD). Comparisons were made with the use of the χ^2 test or the Fisher's exact test when indicated for categorical variables and with the use of the Mann-Whitney non-parametric test from continuous parameter. Survival curves

were constructed with the Kaplan-Meier method and survival distributions were compared by the logrank test. All tests were 2-sided and a *p* value less than 0.05 was considered as statistically significant.

TABLES

Table 1. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization (M-FISH) analysis of cytogenetic alterations in thymic and peripheral T-cell lymphomas

#	Genotype	Organ	Type of T-cell lymphoma	Karyotype (M-FISH)
120405_1	$p53^{-/-}$	Thymus	Thymic	Aneuploid
120405_2	$p53^{-/-}$	Thymus	Thymic	Aneuploid
110705	$p53^{-/-}$	Spleen	Peripheral	Normal
110721	$p53^{-/-}$	Spleen	Peripheral	Normal
110830	$p53^{-/-}$	Spleen	Peripheral	Normal

Table 2. Characteristics of PTCL in p53-deficient mice.

#	Injections	p53 genotype	TCR	Vα chain$^{\infty}$	Vß chain$^{\infty}$	Coreceptor	CD1d-tetramer binding¶	PLZF¶
120412	PBS	-/-	αβ	Vα	Vß8.2	DN	+/-	+
120322	PBS	-/-	αβ	Vα	Vß	DN	+	+
120216	PBS	-/-	αβ	Vα	Vß	DN	n.d.	n.d.
111215	PBS	-/-	αβ	Vα	Vß	DN	+	+
120305	PBS	-/-	αβ	Vα	Vß	$CD8^{lo}$	n.d.	n.d.
120104	PBS	+/-	αβ	n.d.	n.d.	$CD4^{lo}$	n.d.	n.d.
110704	*Spn*	-/-	αβ	Vα	Vß8.2	$CD8^{lo}$		
110721	*Spn*	-/-	αβ	Vα	Vß8.3	DN	+	+
110826	*Spn*	-/-	αβ	n.d.	n.d.	DN	n.d.	n.d.
110828	*Spn*	-/-	αβ	Vα	Vß	$CD8^{lo}$	n.d.	n.d.
110829	*Spn*	-/-	αβ	Vα	Vß8.2	$CD8^{lo}$	n.d.	n.d.
110707	*Spn*	-/-	αβ	Vα	Vß8.2	$CD8^{lo}$	+	+
100920	*Spn*	+/-	αβ	n.d.	n.d.	DN	n.d.	n.d.
110711	*Spn*	-/-	αβ	Vα	Vß8	CD4	+	+
111004	*Spn*	+/-	αβ	Vα	Vß8.3	DN		
110412	*Spn*	+/-	αβ	n□□□	n.d.	CD4	n.d.	n.d.
111128	*Spn*	-/-	γδ	n.a.	n.a.	DN	-	+
110713	*Spn*	-/-	γδ	n.a.	n.a.	DN	-	+
110518	*Spn*	+/-	γδ	n.a.	n.a.	DN	n.d.	n.d.

$^{\infty}$Vα and Vß chains were determined using etheir antibody staining and flow cyometry analysis or RT-PCR ;
¶Assessed by flow cytometry analysis, after fixation and permeabilization for PLZF intracellular staining ;
Abbreviations : n.d., not determined (no frozen cells) ; n.a., not applicable ; DN, double négative.

FIGURES LEGEND

Figure 1. **Chronic stimulation by heat-killed *Streptococcus pneumoniae* (*Spn*) promotes peripheral (ie mature) T-cell lymphomagenesis in $p53^{-/-}$ and $p53^{+/-}$ mice**. **(A)** Macroscopic and phenotypic characteristics of the 4 different types of lymphoma encountered in $p53^{-/-}$ or $p53^{+/-}$ mice (thymus, blue arrow; spleen, yellow arrow; liver, red arrow; mesenteric lymph node, white arrow). Dot plots were gated on abnormal FSC^{high}/SSC^{high} tumoral cells. **(B)** Lymphoma spectrum in $p53^{+/-}$ and $p53^{-/-}$ mice according to the injection of PBS or *Spn* (in the middle of the donut chart is represented the absolute number of lymphomas in each condition). Groups of mice were as follows: PBS-$p53^{+/-}$, n=50; *Spn*-$p53^{+/-}$, n=53; PBS-$p53^{+/-}$, n=25; *Spn*-$p53^{-/-}$, n=16. **(C)** TdT staining of formalin-fixed and paraffin-embedded sections from thymi and spleens of representative localized or generalized TL or of a PTCL (100x magnification). **(D)** H&E staining of normal and PTCL-involved spleen and liver (insert shows higher magnification, ie 400x), as well as PTCL-involved lung and kidney (top, 50x; bottom, 200x). **(E)** Clonality assessment of the *TRBV* (variable region of the ß chain) locus by genomic multiplex PCR in a control wild type (WT) mouse and in 3 representative PTCL (of 11 analyzed specimen). **(F)** PTCL transferability in $CD3\varepsilon^{-/-}$ immunocompromised mice.

Figure 2. **PTCL in p53-deficient mice exhibit features of activated memory-phenotype T cells.** **(A)** Coreceptor expression in PTCL compared to either TL or normal $CD4^+$ or $CD8^+$ splenic T cells. **(B)** Representative surface staining of PTCL compared to normal splenic T cells (dark grey shaded histograms indicate PTCL; light grey shaded histograms indicate normal splenic T cells and dotted lines indicate isotype controls) **(C)** Expression of activation surface markers in PTCL compared to either TL or normal splenic T cells (*, $P<.05$, **, $P<.01$, ***, $P<.001$). Staining is expressed as the delta of the mean fluorescence intensity (ΔMFI)=(MFI of the surface marker – MFI of the respective isotype control) to avoid autofluorescence and unspecific staining differences between cells with a highly variable morphology.

Figure 3. **Normal diploid karyotype in PTCL as opposed to typical aneuploidy in TL**. Representative images of M-FISH of a PTCL (A) and a TL (B).

Figure 4. Gene expression profile analysis confirms PTCL are a distinct entity and display features of TCR signaling down-modulation. (A) Unsupervised hierarchical clustering based on global gene expression profile (GEP) analysis. Dendrogram at the top shows the samples studied and their relationships based on similarities in gene expression. PTCL samples included 9 TCRαβ lymphomas, TL samples included 3 $CD4^+CD8^+$ DP lymphomas and normal samples included resting T cells from 3 tumor-free $p53^{-/-}$ mice and *ex vivo* activated T cells from 3 other tumor-free $p53^{-/-}$ mice. The bar under the dendrogram is color-coded according to sample type. **(B)** Principal component analysis showing clustering of PTCL (red) *versus* TL (green) *versus* normal T cells (yellow and blue).

(C) MYC upregulation in PTCL based on GEP data compared to normal resting T cells and GSEA analysis of MYC-upregulated genes expression. Upward deflection of the green line indicates enrichment of MYC-upregulated genes signature within PTCL compared to naïve T cells. Heatmap shows expression of all genes included in the signature. **(D)** GSEA of a set of genes highly expressed in antigen-activated T cells. Upward deflection indicates enrichment of an antigen-activated signature within PTCL compared to naïve T cells. Heatmap shows expression of the first 50 genes included in the core enrichment of the signature. **(E)** GSEA of a set of genes from the TCR signaling pathway. Downward deflection indicates enrichment of a TCR signaling pathway signature in naïve T cells. Heatmap shows expression of all genes included in the signature. FDR, false discovery rate; NES, normalized enrichment score.

Figure 5. PTCL rely on TCR signaling for survival and engraftment. **(A)** Survival curves of WT mice or ß2m$^{-/-}$ mice (ie deficient for MHC class I and class-I related molecules) transferred with 10^6 cells from a CD8$^+$ PTCL. All mice alive at day 100 were sacrificed and absence of macroscopic lymphoma development was assessed. **(B)** Cells from PTCL were cultured *in vitro* in the presence or absence of increasing concentrations of cyclosporine A (CsA) (and equal concentrations of excipient, ie ethanol, as control). Data are shown as mean ± SD for quadruplicate of one PTCL and is representative of 4 experiments performed with 2 *Spn*-PTCL and 2 PBS-PTCL. **(C)** Mice were transferred with 10^6 cells from PTCL and left untreated or injected daily by IP route with 20mg/Kg of CsA either from day 1 for 2 weeks or from day 21 (ie when abdomen enlargement was clinically detectable) for 2 weeks as well.

Figure 6. PTCL from *Spn*-injected and PBS-injected mice exhibit features of distinct TCR engagement. (A) Unsupervised hierarchical clustering based on global gene expression profile (GEP) analysis. Dendrogram at the top shows the samples studied and their relationships based on similarities in gene expression. Samples included 5 PBS-PTCL (green) and 4 *Spn*-PTCL (purple). The bar under the dendrogram is color-coded according to sample type. **(B)** Principal component analysis showing clustering of PBS-PTCL (purple) *versus Spn*-PTCL (green). **(C)** Unsupervised hierarchical clustering based on the mean fluorescence intensity (MFI) of 10 distinct surface markers. Samples included 6 PBS-PTCL (green) and 8 *Spn*-PTCL (purple) with fully available data for these 10 surface markers. (D) Differential surface expression of CD127, CD5, CD44 and CD122 expressed as ΔMFI in PBS-PTCL *versus Spn*-PTCL (*, P<.05, **, P<.01). (E) $V_ß8$ usage in PBS-PTCL *versus Spn*-PTCL based on surface staining with anti-$V_ß8.1+8.2$ and anti-$V_ß8.3$ antibodies or based on RT-PCR with specific primers for the $V_ß8$ region.

Figure 7. *Spn*- and PBS-PTCL derived from invariant natural killer T (iNKT) cells. (A) Representative histogram of CD1d-α-GalCer tetramer staining in PTCL (shaded histogram indicates CD1d-α-GalCer tetramer staining and dashed line indicates empty tetramer staining). Dot plot was

sequentially gated on abnormal FSC^{high}/SSC^{high} and $CD3^{+}Thy1.2^{+}$ tumoral T cells. **(B)** PLZF expression based on genome expression profile in PTCL *versus* TL *versus* normal T cells. **(C)** Representative histogram of intracellular PLZF staining in PTCL (shaded histogram indicates PLZF staining and dashed line indicates isotype control). **(D)** Expression of surface TCRβ and PD-1 expressed as ΔMFI in PTCL *versus* normal splenic T cells (*, $P<.05$). (E) **(A)** Mortality of NKT lymphoma cells was assessed at 24 hours of *ex vivo* culture by AnnexinV staining. IL-7 (10ng/mL) or IL-15 (10ng/mL) was added to the culture medium. Data are shown as mean ± SD for quadruplicate of one PTCL and is representative of 6 experiments performed with 3 *Spn*-PTCL and 3 PBS-PTCL (***, $P<.001$).

Figure 8. Sézary syndrome might derive from type II NKT cells. **(A)** Representative histogram of intracellular PLZF staining of the SeAx Sézary syndrome cell line (shaded histogram indicates PLZF staining and dashed line indicates isotype control). **(B)** Representative histogram of CD1d-α-GalCer tetramer staining of the SeAx Sézary syndrome cell line (shaded histogram indicates CD1d-α-GalCer tetramer staining and dashed line indicates empty tetramer staining).

FIGURES

Figure 1

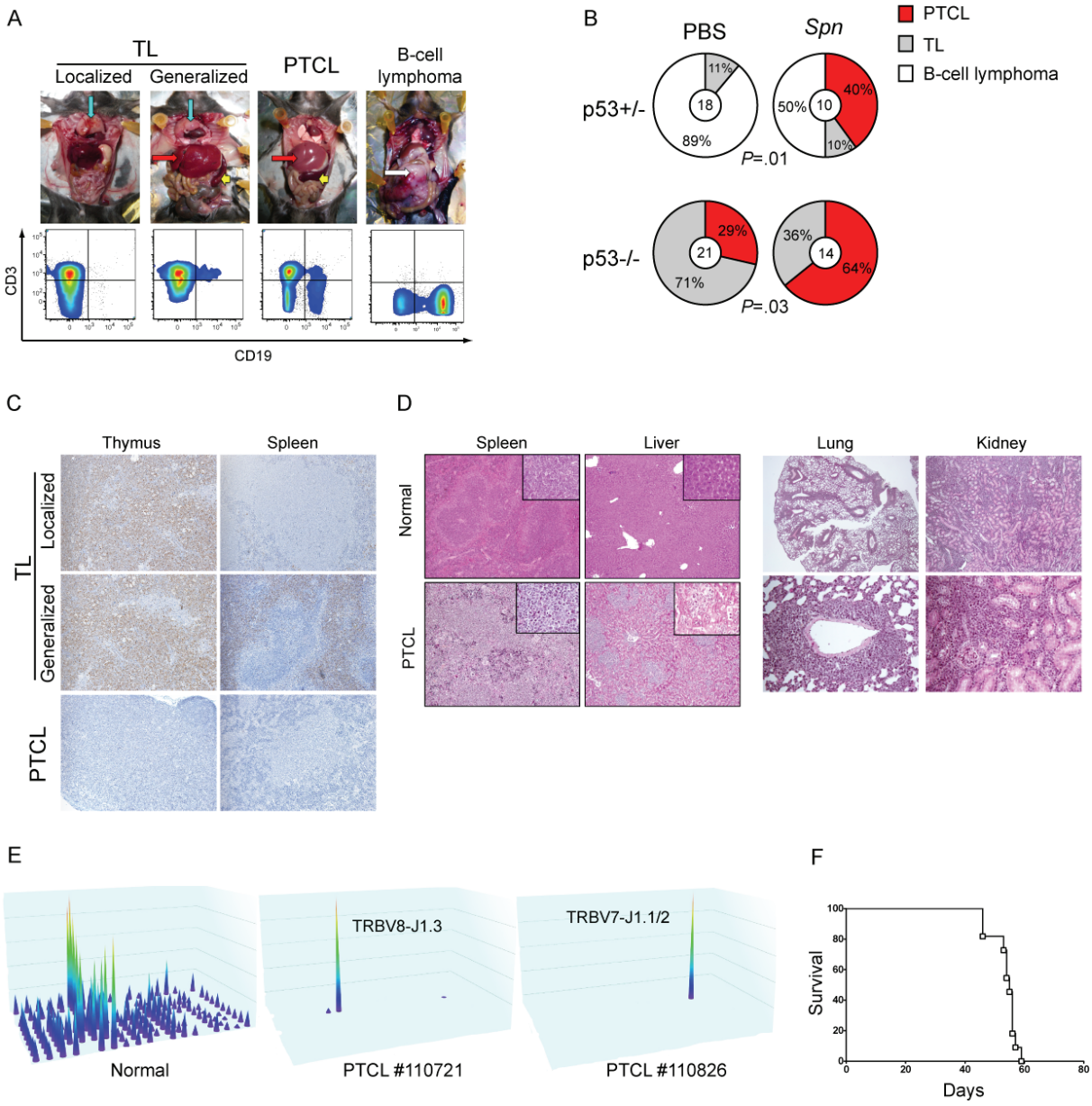


Figure 2

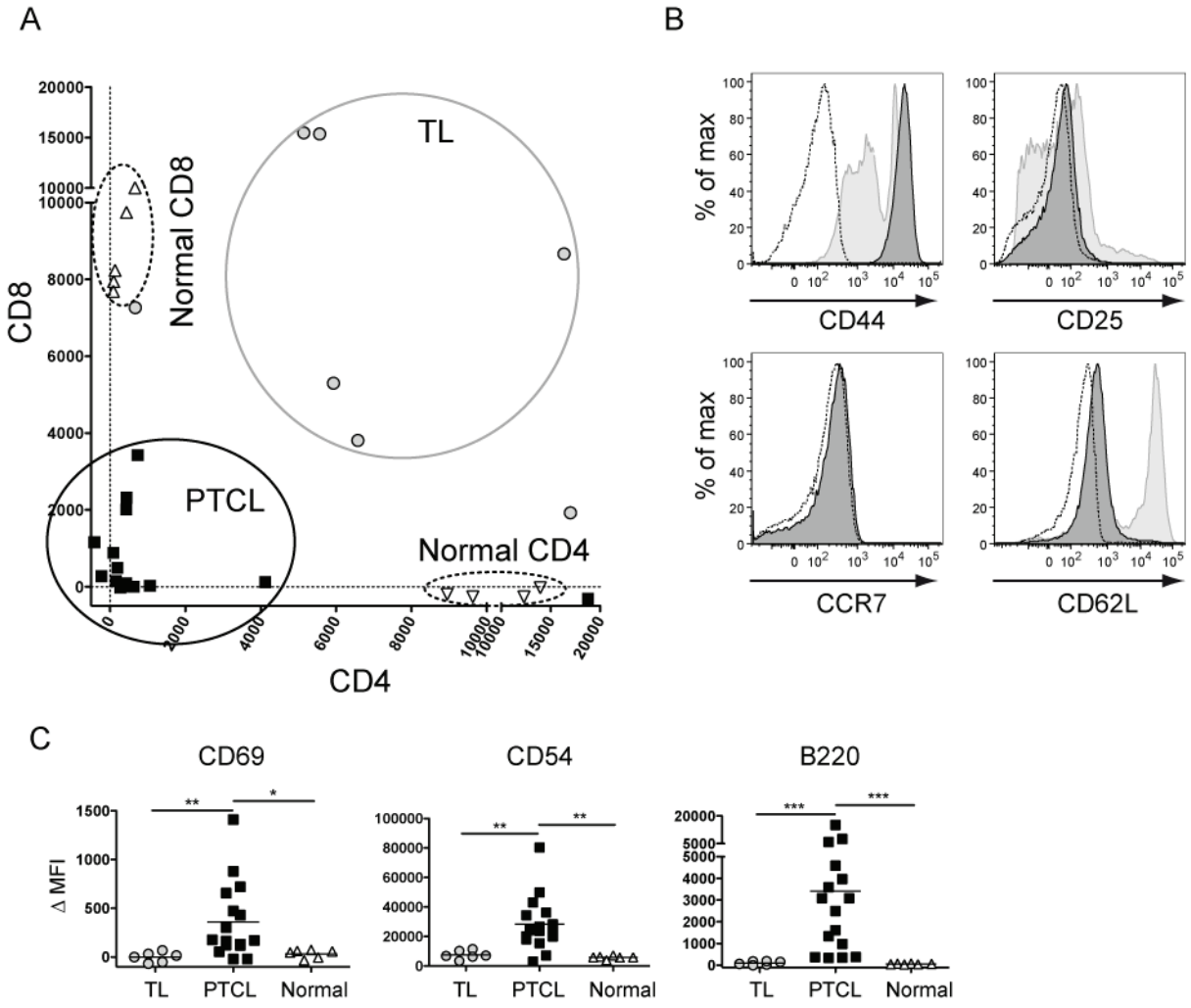

A
TL
Normal CD8
PTCL
Normal CD4
CD8
CD4
B
% of max
CD44
CD25
CCR7
CD62L
C
CD69
CD54
B220
Δ MFI
TL
PTCL
Normal

Figure 3

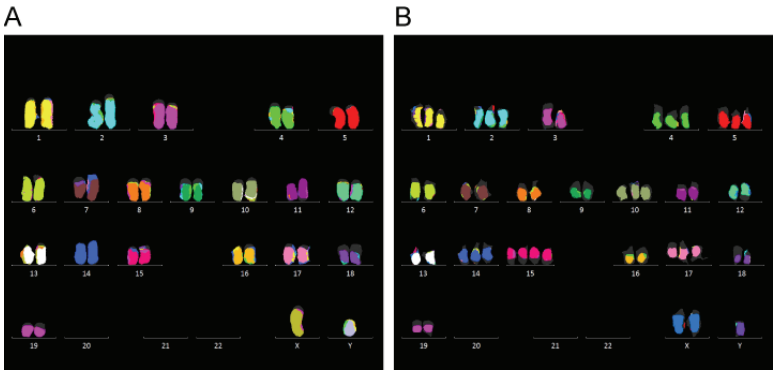


Figure 4

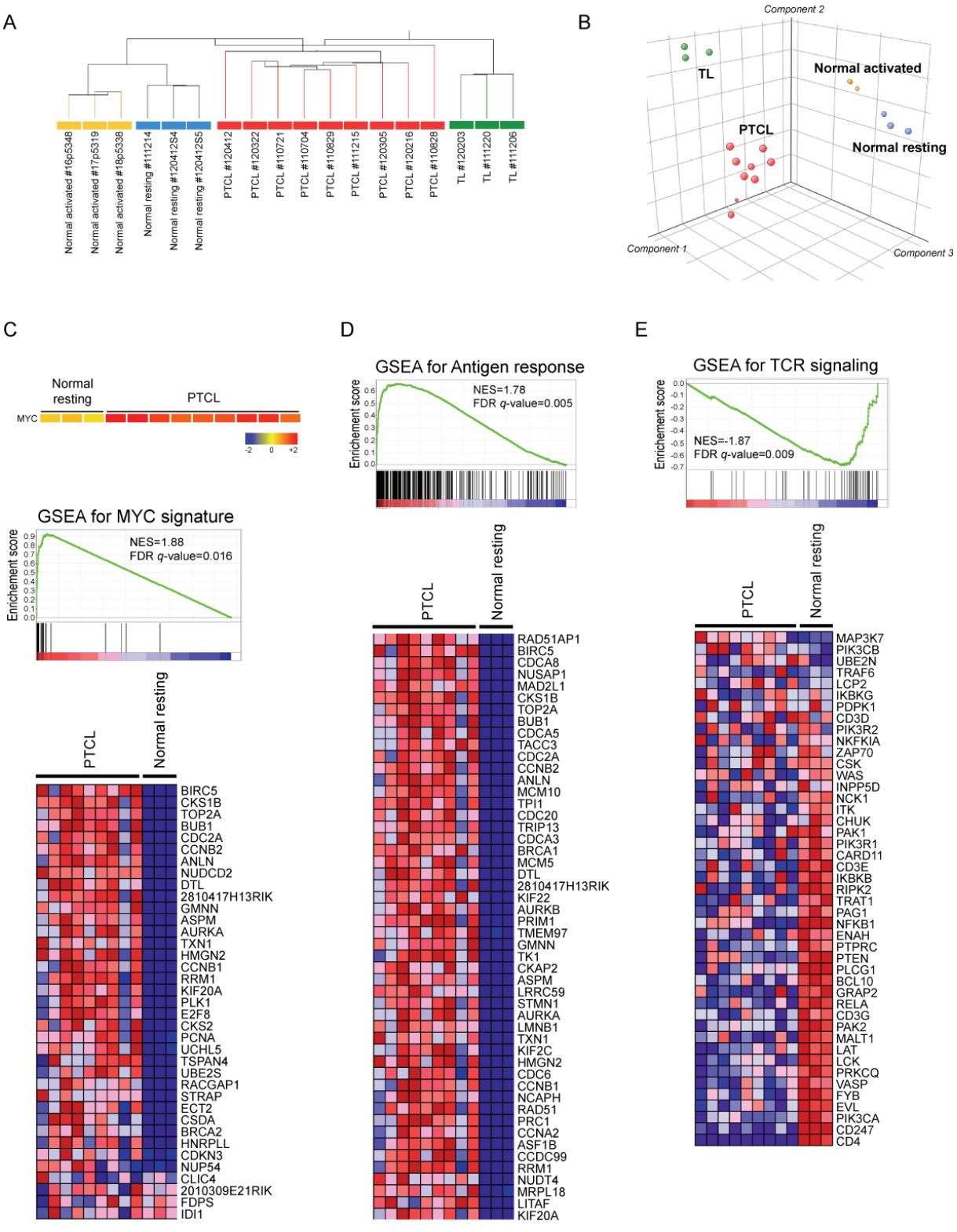

A
Normal activated #16p5348
Normal activated #17p5319
Normal activated #18p5338
Normal resting #111214
Normal resting #120412S4
Normal resting #120412S5
PTCL #120412
PTCL #120322
PTCL #110721
PTCL #110704
PTCL #110829
PTCL #111215
PTCL #120305
PTCL #120216
PTCL #110828
TL #120203
TL #111220
TL #111206
B
Component 2
TL
Normal activated
PTCL
Normal resting
Component 1
Component 3
C
Normal resting
PTCL
MYC
-2
0
+2
GSEA for MYC signature
Enrichement score
NES=1.88
FDR q-value=0.016
PTCL
Normal resting
BIRC5
CKS1B
TOP2A
BUB1
CDC2A
CCNB2
ANLN
NUDCD2
DTL
2810417H13RIK
GMNN
ASPM
AURKA
TXN1
HMGN2
CCNB1
RRM1
KIF20A
PLK1
E2F8
CKS2
PCNA
UCHL5
TSPAN4
UBE2S
RACGAP1
STRAP
ECT2
CSDA
BRCA2
HNRPLL
CDKN3
NUP54
CLIC4
2010309E21RIK
FDPS
IDI1
D
GSEA for Antigen response
Enrichement score
NES=1.78
FDR q-value=0.005
PTCL
Normal resting
RAD51AP1
BIRC5
CDCA8
NUSAP1
MAD2L1
CKS1B
TOP2A
BUB1
CDCA5
TACC3
CDC2A
CCNB2
ANLN
MCM10
TPI1
CDC20
TRIP13
CDCA3
BRCA1
MCM5
DTL
2810417H13RIK
KIF22
AURKB
PRIM1
TMEM97
GMNN
TK1
CKAP2
ASPM
LRRC59
STMN1
AURKA
LMNB1
TXN1
KIF2C
HMGN2
CDC6
CCNB1
NCAPH
RAD51
PRC1
CCNA2
ASF1B
CCDC99
RRM1
NUDT4
MRPL18
LITAF
KIF20A
E
GSEA for TCR signaling
Enrichement score
NES=-1.87
FDR q-value=0.009
PTCL
Normal resting
MAP3K7
PIK3CB
UBE2N
TRAF6
LCP2
IKBKG
PDPK1
CD3D
PIK3R2
NKFKIA
ZAP70
CSK
WAS
INPP5D
NCK1
ITK
CHUK
PAK1
PIK3R1
CARD11
CD3E
IKBKB
RIPK2
TRAT1
PAG1
NFKB1
ENAH
PTPRC
PTEN
PLCG1
BCL10
GRAP2
RELA
CD3G
PAK2
MALT1
LAT
LCK
PRKCQ
VASP
FYB
EVL
PIK3CA
CD247
CD4

Figure 5

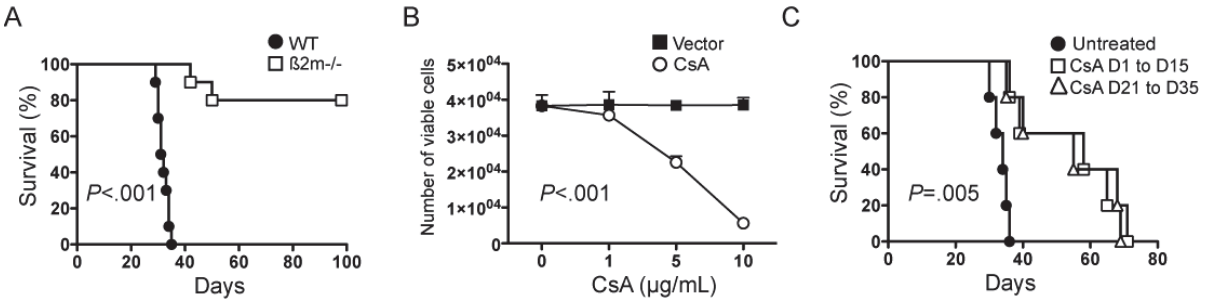

A
WT
ß2m-/-
Survival (%)
P<.001
Days
B
Vector
CsA
Number of viable cells
P<.001
CsA (µg/mL)
C
Untreated
CsA D1 to D15
CsA D21 to D35
Survival (%)
P=.005
Days

Figure 6

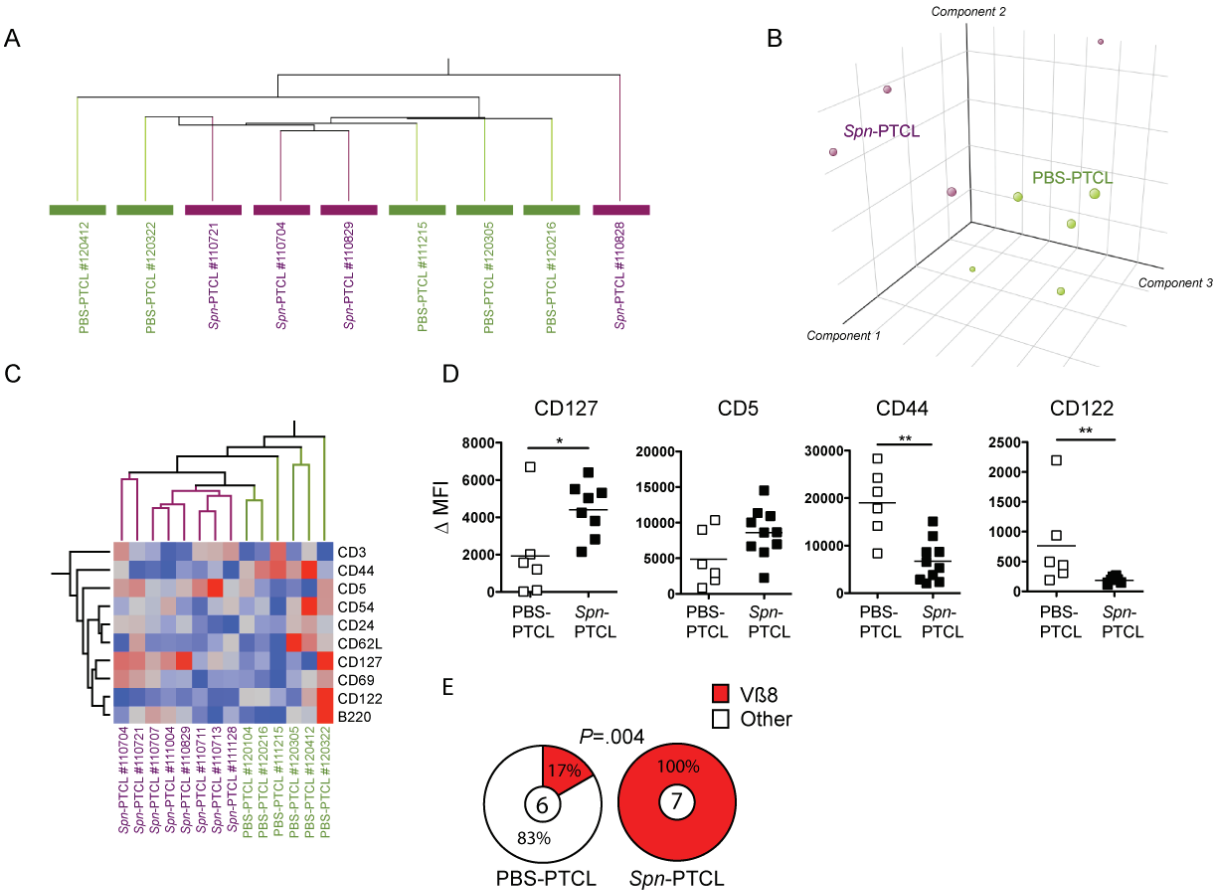

A
PBS-PTCL #120412
PBS-PTCL #120322
Spn-PTCL #10721
Spn-PTCL #10704
Spn-PTCL #10829
PBS-PTCL #111215
PBS-PTCL #120305
PBS-PTCL #120216
Spn-PTCL #10828
B
Component 2
Spn-PTCL
PBS-PTCL
Component 3
Component 1
C
CD3
CD44
CD5
CD54
CD24
CD62L
CD127
CD69
CD122
B220
Spn-PTCL #110704
Spn-PTCL #10721
Spn-PTCL #10707
Spn-PTCL #11004
Spn-PTCL #10829
Spn-PTCL #10711
Spn-PTCL #10713
Spn-PTCL #11128
PBS-PTCL #120104
PBS-PTCL #120216
PBS-PTCL #111215
PBS-PTCL #120305
PBS-PTCL #120412
PBS-PTCL #120322
D
CD127
CD5
CD44
CD122
Δ MFI
PBS-PTCL
Spn-PTCL
E
Vß8
Other
P=.004
17%
83%
6
100%
7
PBS-PTCL
Spn-PTCL

Figure 7

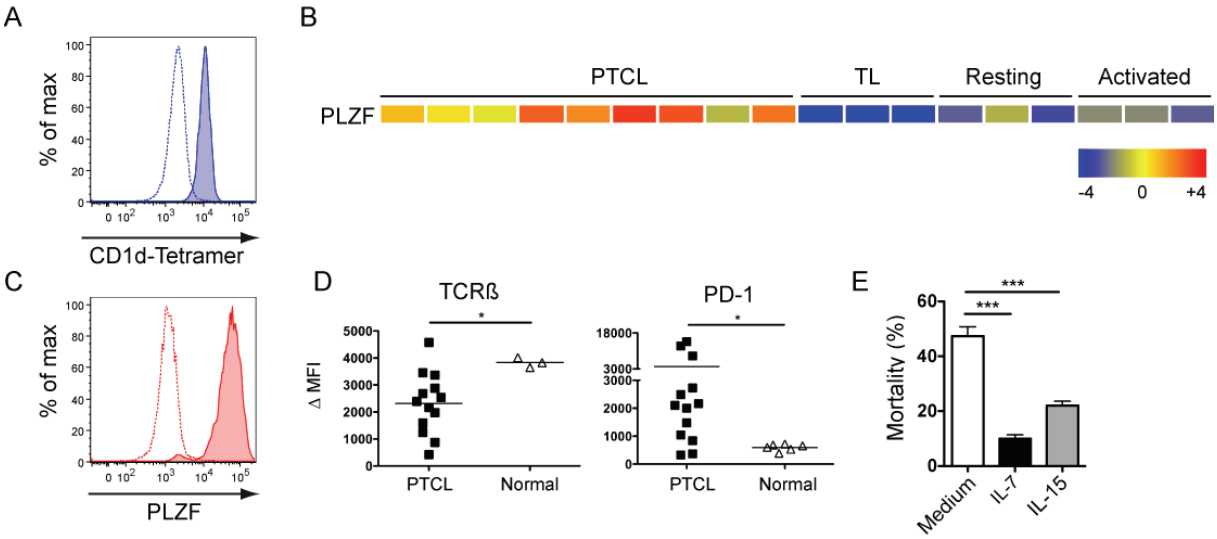
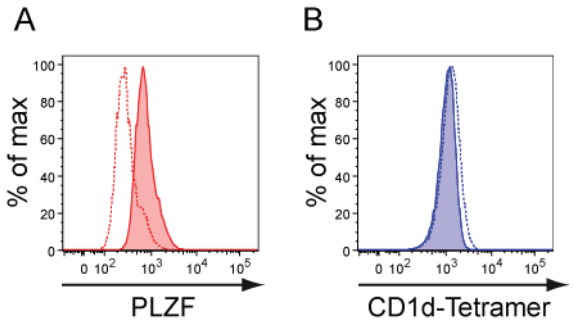

A
% of max
CD1d-Tetramer
B
PTCL
TL
Resting
Activated
PLZF
-4
0
+4
C
% of max
PLZF
D
TCRß
Δ MFI
PTCL
Normal
PD-1
PTCL
Normal
E
Mortality (%)
Medium
IL-7
IL-15

Figure 8



SUPPLEMENTARY DATA

LEGEND TO SUPPLEMENTARY FIGURES

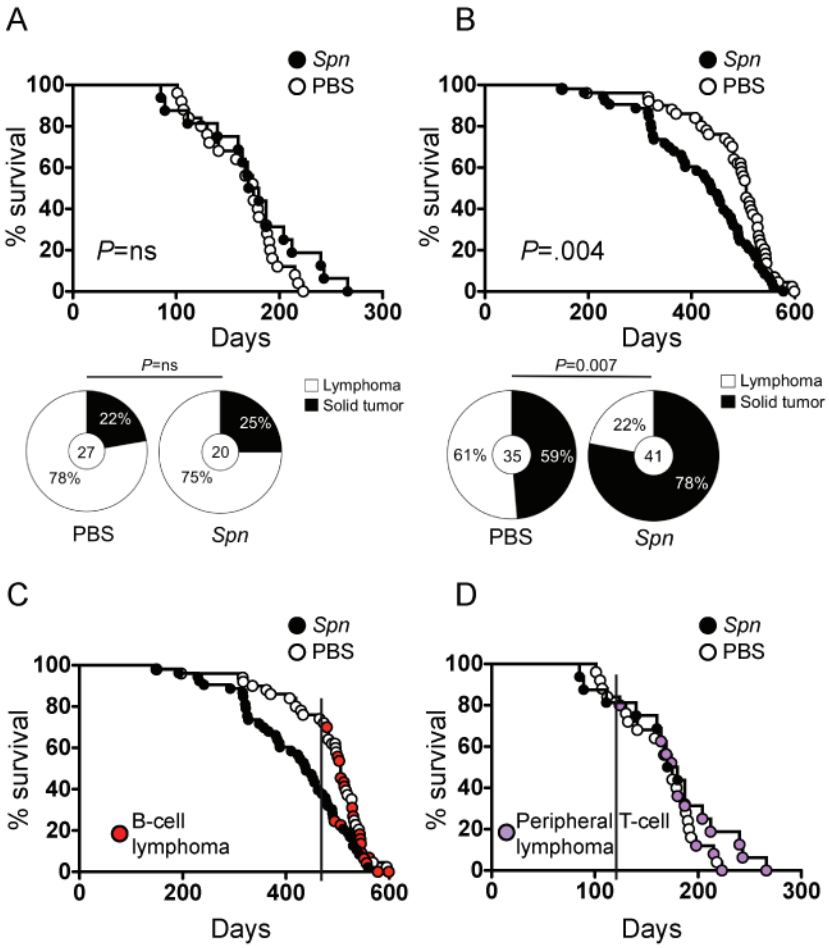
Supplemental Figure 1. (A) Survival and tumor development spectrum in $p53^{-/-}$ mice in PBS-injected mice (control group, n=53) or *Spn*-injected mice (experimental group, n=50) (in the middle of the donut chart is represented the absolute number of tumors). Of note, the number of tumors exceeded the total number of mice due to animals bearing multiple tumors (eg, a solid tumor and a lymphoma). **(B)** Survival and tumor development spectrum in $p53^{+/-}$ mice (control group, n=25; experimental group, n=16). **(C)** The late onset of B-cell lymphoma in $p53^{+/-}$ (ie, when more than half of the mice had died essentially from solid tumors in the *Spn*-injected group) precluded unbiased comparison of B-cell malignancies between the 2 groups. **(D)** No such a bias was observed in $p53^{-/-}$ mice for PTCL development since numbers of animals alive when the first PTCL occurred were equivalent.

Supplemental Figure 2. B220 expression across various involved organs in a representative PTCL.

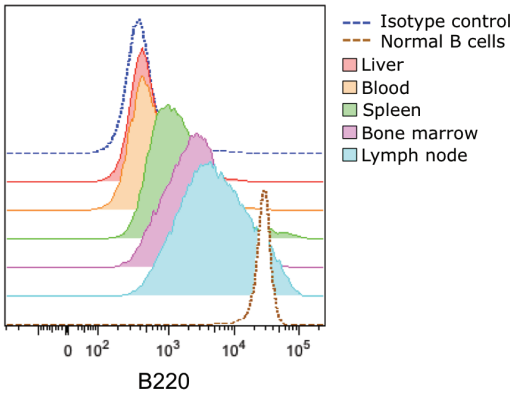
Supplemental Figure 3. (A) Heatmap of the 50 most upregulated and the 50 most downregulated genes between PTCL and normal splenic resting T cells from healthy $p53^{-/-}$ mice. **(B)** Ki67 staining of formalin-fixed and paraffin-embedded sections of a normal spleen and a representative PTCL involved spleen (50x magnification).

SUPPLEMENTAL FIGURES

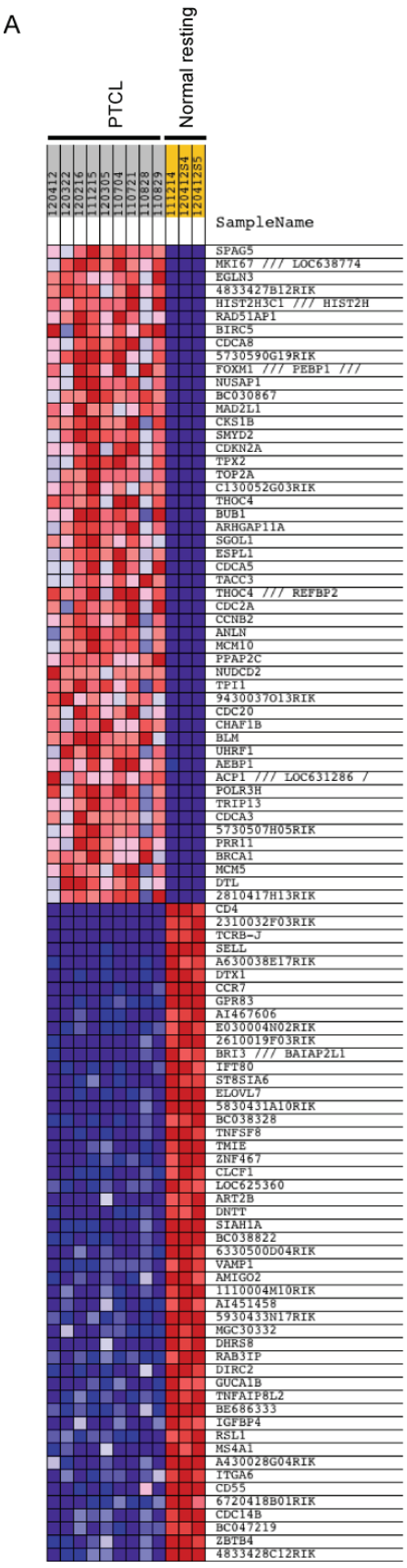
Supplemental Figure 1

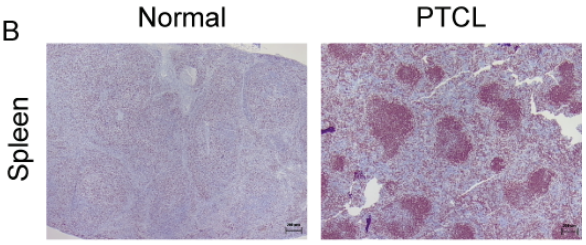


Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3





REFERENCES

1. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006;107(1):265-276.
2. Cartwright RA, Gilman EA, Gurney KA. Time trends in incidence of haematological malignancies and related conditions. *British journal of haematology*. 1999;106(2):281-295.
3. Zheng T, Mayne ST, Boyle P, Holford TR, Liu WL, Flannery J. Epidemiology of non-Hodgkin lymphoma in Connecticut. 1935-1988. *Cancer*. 1992;70(4):840-849.
4. Suarez F, Lortholary O, Hermine O, Lecuit M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood*. 2006;107(8):3034-3044.
5. Isaacson PG, Du M-Q. MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(8):644-653.
6. Rodriguez-Caballero A, Garcia-Montero AC, Barcena P, et al. Expanded cells in monoclonal TCR- +/CD4+/NKa+/CD8-/+dim T-LGL lymphocytosis recognize hCMV antigens. *Blood*. 2008;112(12):4609-4616.
7. Refaeli Y, Young RM, Turner BC, Duda J, Field KA, Bishop JM. The B cell antigen receptor and overexpression of MYC can cooperate in the genesis of B cell lymphomas. *PLoS biology*. 2008;6(6):e152.
8. Wang X, Werneck MBF, Wilson BG, et al. TCR-dependent transformation of mature memory phenotype T cells in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3834-3845.
9. Pechloff K, Holch J, Ferch U, et al. The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma. *Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(5):1031-1044.
10. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463(7277):88-92.
11. Streubel B, Vinatzer U, Willheim M, Raderer M, Chott A. Novel t(5;9)(q33;q22) fuses ITK to SYK in unspecified peripheral T-cell lymphoma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2006;20(2):313-318.
12. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(7):1008-1016.
13. Landgren O, Rapkin JS, Caporaso NE, et al. Respiratory tract infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007;109(5):2198-2201.
14. Enno A, O'Rourke J, Braye S, Howlett R, Lee A. Antigen-dependent progression of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma in the stomach. Effects of antimicrobial therapy on gastric MALT lymphoma in mice. *The American journal of pathology*. 1998;152(6):1625-1632.
15. Enno A, O'Rourke JL, Howlett CR, Jack A, Dixon MF, Lee A. MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with Helicobacter felis. A mouse model of

Helicobacter pylori-induced gastric lymphoma. *The American journal of pathology*. 1995;147(1):217-222.

16. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992;356(6366):215-221.

17. Jacks T, Remington L, Williams BO, et al. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Current biology : CB*. 1994;4(1):1-7.

18. Harvey M, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A, Donehower LA. Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat Genet*. 1993;5(3):225-229.

19. Tennant RW, French JE, Spalding JW. Identifying chemical carcinogens and assessing potential risk in short-term bioassays using transgenic mouse models. *Environmental health perspectives*. 1995;103(10):942-950.

20. Ward JM, Tadesse-Heath L, Perkins SN, Chattopadhyay SK, Hursting SD, Morse HC. Splenic marginal zone B-cell and thymic T-cell lymphomas in p53-deficient mice. *Lab Invest*. 1999;79(1):3-14.

21. Liu G, Parant JM, Lang G, et al. Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. *Nature genetics*. 2004;36(1):63-68.

22. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(43):15545-15550.

23. Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdottir H, Tamayo P, Mesirov JP. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics*. 2011;27(12):1739-1740.

24. Goldrath AW, Luckey CJ, Park R, Benoist C, Mathis D. The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(48):16885-16890.

25. Baniyash M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(9):675-687.

26. Shin H, Blackburn SD, Blattman JN, Wherry EJ. Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(4):941-949.

27. Qi Q, Huang W, Bai Y, Balmus G, Weiss RS, August A. A unique role for ITK in survival of invariant NKT cells associated with the p53-dependent pathway in mice. *Journal of immunology*. 2012;188(8):3611-3619.

28. Kinjo Y, Illarionov P, Vela JL, et al. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nature immunology*. 2011;12(10):966-974.

29. Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagomez D, et al. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100(19):10913-10918.

30. Chang WS, Kim JY, Kim YJ, et al. Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. *Journal of immunology*. 2008;181(10):6707-6710.

31. Matsuda JL, Gapin L, Sidobre S, et al. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nature immunology*. 2002;3(10):966-974.

32. Pomerantz RG, Mirvish ED, Erdos G, Falo LD, Jr., Geskin LJ. Novel approach to gene expression profiling in Sezary syndrome. *The British journal of dermatology*. 2010;163(5):1090-1094.

33. Jeon YK, Go H, Nam SJ, et al. Expression of the promyelocytic leukemia zinc-finger in T-lymphoblastic lymphoma and leukemia has strong implications for their cellular origin and greater association with initial bone marrow involvement. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2012;25(9):1236-1245.

34. Steininger A, Mobs M, Ullmann R, et al. Genomic loss of the putative tumor suppressor gene E2A in human lymphoma. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(8):1585-1593.

35. Vermeer MH, van Doorn R, Dijkman R, et al. Novel and highly recurrent chromosomal alterations in Sezary syndrome. *Cancer research*. 2008;68(8):2689-2698.

36. Lamprecht B, Kreher S, Mobs M, et al. The tumour suppressor p53 is frequently nonfunctional in Sezary syndrome. *The British journal of dermatology*. 2012;167(2):240-246.

37. Tothova SM, Bonin S, Trevisan G, Stanta G. Mycosis fungoides: is it a Borrelia burgdorferi-associated disease? *British journal of cancer*. 2006;94(6):879-883.

38. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, et al. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nature immunology*. 2006;7(9):978-986.

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

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

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

42. de Leval L, Rickman DS, Thielen C, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood*. 2007;109(11):4952-4963.

43. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nature reviews Immunology*. 2004;4(3):231-237.

44. Kawakami K, Yamamoto N, Kinjo Y, et al. Critical role of Valpha14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against Streptococcus pneumoniae infection. *European journal of immunology*. 2003;33(12):3322-3330.

45. Brigl M, Tatituri RV, Watts GF, et al. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(6):1163-1177.

46. Sprent J, Surh CD. Re-entry of mature T cells to the thymus: an epiphenomenon? *Immunology and cell biology*. 2009;87(1):46-49.

47. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nature immunology*. 2011;12(6):492-499.

48. Tarakhovsky A, Kanner SB, Hombach J, et al. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science*. 1995;269(5223):535-537.

49. Park JH, Adoro S, Lucas PJ, et al. 'Coreceptor tuning': cytokine signals transcriptionally tailor CD8 coreceptor expression to the self-specificity of the TCR. *Nature immunology*. 2007;8(10):1049-1059.

50. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *The Journal of experimental medicine*. 2002;195(5):625-636.

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

52. Lee H, Hong C, Shin J, et al. The presence of CD8+ invariant NKT cells in mice. *Experimental & molecular medicine*. 2009;41(12):866-872.

53. Terada N, Lucas JJ, Gelfand EW. Differential regulation of the tumor suppressor molecules, retinoblastoma susceptibility gene product (Rb) and p53, during cell cycle progression of normal human T cells. *Journal of immunology*. 1991;147(2):698-704.

54. Boehme SA, Lenardo MJ. TCR-mediated death of mature T lymphocytes occurs in the absence of p53. *Journal of immunology*. 1996;156(11):4075-4078.

55. Grayson JM, Lanier JG, Altman JD, Ahmed R. The role of p53 in regulating antiviral T cell responses. *J Immunol*. 2001;167(3):1333-1337.

56. Singh N, Huang L, Qin H. Defective T-cell receptor-induced apoptosis of T cells and rejection of transplanted immunogenic tumors in p53 −/−mice. *Eur J Immunol*. 2010;40(2):559-568.

57. Ohkusu-Tsukada K, Tsukada T, Isobe K. Accelerated development and aging of the immune system in p53-deficient mice. *J Immunol*. 1999;163(4):1966-1972.

58. Zhou X, Wong S, Walter J, Jacks T, Eisen HN. Increased generation of CD8+ T cell clones in p53 mutant mice. *J Immunol*. 1999;162(7):3957-3960.

59. Sturm A, Itoh J, Jacobberger JW, Fiocchi C. p53 negatively regulates intestinal immunity by delaying mucosal T cell cycling. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(11):1481-1492.

60. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(4):251-262.

61. Pechloff K, Holch J, Ferch U, et al. The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(5):1031-1044.

62. Wang X, Werneck MB, Wilson BG, et al. TCR-dependent transformation of mature memory phenotype T cells in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(10):3834-3845.

63. Isaacson PG, Du MQ. Gastrointestinal lymphoma: where morphology meets molecular biology. *The Journal of pathology*. 2005;205(2):255-274.

64. Rodriguez-Caballero A, Garcia-Montero AC, Barcena P, et al. Expanded cells in monoclonal TCR-alphabeta+/CD4+/NKa+/CD8-/+dim T-LGL lymphocytosis recognize hCMV antigens. *Blood*. 2008;112(12):4609-4616.

65. Belhadj K, Reyes F, Farcet JP, et al. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: report on a series of 21 patients. *Blood*. 2003;102(13):4261-4269.

66. Shimakage M, Sasagawa T, Kawahara K, Yutsudo M, Kusuoka H, Kozuka T. Expression of Epstein-Barr virus in cutaneous T-cell lymphoma including mycosis fungoides. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2001;92(2):226-231.

67. Herne KL, Talpur R, Breuer-McHam J, Champlin R, Duvic M. Cytomegalovirus seropositivity is significantly associated with mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Blood*. 2003;101(6):2132-2136.

68. Jackow CM, Cather JC, Hearne V, Asano AT, Musser JM, Duvic M. Association of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma, superantigen-positive Staphylococcus aureus, and oligoclonal T-cell receptor V beta gene expansion. *Blood*. 1997;89(1):32-40.

69. Abrams JT, Balin BJ, Vonderheid EC. Association between Sezary T cell-activating factor, Chlamydia pneumoniae, and cutaneous T cell lymphoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;941:69-85.

70. van der Fits L, Sandberg Y, Darzentas N, et al. A restricted clonal T-cell receptor alphabeta repertoire in Sezary syndrome is indicative of superantigenic stimulation. *The British journal of dermatology*. 2011;165(1):78-84.

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

72. Kuranaga N, Kinoshita M, Kawabata T, Habu Y, Shinomiya N, Seki S. Interleukin-18 protects splenectomized mice from lethal Streptococcus pneumoniae sepsis independent of interferon-gamma by inducing IgM production. *The Journal of infectious diseases*. 2006;194(7):993-1002.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A. Introduction

L'identification de la nature NKT des lymphomes observés dans le modèle murin p53 KO soulève 3 questions majeures : 1/ la première est celle de l'existence d'une entité similaire ou apparentée chez l'homme ; 2/ la deuxième est celle du rôle de la voie p53 dans ce type éventuel de lymphome, et comme nous le verrons, dans la lymphomagénèse T de façon générale ; 3/ et enfin, la question centrale du rôle de la stimulation antigénique chronique dans la lymphomagénèse T.

Avant d'aborder ces 3 questions, nous présenterons rapidement les populations NKT normales à la fois chez la souris mais aussi chez l'homme. En effet, étant donné l'identification très récente de la nature NKT de ces lymphomes murins, nous avons choisi de développer une courte partie sur les NKT dans la partie discussion de cette thèse, ne pouvant remodeler intégralement la partie introductive.

B. Les lymphocytes NKT : « What's in a name ? »

1. Généralités

Le terme de lymphocytes NKT a été pour la première fois utilisé en 1995 pour désigner un sous-type cellulaire de lymphocytes T murins (sur le fond génétique C57Bl/6) portant le marqueur habituellement retrouvé sur les lymphocytes NK : NK1.1 (ou Nkrp1c ou CD161c)[464]. Les progrès accomplis dans la caractérisation de cette population ont néanmoins montré que, d'une part, il existait des lymphocytes NKT dans d'autres fonds génétiques murins que C57Bl/6 où le marqueur NK1.1 n'existe pas et, d'autre part, que même sur fond génétique C57Bl/6, l'expression de NK1.1 ne permettait pas d'appréhender de manière ubiquitaire cette population dans l'ensemble des phases de son développement.

En 1987, 3 groupes indépendants ont décrit cette population particulière, exprimant un niveau intermédiaire de TCRαβ avec un biais d'expression $V_ß8$ (2 à 3 fois la fréquence usuellement retrouvée dans la population T conventionnelle), présentée initialement comme ne portant ni la molécule de costimulation CD4, ni le CD8, et capable de sécréter en grandes quantités de l'IL-4, de l'IFN-γ et du TNF[465-467]. Par la suite, d'autres équipes ont rapporté l'existence d'une population semblable $CD4^+$ mais l'existence d'une population $CD8^+$ chez la souris n'a été que très récemment évoquée et reste débattue[468]. Les lymphomes obtenus dans le modèle murin p53-déficient conforte néanmoins l'existence d'une population $CD8^+$ puisqu'une proportion non négligeable de lymphome NKT sont $CD8^{dim}$.

La confirmation qu'une population de nature tout à fait différente venait d'être identifiée est venue de la démonstration que les lymphocytes NKT se développent indépendamment du CMH de classe II mais requièrent l'expression de la ß2-microglobuline bien qu'ils n'expriment pas le $CD8^+$.[469-471] Ces constatations ont amené à découvrir que les lymphocytes NKT reconnaissent la molécule CMH-I like appelée CD1d[472]. En plus de l'expression préférentielle du $V_ß8.2$, il a été démontré que ces lymphocytes NKT utilisent une chaîne invariante $V_α14\text{-}J_α18$ (appelée initialement $J_α281$)[473]. Parallèlement, il a été montré que la molécule CD1d présente des composés lipidiques/hydrophobes et qu'un dérivé glycolipidique d'une éponge marine, l'α-galactosylceramide (α-GalCer), était capable d'activer cette population NKT (figure 12)[474,475].

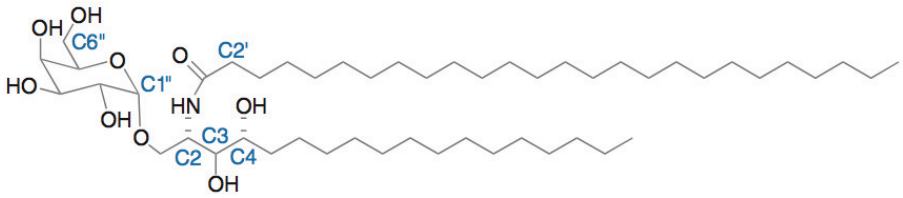


Figure 12. Structure de l'α-galactosylceramide..

Par la suite, les nombreuses études portant sur l'analyse du développement et de la fonctionnalité de cette population particulière NKT ont caractérisé son développement thymique propre (notamment la sélection positive médiée par des thymocytes $CD4^+CD8^+$ CD1d-positif et non les classiques cellules

épithéliales thymiques sélectionnant les lymphocytes T conventionnels)[476,477]. Au-delà du biais d'expression $V_ß8.2$, une surepresentation des familles $V_ß7$ et $V_ß2$ a été retrouvée chez la souris, et une population équivalente semi-invariante $V_α24$-$J_α18$ associée à la chaîne $V_ß11$ a été identifiée chez l'homme[478,479].

Le choix du nom de cette population a été, et demeure, problématique. Le nom de lymphocytes « T $NK1.1^+$ » ne pouvait être retenu puisque NK1.1 n'est exprimé, comme discuté précédemment, que chez la souris C57Bl/6. Par ailleurs, il est maintenant clair que NK1.1 (ou son équivalent CD161 chez l'homme) n'est pas exprimé par l'ensemble de la population NKT (définie comme reconnaissant le tétramère α-GalCer) notamment par les lymphocytes NKT immatures ou activés. Enfin, NK1.1 ou CD161 peuvent être exprimés par des populations T conventionnelles c'est-à-dire non CD1d-restreintes. Ainsi, parmi les dénominations suivantes : NK1.1 T-cell[480], natural T-cell[481,482], NK T cells[483], NKT cells ou $V_α14$ T cells[473], l'appellation NKT cells s'est progressivement imposée. Alors que le NK de NKT faisait initialement référence à NK1.1, il fait maintenant référence à Natural Killer pour la plupart des immunologistes, même si les capacités cytotoxiques de ces cellules ne sont pas leur caractéristique première[484]. La meilleure appellation possible, quoiqu'alambiquée, pourrait être lymphocytes T natural killer-like CD1d-dépendant.

Parmi les lymphocytes T CD1d-restreints, pour lesquels nous réserverons le nom de lymphocytes NKT (en opposition aux lymphocytes NKT-like non CD1d-restreints dont nous reparlerons ultérieurement), 2 types peuvent être distingués : 1/ le type I dont nous avons parlé précédemment, exprimant les chaînes α invariantes $V_α24$-$J_α18$ (associée au $V_ß11$ essentiellement) chez l'homme et $V_α14$-$J_α18$ (associée au $V_ß8.2$, $V_ß7$ et $V_ß2$ essentiellement) chez la souris et appelés pour cette raison NKT invariants ou iNKT. Ils peuvent être identifiés par marquage à l'aide d'un tétramère CD1d couplé à l'αGalCer à la fois chez l'homme et la souris (le tétramère CD1d murin permettant aussi le marquage des iNKT humains, figure 13) ; 2/ les NKT de type II, CD1d-restreints, exprimant un panel de chaînes α et β largement plus diversifié et ne reconnaissant pas, à quelques exceptions près, l'α-GalCer. Les ligands du TCR des NKT de type II restent mal connus. Le sulfatide est l'un d'entre eux et le développement de tétramères CD1d-sulfatide permet à l'heure actuelle d'identifier une partie de la population NKT de type II. L'analyse comparée des souris transgéniques $Jα18^{-/-}$ (déficientes en lymphocytes NKT de type I mais pas de type II) et $CD1d^{-/-}$ (déficientes en lymphocytes NKT de types I et II) a permis de mettre en évidence des rôles distincts pour ces 2 populations[485,486].

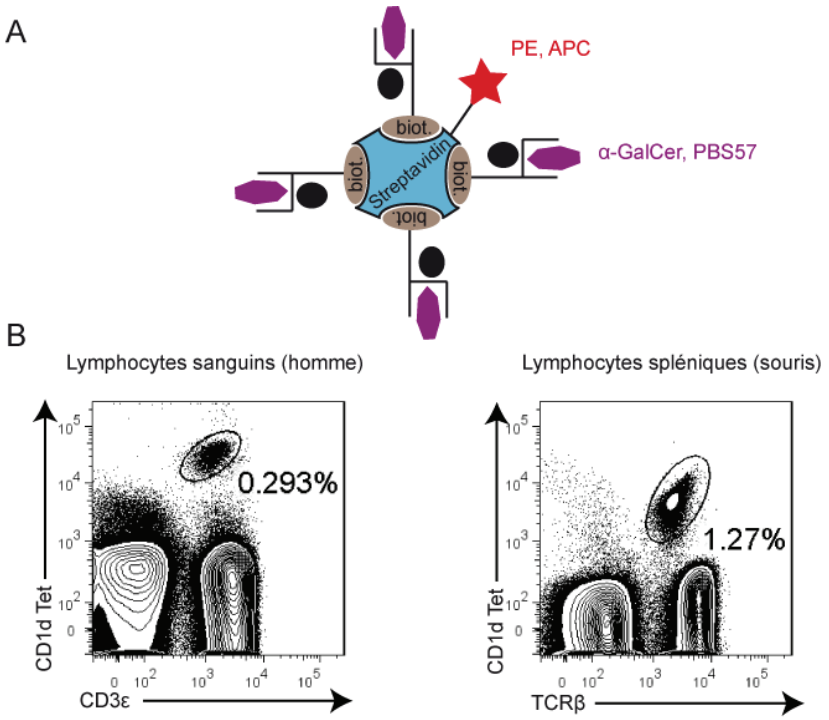


Figure 13. (A) Schéma du tétramère utilisé pour l'identification par cytométrie en flux de la nature iNKT des lymphomes murins obtenus dans le modèle p53-déficient. Des molécules CD1d recombinantes biotinylées sont agglutinées sur une streptavidine couplée à un fluorophore, puis chargées avec le ligand spécifique α-GalCer (NIH Tetramer Core Facility pour le PE et Proimmune Oxford UK pour l'APC). (B) Analyses représentatives des lymphocytes iNKT humains ($CD3\varepsilon^+$ CD1d Tet^+) et murins ($TCR\beta^+$ CD1d Tet^+) par cytométrie de flux. La population cerclée constitue les lymphocytes iNKT (reproduit d'après la thèse de Pierre Milpied, numéro d'attribution 2010PA11T067, université Paris XI, avec la permission de l'auteur).

2. NKT de type I ou NKT invariants ou iNKT

Les lymphocytes iNKT se développent dans le thymus tout comme les lymphocytes T conventionnels (figure 14). Initialement, deux hypothèses ont été émises : la première postulant un programme de différenciation propre dès l'origine des lymphocytes NKT, l'autre postulant un développement dirigé par l'expression particulière de la chaîne invariante Vα14-Jα18. Il est maintenant établi que le développement des iNKT est TCR-dépendant et non l'inverse[487-489]. La sélection thymique de cette population exprimant un TCR particulier diffère de celle des lymphocytes T conventionnels : 1/ les lymphocytes iNKT sont sélectionnés par des interactions avec d'autres thymocytes DP exprimant la molécule de CD1d et présentant un glycolipide endogène (et non des cellules épithéliales thymiques présentant des peptides endogènes via des molécules de CMH conventionnelles de classe I ou II)[477]. Le glycolipide endogène iGb3, un dérivé de iGb4 après clivage d'un branchement ß-hexosamine par la ß-hexosaminidase-B, semble être un bon candidat pour cette sélection même si aucune preuve formelle n'a été établie (figure 15)[490]. La sélection thymique est dépendante d'une part de l'engagement du TCR mais aussi d'interactions homotypiques Slam/Slam induisant l'activation de la voie de signalisation SAP dans les lymphocytes iNKT sélectionnés[491-493]. Au cours de leur développement, les lymphocytes iNKT présentent 4 phénotypes successifs : le stade 0

($CD24^{+}NK1.1^{+}$), le stade 1 ($CD24^{-}NK1.1^{-}CD44^{lo}$) puis le stade 2 ($CD24^{-}NK1.1^{-}CD44^{hi}$), stade où ils sont exportés en périphérie[494]. La prolifération des iNKT au cours de ces différents stades de différentiation est dépendante de MYC[495]. Enfin, la majorité des iNKT thymique et périphérique acquièrent un phénotype $CD24^{-}NK1.1^{+}CD44^{hi}$ (stade 3). Contrairement aux lymphocytes T conventionnels qui migrent en périphérie dès leur maturation achevée, une large part des lymphocytes iNKT vont persister pendant de longues périodes au niveau thymique[496]. Plusieurs facteurs de transcription, molécules et voies de signalisations clés dans le développement des lymphocytes iNKT ont été identifiés par l'utilisation de modèles murins KO. Ils ne seront pas développé ici mais on peut retenir entre autres l'importance de HEB, ROR-γt, Bcl-xL (impliqués également dans le développement des lymphocytes T conventionnels)[497,498] ou Slam/SAP/Fyn[498], GATA-3 (aux stades 0 et 1)[499], T-bet (transition du stade 2 au stade 3)[500] et enfin PLZF dont nous avons montré la surexpression dans nos lymphomes murins iNKT[501]. Enfin, concernant l'environnement cytokinique, l'IL-15 joue un rôle majeur dans l'acquisition du phénotype mature complet (notamment l'acquisition du marqueur NK1.1, la capacité à produire de l'IFNγ via l'expression de T-bet) mais aussi dans la survie et la prolifération homéostatique des lymphocytes iNKT[502,503]. L'IL-7 semble également jouer un rôle dans la survie et la prolifération homéostatique des lymphocytes iNKT mais dans une moindre mesure que l'IL-15[504]. Si les interactions TCR/CD1d-glycolipides endogènes sont nécessaires à l'acquisition d'un phénotype mature en périphérie (transition du stade 2 vers le stade 3), elles ne sont en revanche pas requises pour la survie ou la prolifération des lymphocytes iNKT matures[504,505]. Enfin, si la grande majorité des lymphocytes iNKT acquièrent en périphérie un phénotype mature correspondant au stade 3, une proportion de ceux-ci gardent un phénotype correspondant au stade 2 (ie, $NK1.1^{-}$), notamment au niveau des ganglions lymphatiques où ils peuvent représenter jusqu'à 80% du contingent iNKT[506].

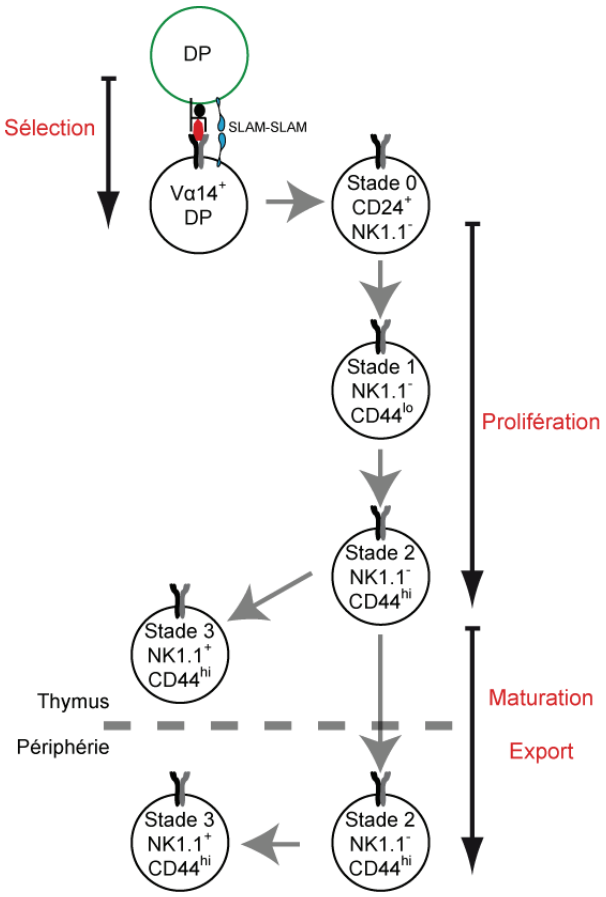


Figure 14. Développement des lymphocytes iNKT (reproduit d'après la thèse de Pierre Milpied, numéro d'attribution 2010PA11T067, université Paris XI, avec la permission de l'auteur).

Deux sous-types de iNKT, $CD4^+$ ou double négatif (DN) (aucune étude ne parle pour l'instant des iNKT $CD8^+$ chez la souris hormis l'étude princeps décrivant l'existence d'une telle population[468]), sont pour l'heure décrits[507,508]. La finalité d'une expression de la molécule CD4 à la surface de lymphocytes non sélectionnés par une molécule CMH de classe II n'est pas comprise pour l'instant. Il semble que les iNKT $CD4^+$ ou DN ne possèdent pas exactement les mêmes caractéristiques fonctionnelles. La fraction $CD4^+$ produit des concentrations supérieures d'IL-4 après activation par un anticorps anti-CD3 *in vitro*[509], et semble responsable d'une suppression du rejet anti-tumoral *in vivo*[510]. Contrairement à la souris, près de 50% des lymphocytes NKT humains expriment le CD8[511].

Au cours de la réponse immune à certains pathogènes, deux modes d'activation des lymphocytes NKT, selon le glycolipide responsable de l'engagement du TCR, peuvent être distingués (figure 16)[512,513]. Le premier, qualifié de direct, fait intervenir la présentation par des cellules portant la molécule CD1d (cellules dendritiques, lymphocytes B, macrophages ou cellules de Kupffer au niveau hépatique notamment) de glycolipides provenant de la dégradation de membranes du pathogène au niveau lysosomial. Les glycolipides des bactéries de la famille des *Sphingomonas* ont été les premiers identifiés comme susceptibles d'activer directement des lymphocytes NKT invariants. Ces bactéries Gram-négatives, essentiellement telluriques et rarement pathogènes chez l'homme, possède en effet

une couche sphingolipidique dans leur enveloppe au lieu d'une couche lipopolysaccharidique commune aux bactéries LPS-positives. Par la suite, d'autres bactéries telles que *Borrelia sp*. ou *Streptoccocus sp*. (*pneumoniae* et du groupe B) ont intégré le groupe des agents dont les glycolipides sont capables d'activer les lymphocytes NKT. Un autre mode d'activation, sans doute largement plus fréquent, est qualifié d'indirect et fait intervenir la présentation de glycolipides endogènes par les cellules présentatrices d'antigène (notamment les cellules dendritiques) dans un contexte d'activation (notamment IL-12 et IL-18)[514]. Dans ce modèle, le lymphocyte NKT est activé par la combinaison CD1d/glycolipide endogène et cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, le lymphocyte NKT activé surexprime CD40L, activant en retour la cellule dendritique. Parmi les glycolipides endogènes, iGb3, dont nous avons déjà parlé pour la sélection des iNKT au niveau thymique, semble un candidat particulièrement intéressant concernant l'activation des lymphocytes NKT sur un mode indirect, notamment dans le cas d'infections à bactéries Gram-négatives LPS-positives[515]. Par ailleurs, toujours dans ce mode d'activation indirecte des lymphocytes NKT, il a été montré que l'activation des récepteurs toll-like TLR2 et 4 au niveau des cellules dendritiques par certains pathogènes entraînait une inhibition de l'α-galactosidase A chargée de dégrader les glycolipides endogènes majorant ainsi la présentation de ceux-ci au niveau des molécules CD1d de surface[516]. Après activation, les lymphocytes NKT sont capables de sécréter très rapidement et en grandes quantités un large panel de cytokines immunomodulatrices Th1, Th2 ou mixtes. La production du type de cytokine est éminemment variable, dépend du sous-type de NKT (CD4+ ou DN), du type de ligand (α-GalCer ou dérivés tels que le C-glycoside ou l'OCH), du type de cellule présentant l'antigène, de l'organe et du milieu cytokinique micro-environnemental lui-même[511,517-519]. Ces notions ne seront pas détaillées ici.

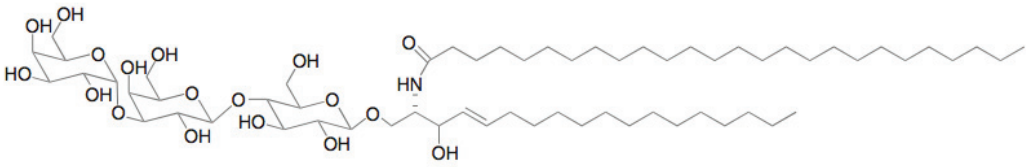


Figure 15. Schéma du glycolipide endogène iGb3.

In vivo, il a longtemps été supposé que l'activation des lymphocytes NKT par l'α-GalCer entraînait une mort de type AICD en quelques heures, mais l'utilisation du tétramère de CD1d-α-GalCer a clairement mis en évidence qu'il existe en fait une diminution de l'expression du TCRαβ associée à une perte du marqueur NK1.1 rendant indétectable les NKT par cytométrie en flux à l'aide du couple de marqueurs usuels TCRβ/NK1.1[520,521]. Il existe au contraire une expansion clonale majeure dans la rate, le foie ou la moelle osseuse après stimulation par l'α-GalCer aboutissant à une multiplication par 6 à 10 fois du pool initial en 3 jours environ avant un retour au niveau basal antérieur en 9 à 12 jours. Tandis que la réexpression du TCR est détectable après 24 à 48h, NK1.1 reste non exprimé pendant au moins 12 jours environ. Les données concernant le devenir *in vivo* des lymphocytes iNKT après stimulation directe par anti-CD3 ou indirecte par injection d'IL-12 restent parcellaires. Néanmoins, il a

été montré que l'administration d'IL-12 entraîne également une diminution de l'expression de NK1.1[522].

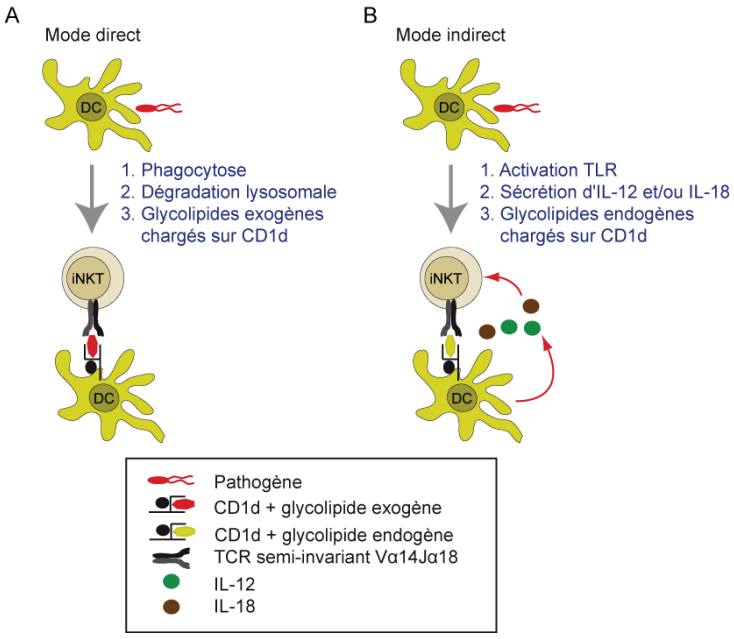


Figure 16. Schéma représentant les 2 modes d'activation direct (A) et indirect (B) des lymphocytes iNKT (reproduit d'après la thèse de Pierre Milpied, numéro d'attribution 2010PA11T067, université Paris XI, avec la permission de l'auteur).

3. NKT de type II

Les NKT de type II, non invariants mais CD1d-restreints, ne peuvent pas être identifiés par un tétramère α-GalCer et sont donc mal caractérisés à l'heure actuelle. Cette population semble enrichie en lymphocytes exprimant les chaînes $V_\alpha3$-$J_\alpha9$ ou $V_\alpha8$, en association avec une chaîne $V_\beta8.2$, mais la diversité est largement plus importante que ces seules chaînes qui ne sont que surreprésentées[523-527]. Il semble que certains lymphocytes T γδ puissent également faire partie de ces lymphocytes NKT de type II[528]. Tout comme les iNKT, les NKT de type II portent également le marqueur NK1.1 à l'état basal chez la souris C57Bl/6. Chez l'homme, la plupart de ces NKT de type II seraient CD8αβ[529] et constitueraient une part plus importante de la population NKT que les NKT de type I, même si certains biais expérimentaux ont pu faussé ces résultats (notamment un système de culture avec des lignées C1R transfectées par du CD1d ayant pu favoriser la prolifération de ces NKT de type II dérivés de la moelle osseuse)[530]. Deux articles récemment publiés dans *Nature Immunology* ont caractérisé le mode d'engagement du TCR de lymphocytes NKT de type II par un glycolipide, le sulfatide, présenté par une molécule de CD1d[531,532]. Les auteurs montrent comment cet engagement présente à la fois des caractéristiques structurelles de la présentation classique des molécules de CMH de classe I ou II aux lymphocytes T conventionnels mais aussi des caractéristiques de la présentation des antigènes glycolipidiques par la molécule de CD1d aux lymphocytes NKT invariants. Le développement de tétramères (CD1d-sulfatide et autres) dans un avenir proche permettra sans doute de mieux caractériser cette population.

4. Les lymphocytes « NKT-like »

Une confusion importante à propose des lymphocytes NKT vient de l'emploi dans la littérature, par un grand nombre d'auteurs, du terme NKT pour désigner des lymphocytes T conventionnels exprimant certains marqueurs NK, notamment NK1.1, mais qui ne sont ni invariants ni CD1d-restreints[533-535]. Cette population $TCR\beta^{+}NK1.1^{+}$, qui englobe à la fois des lymphocytes $CD4^{+}$, $CD8^{+}$ et DN, ne présente aucune des caractéristiques des lymphocytes NKT (et notamment de capacité immunorégulatrice par sécrétion cytokinique massive) et ne devrait pas être désignée sous le terme de lymphocytes NKT (voir tableau 7). L'expression de NK1.1 semble notamment être liée à l'activation de ces lymphocytes T conventionnels[536] alors que, comme nous l'avons vu, les NKT ont tendance à perdre l'expression de ce marqueur en cas d'activation. *In vivo*, les expériences dans le modèle murin CD1d-déficient ont permis d'évaluer les représentations respectives des populations $NK1.1^{+}$ CD1d-dépendante ou CD1d-indépendante : les NKT de type I et II (CD1d-dépendants) représentent environ 80% des lymphocytes $NK1.1^{+}$ hépatiques contre 50% des lymphocytes $NK1.1^{+}$ spléniques ou médullaires tandis que les populations NKT-like (ie $NK1.1^{+}$ CD1d-indépendantes) représentent inversement 20% de la population lymphocytaire $NK1.1^{+}$ hépatique et 50% des populations $NK1.1^{+}$ splénique ou médullaire. De la même façon, chez l'homme, la présence de marqueurs NK tels que CD161 (équivalent à NK1.1) ou CD56 sur des lymphocytes T conventionnels n'est en aucun cas synonyme de population NKT[537].

Enfin, d'autres populations de lymphocytes invariants mais non CD1d-restreints constituent vraisemblablement une autre catégorie de lymphocytes puisqu'ils n'expriment pas forcément de marqueurs NK mais présentent des similitudes avec des lymphocytes NKT sur le plan fonctionnel. Les lymphocytes MAIT (mucosal-associated invariant T cells) de la *lamina propria* décrits par Olivier Lantz à l'Institut Curie ($V_{\alpha}19$-$J_{\alpha}33$ chez la souris ou $V_{\alpha}7.2$-$J_{\alpha}33$ chez l'homme)[538] ou certains lymphocytes T γδ (notamment intra-épithéliaux de l'intestin)[539] pourraient tomber dans cette catégorie. Ils ne seront pas détaillés dans ce travail mais constituent des populations intéressantes, tout comme les NKT, car ayant potentiellement une propension particulière à la transformation lymphomateuse en raison de leurs caractéristiques à l'interface entre l'immunité innée et adaptative.

	Lymphocytes NKT de type I	Lymphocytes NKT de type II	Lymphocytes « NKT-like »
Restriction CD1d	Oui	Oui	Non
Réactivité avec α-GalCer	Non	Non$^{\infty}$	Non
TCRα	Vα14-Jα18 (souris) Vα24-Jα18 (homme)	Divers	Divers¶
TCRß	Vß8.2, Vß7 et Vß2 (souris) Vß11 (homme)	Divers	Divers¶
NK1.1 (souris) **CD161 (homme)**	Pos → mature resting Neg → immature ou activés	Variable	Positif
Corécepteur	$CD4^+$ ou DN (souris)* $CD4^+$, $CD8^+$ ou DN (homme)	$CD4^+$ ou DN (souris) Mal définie chez l'homme	$CD4^+$, $CD8^+$ et DN
IL-4	Oui	Oui	Non
IFN-γ	Oui	Oui	Oui

$^{\infty}$*Certains lymphocytes NKT de type II α-GalCer+ ont été identifiés chez l'homme ;*
**Une étude récente montre l'existence de NKT $CD8^+$ chez la souris (confirmé par la présence de lymphomes NKT $CD8^+$ dans notre série) ;*
¶*Certaines populations telles que les MAIT ou certains lymphocytes T γδ, bien que ne présentant pas forcément des marqueurs NK, sont invariants ou semi-invariants et présentent des caractéristiques proches des NKT, venant complexifier cette classification.*

Tableau 7. Type de lymphocytes NKT et famille « NKT-like » dont l'appellation porte à confusion dans la littérature (*d'après Godfrey et al.*[540]).

C. Lymphomes NKT humains : mythe ou réalité ?

Avant de poser la question de l'existence d'une entité correspondante en pathologie humaine, il est important de noter que nous avons été surpris par l'absence quasi-complète de description de lymphomes T périphériques chez les animaux p53-déficients. En effet, étant donnée l'ancienneté du modèle murin p53, connu depuis maintenant plus de 30 ans, et l'abondance de son utilisation dans la littérature, un seul article évoque clairement le développement de lymphomes T post-thymique chez ces souris[541] dans un modèle double KO $p53^{-/-}iNOS^{-/-}$ (le NO inhibant la prolifération des lymphocytes T matures[542], il n'est pas étonnant qu'une augmentation d'incidence de PTCL ait été observée chez ces souris double KO). Nous avons 3 explications possibles pour ce manque d'observation et de description des PTCL dans ce modèle :

i/ la plupart des travaux parlent largement de lymphomes T « essentiellement » thymiques[543-550], laissant supposer que les auteurs ont observé des cas de lymphomes sans envahissement thymique manifeste. La plupart du temps, une origine thymique a néanmoins été probablement privilégiée, notamment parce qu'il existe un envahissement thymique des PTCL en microscopie. Cet envahissement rentre néanmoins dans le cadre de la dissémination à l'ensemble des organes analysés chez les souris atteintes et ne détermine en rien l'origine du lymphome comme nous l'avons montré (thymus involué, marquage TdT négatif, C-Kit négatif) ;

ii/ la plupart des travaux identifient l'ensemble des lymphomes développés par immunohistochimie à l'aide du couple CD3/B220 sans marquage par cytométrie en flux. Or, nous avons clairement documenté que ces marqueurs peuvent être « inversés » dans les PTCL des souris p53 KO : $CD3^{lo}$ et $B220^{int}$ pour la majorité de ces lymphomes. L'absence de clonalité du BCR et l'identification d'une clonalité du TCR rend impossible une erreur de notre part concernant une éventuelle nature B de ces lymphomes. Dès lors, il est possible que certaines études aient décrit à tort des lymphomes B au lieu de PTCL[551], notamment dans le modèle $p53^{-/-}$ où nous n'en avons pas rencontrés (contrairement au modèle $p53^{+/-}$ où ils sont majoritaires) (voir figure 17) ;

iii/ enfin, notre groupe contrôle recevait une injection de PBS tous les 15 jours en intrapéritonéal, injections générant un certain degré d'inflammation et ayant donc pu promouvoir le développement de lymphomes NKT dans ce groupe contrôle comparativement à un groupe non injecté que nous n'avons pas généré. Néanmoins, des données de Ludovic Deriano (Institut Pasteur, Paris, France, communication personnelle) qui a généré une telle cohorte de souris contrôles non-injectées (dans un papier sur le rôle de la partie C-terminale de RAG dans les lymphomes thymiques des souris p53 KO publié dans Nature en 2011[552]) laissent supposer un développement similaire de lymphomes périphériques chez des souris non injectées. En effet, près de 20% des animaux contrôles p53 KO de sa cohorte

développaient des lymphomes sans envahissement thymique macroscopique manifeste avec une expression variable mais souvent intermédiaire du marqueur B220.

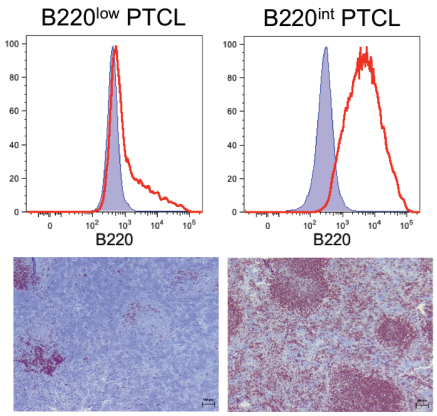


Figure 17. Exemple de marquage par cytométrie en flux (en haut) et en immunohistochimie (en bas) par l'anticorps anti-B220 de 2 PTCL murins illustrant le risque de classification erronée d'un lymphome B220^{int} en lymphome B sur ce seul marquage (sur les histogrammes, en bleu est représenté l'isotype contrôle et en rouge le marquage B220 ; les tissus marqués en immunohistochimie sont des rates).

Dans la littérature, l'hypothèse qu'il puisse exister des lymphoprolifération NKT ou NKT-like chez l'homme a été évoquée par Kitamura *et al.* en 2005 sur la positivité d'un marquage anti-$V_{\alpha}24$ (chaîne invariante des lymphocytes iNKT humains) dans un cas de lymphome NK/T nasal[553]. La dénomination de cette entité, englobant des lymphoprolifération NK et T (exprimant des marqueurs NK) porte à confusion puisqu'elle ne fait absolument pas référence à une contrepartie cellulaire normale pouvant correspondre à des lymphocytes NKT. Il n'est néanmoins pas exclu que certains lymphomes NK/T puissent correspondre à de vrai lymphomes NKT. Plus récemment, Jeon *et al.* évoquent clairement la possibilité que certains PTCL-NOS ou lymphomes T cutanées (CTCL pour cutaneous T-cell lymphoma) puissent dériver de cellules NKT-like sur la base de l'expression du facteur de transcription PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger appelé aussi ZBTB16) [554]. Comme nous l'avons évoqué précédemment, PLZF est un facteur de transcription plus ou moins spécifiquement exprimé dans les cellules NKT murines immatures et matures [501] ainsi que d'une population T γδ particulière $V_{\gamma}1^{+}V_{\delta}6.3^{+}$ chez la souris C57Bl/6 ou $V_{\gamma}1^{+}V_{\delta}6.4^{+}$ chez la souris DBA/2[555] (voir figure 18, Immgen, Immunological Genome Project, http://www.immgen.org). Chez l'homme, l'expression de ce marqueur semble également spécifique des cellules NKT et des lymphocytes de type MAIT (mucosal-associated invariant T)[501].

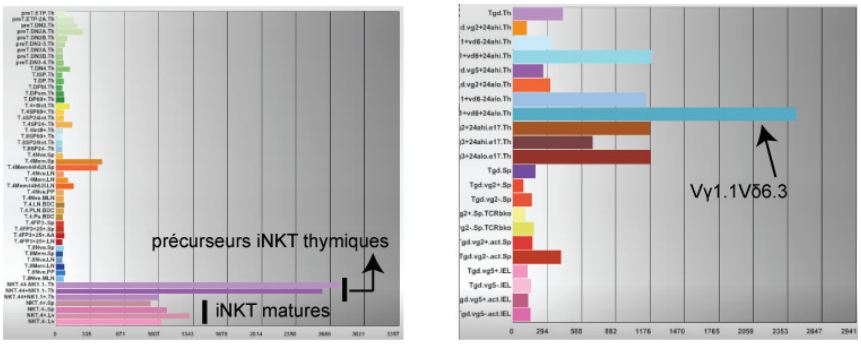


Figure 18. Analyse sur le site Immgen (http://www.immgen.org) des profils d'expression de ZBTB16 (PLZF) dans les différents types lymphocytaires T αβ (à gauche) et γδ (à droite) chez la souris.

Sur une série de 588 hémopathies lymphoïdes, Jeon *et al*. ont donc retrouvé une expression de PLZF par immunohistochimie dans 27/54 cas de leucémie/lymphome lymphoblastique T, 1/51 cas de PTCL-NOS et 1/13 cas de CTCL (dont 9 cas exprimant une chaîne ß du TCR). Dans l'ensemble des autres hémopathies (B toutes entités confondues, AITL (n=46), EATL (n=6), NK/T nasal (n=80), ALCL ALK+ ou ALK- (n=34)) le marquage était négatif[554]. Des PCR $V_{\alpha}24$ afin d'identifier une population iNKT ont été réalisées dans le cas du PTCL-NOS et le cas de CTCL (mycosis fongoïde) positifs en immunohistochimie et se sont avérées négatives[554]. Nous avons retrouvé dans les bases de données publiques Oncomine (Compendia Bioscience, https://www.oncomine.com) l'expression de PLZF dans 3 lignées de syndrome de Sézary (SS). En plus des données transcriptomiques publiques de lignées de SS, une analyse de profil d'expression génique rapportée dans la littérature, comparant les cellules tumorales circulantes triées d'un patient atteint de SS aux cellules T normales de ce même patient (sur la base de la clonalité $V_{ß}5.1$), a montré que le gène le plus significativement surexprimé dans les cellules de SS était PLZF[556]. Un article récemment publié a également retrouvé un marquage positif en immunohistochimie dans un cas de mycosis fongoïde (MF) avec envahissement ganglionnaire[554]. Ces éléments, associés à l'inhibition de la voie p53 dans une vaste majorité des SS[557,558] et aux rôles de l'IL-7 et de l'IL-15 dans la survie des cellules de SS[559], nous ont conduit à considérer le SS et/ou le mycosis fongoïde comme des lymphoprolifération de nature potentiellement NKT. Un article récemment publié évoque également la possibilité que les leucémies T-LGL puissent dériver de la transformation de lymphocytes NKT[560]. Néanmoins, l'affirmation repose uniquement sur l'expression du marqueur de type NK appelé NKp46 par les cellules tumorales (retrouvé également dans le modèle murin IL-15 transgénique récapitulant plus ou moins la pathologie humaine) puisque le marquage par le tétramère CD1d-αGalCer est négatif. Comme nous en avons discuté précédemment, ce type d'argument permet seulement de rattacher l'entité à une pathologie du type « NKT-like » qui, nous l'avons vu, est actuellement source de confusion au sein de la communauté scientifique. Il n'est cependant pas exclu, à notre avis, que les leucémies T-LGL puissent dériver de « vrais » lymphocytes NKT de type II mais les outils nécessaires à la démonstration ne sont pas disponibles à l'heure actuelle (tétramères CD1d-sulfatide ou autres).

Les lymphomes NKT que nous avons observés dans le modèle murin p53-déficient dérivent clairement de lymphocytes NKT invariants sur la base du marquage positif par le tétramère CD1d-α-GalCer et du biais manifeste de représentation de familles $V_ß$ ($V_ß8$ dans 6 lymphomes générés dans les souris injectées par *Spn* sur 6 analysés par cytométrie en flux). Une confirmation définitive par RT-PCR des chaînes $V_α$ est attendue (les lymphocytes iNKT murins exprimant la chaîne invariante $V_α14$). Chez l'homme, l'existence d'une entité à part entière dérivant de lymphocytes NKT invariants est a priori exclue puisque l'analyse du répertoire $V_α$ mais surtout $V_β$ est clairement documentée dans la plupart des néoplasies lymphoïdes T et aucune restriction massive en faveur de $V_α24$ ou de $V_β11$ (chaînes semi-invariantes exprimées chez l'homme) n'a été décrite. L'hypothèse du développement de lymphomes T à partir d'une population NKT de type II apparaît largement plus plausible, d'une part car ils sont non invariants et d'autre part parce que leur fréquence semble plus importante chez l'homme que celle des NKT de type I[530]. Même s'ils sont pour la plupart négatifs pour la reconnaissance de l'α-GalCer, l'existence de lymphocytes NKT de type II fixant le tétramère CD1d-α-GalCer a néanmoins été décrite chez l'homme (population $V_α24^-V_ß11^-$, essentiellement $CD8α^+CD8β^+$)[529]. Nous avons donc réalisé un marquage de lignées de SS à l'aide de ce tétramère (SeAx et HuT-78). Aucun marquage n'a cependant été observé avec ce tétramère, en accord avec le phénotype $CD4^+$ des SS. L'absence d'un ligand universel tel que l'α-GalCer pour les lymphocytes NKT de type II rend l'identification d'une telle population chez l'homme beaucoup plus délicate. Nous sommes en train de mettre en œuvre une collaboration avec l'équipe de Mitchell Kronenberg (La Jolla Institute, San Diego, CA, USA) qui dispose d'une part de glycolipides purifiés de *Spn* fixant spécifiquement le TCR de lymphocytes iNKT (afin d'étudier la spécificité des lymphomes que nous avons retrouvés dans le modèle murin) mais aussi de tétramères CD1d-sulfatide, un autre glycolipide que l'α-GalCer capable de marquer un certain nombre de lymphocytes NKT de type II (et donc potentiellement des lymphomes NKT humains)[561,562].

Si aucune fixation par un tétramère couplé à un glycolipide ne s'avère positif dans le SS ou le mycosis fongoïde, une autre approche consistant à restimuler *in vitro* et à analyser la sécrétion cytokinique (IFNγ et IL-4 notamment) des lignées et/ou des cellules primaires est envisagée. Pour cela, nous utiliserions des lignées C1R transfectées par un vecteur codant pour la molécule CD1d humaine ou un vecteur vide contrôle (ou en utilisant un anticorps bloquant CD1d) afin de montrer une éventuelle restriction CD1d pour la présentation antigénique au TCR comme précédemment utilisé –en faisant l'hypothèse que des glycolipides endogènes présentés via le CD1d seraient capable d'activer les lymphocytes s'ils sont CD1d restreint[530]. De la même façon, la prise tumorale cellules primaires chez la souris nude pourrait permettre de tester l'effet d'un traitement par anticorps bloquant anti-CD1d[563,564], argument fort, bien que non formel, en faveur d'une présentation CD1d-restreinte. En effet, alors que la survie des NKT normaux matures est indépendante de contacts CD1d/TCR (contrairement aux NKT immatures)[504,505], la survie des lymphomes murins NKT observés (bien que matures car de phénotype T effecteur-mémoire et activés car exprimant PD-1[565]) semblent dépendre de ces interactions comme en témoignent les expériences de prise tumorale chez une souris receveuse. En

effet, comme nous avons parlé dans la discussion de l'article, nous pensons que la faible prise tumorale dans des souris ß2m$^{-/-}$ est liée à l'absence de CD1d chez ces souris (CD1d étant couplé de façon non covalente à la ß2m). Des expériences de transfert dans des souris CD1d KO sont en cours. Il est tout à fait intrigant que les lymphocytes T CD8^{+} activés chroniquement dans un contexte d'infection virale VIH ou VHC, dits « exhausted T cells », présentent la même caractéristique (dépendance à l'antigène alors que les mémoires classiques sont indépendants de contacts TCR/CMH pour leur survie). L'analogie entre les T CD8^{+} effecteurs-mémoires et les lymphocytes NKT a d'ailleurs déjà été évoquée. L'ensemble de ces données vient renforcer l'idée que nos lymphomes NKT puissent émerger d'une population NKT stimulée chroniquement par son TCR (même si aucune donnée sur l'activation répétée/chronique des NKT n'est publiée à notre connaissance). Par l'ensemble de ces approches *in vitro* (restimulation par des lignées transfectées ou non par CD1d) et *in vivo* (traitement par un anticorps bloquant CD1d), nous espérons démontrer la restriction à une présentation CD1d de certains SS ou mycosis fongoïde, permettant ainsi de définir des NKT de type II[530]. Il est néanmoins nécessaire de supposer : 1/ qu'un glycolipide endogène présenté par le CD1d pourra activer les lymphomes T testés ; 2/ qu'*in vivo* le CD1d murin est capable de présenter à des lignées ou des tumeurs primaires des glycolipides endogènes croisant avec les complexes C1d-glycolipides humains (il est déjà établi que le tétramère CD1d murin-α-GalCer se fixe sur les lymphocytes NKT de type I humains) ; 3/ et enfin que l'inhibition du signal TCR décrite dans le SS[566] n'empêchera pas toute activation TCR-dépendante de ces cellules. Concernant le premier point, même dans l'hypothèse d'une stimulation infectieuse par un ou des agents pathogènes il est peu probable que la persistance de la stimulation soit maintenue par le pathogène seul. En effet, le fait que l'un des gènes les plus surexprimés dans le microenvironnement tumoral des SS soit le CD1d[567] (dans les PBMC non tumoraux) évoque la persistance d'une dépendance à la stimulation par le CD1d dont on imagine difficilement qu'il soit en permanence chargé par des glycolipides purement exogènes au niveau sanguin. Par ailleurs, comme nous l'avons observé dans notre modèle murin, les lymphomes NKT générés chez les souris injectées chroniquement par du pneumocoque sont transférables dans des animaux WT n'ayant jamais vu le pathogène, mais ne sont pas transférables dans des souris ß2m$^{-/-}$ (il nous reste à démontrer que cette absence de prise tumorale est liée à l'absence de CD1d). Comme discuté précédemment dans l'article de cette thèse, 2 hypothèses sont possibles : 1/ soit les lymphomes NKT murins sont indépendants de la stimulation par le pneumocoque et l'augmentation d'incidence est liée à un effet cytokinique et/ou à l'augmentation de présentation de molécules de CD1d chargées par des glycolipides endogènes dans un contexte inflammatoire ; 2/ soit un cross-mimétisme entre des glycolipides endogènes et des glycolipides de *Spn* expliquent à la fois la dépendance au CD1d et la prise tumorale dans des animaux vierges du pathogène. Nous penchons pour la seconde hypothèse puisque la première ne permet pas d'expliquer aisément le biais de répertoire V$_{ß}$8 observé dans les lymphomes NKT du groupe pneumocoque par rapport au groupe PBS.

Par ailleurs, nous avons obtenus chez nos souris p53-déficientes injectées avec du pneumocoque inactivé à la chaleur 3 lymphomes γδ (2 dans des souris p53$^{+/-}$ et 1 dans une souris p53$^{-/-}$) contre aucun

dans les souris du groupe contrôle injecté par du PBS. Ces lymphomes γδ ne sont pas marqués par le tétramère α-GalCer mais expriment le facteur de transcription PLZF (données préliminaires non montrées dans cette thèse), laissant supposer qu'ils dérivent de la population $V_{\gamma}1.1$-$V_{\delta}6.3$ appelée couramment population V6 et présentant des caractéristiques très proches de la population semi-invariante αβ NKT, notamment la capacité à sécréter très rapidement de larges quantités d'IL-4 et d'IFN-γ après stimulation. Bien que cette population particulière de lymphocytes T γδ ne soit pas CD1d-resteinte, elle est communément appelée γδ-NKT. Des marquages spécifiques anti-$V_{\gamma}1.1$ et anti-$V_{\delta}6.3$ sont en cours pour confirmer la nature exacte de ces lymphomes γδ.

Il n'est pas impossible que certains PTCLs non-NKT soient présents dans la série de lymphomes murins étudiée (tous n'ont pu être marqués par le tétramère α-GalCer en absence de cellules congelées en DMSO et l'analyse des V_{α} est en attente). Notamment, la position « d'outliers » dans les analyses de transcriptomes (clustering non supervisé hiérarchique et analyse en composantes principales, figures 4 et 6 de l'article) de 2 de ces lymphomes dont nous n'avons pas de cellules congelées (#110828 pour le groupe pneumocoque et #120412 pour le groupe PBS) pose question. De plus, alors que la nature NKT de type II de certains lymphomes chez l'homme nous semble fort probable, il est clair que tous ne le sont pas.

D. p53 dans la lymphomagénèse T : plus qu'un modèle animal ?

Avant de découvrir la nature NKT des lymphomes murins dans le modèle p53 KO, nous nous sommes posés assez tôt la question du rôle de la voie p53 dans la lymphomagénèse T. En effet, il est intriguant de relever l'implication de plus en plus large de la voie p53 dans les PTCL-NOS[568], les EATL[290] ou le syndrome de Sézary[557,558], de même que l'absence complète de lymphomes B dans notre cohorte de souris $p53^{-/-}$ et leur développement très tardif dans le modèle $p53^{+/-}$. Contrairement aux lymphomes B où l'inactivation de la voie p53 est décrite comme un facteur de progression ou de transformation en pathologie agressive, nous pensons qu'elle pourrait être étiopathogénique dans la lymphomagénèse T, notamment dans un contexte de stimulation antigénique chronique.

Jusqu'à présent, aucun rôle particulier de p53 n'a été décrit dans la réponse adaptative lymphocytaire T que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Notamment, à la fin des années 1990, des expériences *in vitro* ont montré l'absence de rôle de p53 dans l'AICD (activation-induced cell death)[569]. De même, *in vivo* aucune différence majeure en réponse à une infection LCMV n'a été montrée chez les souris p53 KO par rapport à des animaux WT[570]. Ensemble, ces données ont suggéré un rôle minime voire inexistant de la protéine sur le plan immunologique. Concernant la lymphomagénèse, la fréquence d'anomalies de p53, en deçà de celle observée dans les tumeurs solides, et son association à un critère de progression dans les néoplasies B, n'ont pas plus entraîné un engouement massif pour l'étude de cette voie dans la physiopathologies des hémopathies T[571]. Des travaux conduits à la fin des années 1990 montraient déjà pourtant une inactivation de la voie p53 fréquente sans mutation associée dans une large part des hémopathies T matures[572,573]. Des travaux récents basés sur des analyses pan-génomiques (CGHa notamment) et montrant une implication d'acteurs de la voie p53 (*TP63, CDKN2A, WWOX ou ANKRD11*) sans atteinte systématique directe de p53 elle-même dans une large part des PTCL-NOS relance aussi probablement la question[568].

Des données préliminaires obtenus dans notre équipe montrent, qu'*in vitro*, il existe une différence d'apoptose majeure en cas de stimulation chronique (via des billes couplées à des anticorps anti-CD3/anti-CD28) de lymphocytes T périphériques (triés négativement sur colonne magnétique) issus de souris $p53^{-/-}$ comparativement à des lymphocytes T périphériques issus de souris WT (voir figure 19A). De façon tout à fait intrigante, ces cellules acquièrent un phénotype T CD8 mémoire effecteur (figure non montrée) avec perte progressive de l'expression de CD3 et expression atypique du marqueur B220 à un niveau intermédiaire après 3 stimulations (voir figures 19B et 19C). L'expression initiale intense de ce marqueur est bien connue après activation de lymphocytes T *in vitro* ou *in vivo* par un superantigène mais non décrite en cas d'activation chronique à notre connaissance[574,575].

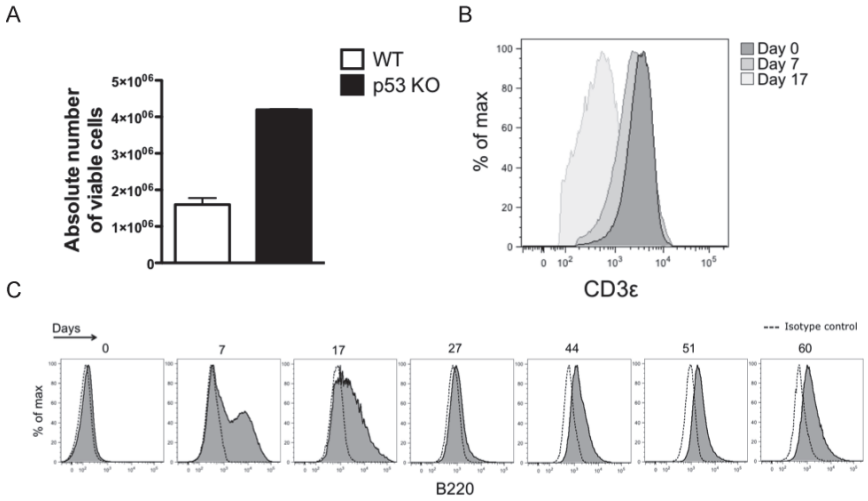


Figure 19. (A) Résultats préliminaires montrant le rôle de p53 dans l'apoptose des lymphocytes T conventionnels stimulés chroniquement *in vitro* par billes anti-CD3/anti-CD28. Viabilité 48h après la 3ème stimulation (chaque stimulation étant réalisée 10 jours après la précédente). (B et C) Acquisition de caractéristiques phénotypiques proches de celles observées dans les lymphomes murins T périphériques de souris p53 KO (diminution progressive de l'expression de CD3 et surexpression de B220 à un niveau intermédiaire après la 3ème stimulation).

Ayant déterminé la nature NKT (invariant αβ pour les PTCLs TCRαβ et probablement $V_{\gamma}1.1$-$V_{\delta}6.3$ pour les γδ étant donnée l'expression de PLZF) très récemment, toutes nos expérimentations *in vitro* ont porté sur des populations T « conventionnelle ». Les expériences vont être réitérées sur des populations iNKT murines triées ($NK1.1^{+}CD5^{+}$) stimulées de façon répétées par anti-CD3/anti-CD28 ou CD1d-α-GalCer. Cependant, l'existence d'une anergie prolongée (jusqu'à 30 jours) dans des lymphocytes NKT stimulés[576,577] et l'absence de protocole établi de stimulation chronique *in vitro* de cette population rend l'approche plus complexe. Il est intéressant de noter que l'anergie générée en réponse à des injections de lymphocytes B pulsées par α-GalCer (contingent cellulaire exprimant fortement le CD1d) est majeure tandis que l'anergie suivant des injections de cellules dendritiques pulsées par α-GalCer semble faible[576]. Il est supposé que le degré d'anergie serait liée à une stimulation TCR forte sans co-signaux activateurs, de la même façon que pour des lymphocytes T conventionnels. Alors que l'activation des NKT est indépendante de la présence de cosignaux, ce qui en fait notamment des acteurs à la frontière de l'immunité innée, l'anergie en serait, elle, dépendante[578]. Une façon de pallier à cette anergie semble être la co-administration d'IL-2. Cette notion est intéressante pour les protocoles futurs cherchant éventuellement à reproduire le développement de lymphomes NKT chez la souris p53 KO à plus large échelle, l'administration d'α-GalCer n'étant peut-être pas la plus adaptée, du moins en l'absence de costimulation.

De façon générale, nous pensons que p53 peut jouer un rôle similaire dans les lymphomagénèses NKT et T conventionnelle en contrôlant spécifiquement l'apoptose des lymphocytes stimulés chroniquement. Le développement privilégié de lymphomes NKT (chez la souris du moins puisque nous ne connaissons pas l'existence d'une entité équivalente chez l'homme) serait lié à la diversité des interactions possibles entre le TCR porté à la surface du lymphocyte NKT, reconnaissant possiblement plusieurs sortes de glycolipides endogènes et bactériens de façon croisée, contre l'unicité d'une

interaction du TCR avec une molécule MHC conventionnelle présentant un antigène peptidique pour le lymphocyte T conventionnel. Des souris CD3ε KO, ne possédant aucune population lymphocytaire T ou NKT, ont été injectées avec des lymphocytes T CD4/CD8 périphériques issu de souris p53 KO, initialement dans l'objectif de contourner la lymphomagénèse thymique représentant 70% des lymphomes des souris p53 KO et d'amplifier le phénomène dans un contexte de prolifération homéostatique sous l'effet notamment de l'IL-7. Trois mois post-injection, ces souris ne présentent pas de signe de développement tumoral alors que la reconstitution du compartiment T a été documentée dans le sang et la rate. A la lumière de la nature NKT des lymphomes que nous avons observés (information obtenue après le début de l'expérimentation), il sera intéressant de voir si ces souris développent des lymphomes T conventionnels (puisque le kit de sélection négative utilisé pour obtenir les lymphocytes T $p53^{-/-}$ déplète a priori la population NKT par la présence d'un anticorps anti-DX5/CD49b[579]). L'apparition de lymphomes T conventionnels dans ces souris serait un argument fort en faveur d'un rôle beaucoup plus large de p53 dans la lymphomagénèse T. De façon similaire, nous allons transférer des lymphocytes iNKT $p53^{-/-}$ matures triés dans des souris CD3ε KO, l'objectif étant de développer un modèle murin de lymphomagénèse NKT dont l'incidence de lymphomes serait supérieure aux 20% observés dans le groupe contrôle de souris $p53^{-/-}$ injectées par du PBS. Par ailleurs, ces expériences de transfert adressent une autre question, à savoir le rôle de l'invalidation de p53 dans les cellules non lymphoïdes, autrement dit le caractère autonome ou non de la transformation lymphomateuse. En effet, p53 est connu comme régulant négativement l'inflammation[580,581], et notamment la production d'IL-15[582] dont le rôle dans la lymphomagénèse est connu. Les souris IL-15 transgéniques développent en effet des lymphomes T et NK[583,584] et le rôle de cette cytokine dans le développement des LGL[226] et de la maladie coeliaque réfractaire[291] (et donc des EATL) est clairement supposé. Dès lors, on peut imaginer que de tels lymphomes NKT (ou T) dans des souris dont seul le compartiment NKT (ou T) est p53-déficient ne puissent pas développer de lymphomes. A ce titre, nous avons regretté initialement, devant l'incidence de tumeurs solides chez les souris p53-déficientes, de n'avoir pas choisi un système Cre-Lox permettant spécifiquement d'éteindre p53 dans le compartiment lymphocytaire T. Néanmoins, d'une part ces systèmes ne nous auraient pas affranchi des lymphomes thymiques majoritaires (puisque les système Lck-Cre, CD2-Cre ou CD4-Cre ne permettent pas de déléter le gène après le stade double positif où surviennent les lymphomes thymiques) et nous auraient peut-être fait passer à côté des lymphomes NKT si le développement de ces lymphomes n'est pas « cell-autonomous ».

p53 contrôle de multiples programmes assurant l'intégrité du génome comme le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose via la voie intrinsèque mitochondriale ou la senescence. Actuellement, nous cherchons à déterminer la contribution de l'inactivation de p53 à la lymphomagénèse murine observée dans notre modèle. Notamment, la présence de caractéristiques cytogénétiques différentes entre les lymphomes thymiques connus pour présenter une aneuploïdie et les PTCLs observés ne présentant pas d'anomalie cytogénétique en M-FISH (voir table de l'article) indique vraisemblablement des mécanismes oncogénétiques différents dans un cas et dans l'autre. En ce qui concerne la

lymphomagénèse thymique immature, il a été démontré que p53 prévient l'aneuploïdie par un contrôle de la duplication du centrosome[585]. Les cellules $p53^{-/-}$ présentent ainsi une hyperamplification du centrosome conduisant à une ségrégation anormale des chromosomes. Des travaux publiés en 2004 dans Nature Genetics indiquent que des souris portant une forme mutée de p53 (*TRP53*$^{515C/515C}$), fonctionnelle pour le contrôle du cycle cellulaire via l'induction de p21 mais déficiente dans sa fonction pro-apoptotique, ne développent pas de lymphomes thymiques. Le contrôle du cycle cellulaire semble donc essentiel pour prévenir l'apparition de lymphome immature dans ce modèle murin. En revanche, les auteurs décrivent la survenue tardive chez ces souris de lymphomes généralisés très agressifs particuliers, présentant des marqueurs T mais aussi le marqueur B B220. La présence de ce marqueur atypique conduit les auteurs à supposer une nature histiocytaire immature de ces lymphomes dont nous savons qu'ils correspondent vraisemblablement aux lymphomes NKT périphériques observés dans notre travail. L'analyse de ce modèle murin dissociant contrôle du cycle cellulaire et apoptose permet de comprendre comment le contrôle du cycle cellulaire par p53 préviendrait l'apparition précoce de lymphomes thymiques immatures tandis que le rôle pro-apoptotique préviendrait la survenue de lymphomes NKT (voir figure 20). Nous souhaitons déterminer quelles sont les cibles, dans la voie apoptotique dépendante de p53, responsables plus particulièrement de l'apoptose des lymphocytes T activés chroniquement par leur TCR. Bim, un membre de la famille *BCL-2* de type « BH-3 only », semble une cible intéressante. En effet, plusieurs publications ont montré, dans des modèles murins, un rôle fondamental de Bim dans l'apoptose des lymphocytes T stimulés chroniquement[435-438]. Jusqu'à présent, le rôle de Bim était essentiellement connu dans l'apoptose médiée par la déprivation cytokinique à l'origine de la contraction clonale suivant la phase d'activation lymphocytaire T (en cas d'infection virale notamment)[431], tandis que l'apoptose des lymphocytes T restimulés était supposée dépendante principalement de la voie Fas-FasL[421]. Nous avons obtenu des vecteurs plasmidiques codant pour le gène Bim humain (collaboration avec Philippe Bouillet, Walter & Eliza Hall Institute, Australie et Douglas R Green, Saint Jude Children's Research Hospital, USA) et espérons montrer l'induction d'une apoptose dans des lymphocytes murins $p53^{-/-}$ stimulés chroniquement *in vitro* après infection par un rétrovirus contenant le vecteur Bim.

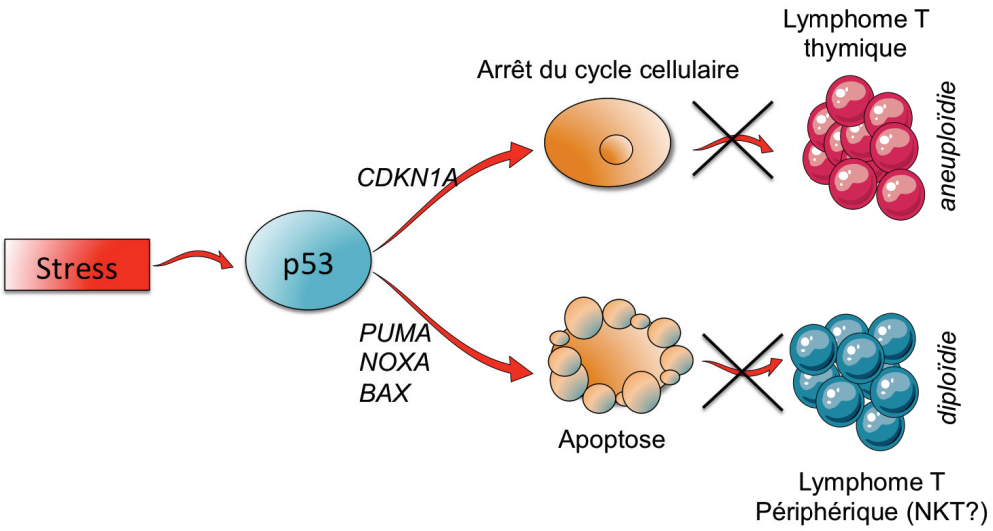


Figure 20. Modèle hypothétique de lymphomagénèse T immature ou mature reposant sur des fonctions distinctes de p53 (contrôle du cycle cellulaire pour la lymphomagénèse immature et apoptose pour la lymphomagénèse mature).

Un autre champ d'investigation est l'origine de la dérégulation de p53 dans les néoplasies lymphoïdes T au sens large puisque dans la plupart des entités le taux de mutations et/ou de pertes d'hétérozygotie sur la région p53 est minime[572,573,586]. Nous nous intéressons actuellement au rôle potentiel de Notch-1 dans l'inactivation de la voie p53. En effet, celle-ci a clairement été documentée *in vitro* par une inhibition en aval de p53[587]. En pathologie humaine les amplifications de la région contenant le gène Notch-1 sont les plus fréquentes dans les EATL[588] (où, rappelons-le, près de 100% des tumeurs sont marquées en immunohistochimie par l'anticorps anti-p53[290], accumulation révélant une voie probablement non-fonctionnelle) et les mutations activatrices de Notch-1 sont très fréquemment retrouvées dans les syndromes de Sézary[589,590]. Par ailleurs, les souris Notch-1 transgéniques développent des lymphomes T[591]. Enfin, plus en amont de Notch-1, nous cherchons un élément potentiellement « mutagène » qui pourrait expliquer l'apparition de mutations activatrices de Notch-1 et la cascade menant à la lymphomagénèse T mature, au moins dans certains cas. La protéine AID, dont le rôle dans la lymphomagénèse B est clairement établi et dont nous avons parlé dans la partie introductive, nous semble être un candidat potentiel. En effet, l'équipe de Honjo a montré que les souris AID transgéniques développaient des lymphomes T et non B, ceci de façon tout à fait inattendue. Hors ces lymphomes étaient soit thymiques, soit périphériques PD-1^{+}B220^{int} avec un biais de répertoire V$_{ß}$8[592]. Plus qu'une coïncidence, nous sommes convaincus que ces lymphomes T sont des lymphomes NKT similaires à ceux que nous observons et résultent de la même façon de l'inactivation de la voie p53. Le séquençage des régions hotspots de p53 n'a pas révélé de mutations particulières générées dans ces lymphomes T[593], à la différence de mutations très fréquentes au niveau de Notch-1[594]. Par ailleurs, toujours la même équipe a montré avec l'utilisation d'un modèle transgénique murin contenant un rapporteur GFP, l'expression d'AID dans des lymphocytes CD4^{+} du tube digestif[595]. Dès lors nous pensons qu'une activation chronique de certains lymphocytes T (à

l'interface avec l'immunité innée : NKT, certains IEL ?) pourrait être capable d'induire l'expression d'AID, entraînant des mutations de Notch-1 et inhiberait la voie p53 pour conduire à la lymphomagénèse T (figure 21). Nous sommes en train d'essayer de nous procurer les lignées « AID transgénique » et « AID rapporteur » afin de documenter une telle hypothèse. Par ailleurs, une collaboration avec l'équipe de Philippe Gaulard (Inserm U955, Hôpital Henri Mondor) afin de documenter une éventuelle expression d'AID dans des lymphomes T matures (PTCL-NOS, EATL etc…) est en cours.

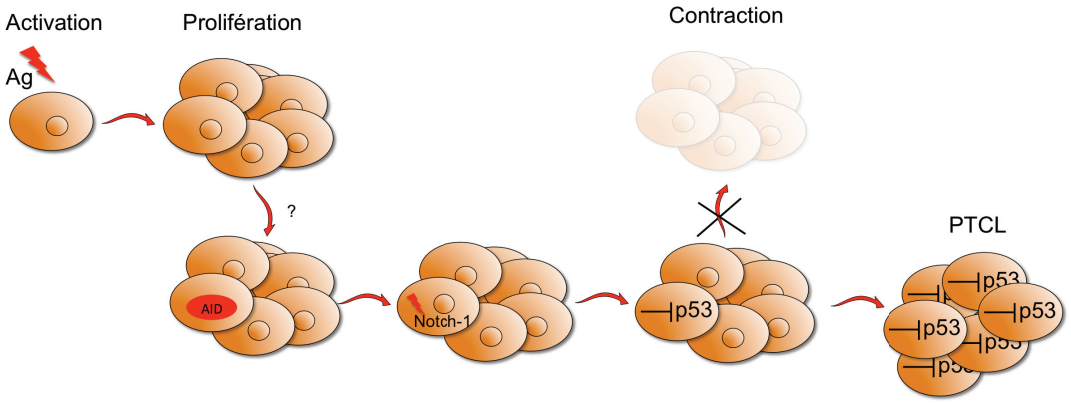


Figure 21. Modèle hypothétique de transformation par induction d'AID dans des lymphocytes T ou des lymphocytes NKT stimulés via des mutations de Notch-1 entraînant l'inactivation de la voie p53 et une absence de contraction clonale. Abréviations : Ag, antigène ; PTCL, peripheral T-cell lymphoma.

E. Lymphomagénèse T et stimulation antigénique chronique : vers un nouveau paradigme ?

Si l'on suppose que l'ensemble des lymphomes périphériques rencontrés dans notre modèle murin p53 KO dérivent de cellules NKT invariantes (ce qui demande à être confirmé par la détermination de la chaîne V_{α}), il est remarquable que ces cellules à l'interface entre immunité adaptative et immunité innée soient particulièrement susceptibles à la transformation oncogénique. Il est tentant de postuler, comme nous l'avons fait, que la stimulation antigénique chronique est à l'origine de ce processus de transformation. En effet, même si cela ne peut être exclu, il n'y a pas, *a priori*, de raison pour que ces cellules soient intrinsèquement plus à risque de transformation que des lymphocytes T conventionnels. A ce titre, les homologies entre les lymphocytes T $CD8^+$ mémoires et les lymphocytes NKT ont été plusieurs fois relevées[504]. Néanmoins, en comparaison des lymphocytes T conventionnels[596], notamment $CD8^+$, peu de choses sont connues concernant la stimulation chronique des lymphocytes NKT. Il semble établi qu'après une unique activation, les lymphocytes NKT entre dans un état d'anergie pouvant durer près d'un mois[576,577,597,598]. Néanmoins, cette caractéristique a été démontrée après l'administration d'α-GalCer, ligand *a priori* non physiologique des NKT, dont la constante d'association avec le TCR est parmi les plus élevées jamais rencontrées[599,600]. Par ailleurs, il est établi que la présentation de l'α-GalCer sans molécule de costimulation induit une anergie plus prononcée. Des expériences utilisant l'administration de cellules dendritiques chargées par l'α-GalCer induisent ainsi une anergie nettement moins importante que l'administration de lymphocytes B chargés par l'α-GalCer (qui possèdent moins de molécules de costimulation que ces dernières)[577]. On peut donc envisager que l'administration de pneumocoque inactivé à la chaleur ait pu induire une stimulation répétée TCR-dépendante des lymphocytes NKT avec une anergie minime. Hormis le biais $V_{\beta}8$ retrouvé dans les lymphomes NKT du groupe pneumocoque, l'existence de 2 régions CDR3 identiques (figure 22) sur les premiers séquençages obtenus (collaboration avec Patrice Marche, IAB, Grenoble) dans 2 lymphomes distincts, laisse peu de doute quant au rôle d'une stimulation spécifique par un glycolipide exogène pneumococcique. Par ailleurs, la stimulation directe de lymphocytes NKT par des glycolipides de *Spn* présentés par une molécule de CD1d a clairement été documentée par l'équipe de Kronenberg[561], tout comme ils avaient montré la reconnaissance spécifique de glycolipides de *Borrelia sp.* quelques années auparavant[562]. On ne peut néanmoins éliminer l'hypothèse que l'inflammation induite par les injections répétées de pneumocoque ait pu entraîner la présentation spécifique d'un glycolipide endogène (voir figure 16, activation directe ou indirecte des NKT). L'activation des NKT par la bactérie Gram négative, LPS-positive, *Salmonella sp.* est ainsi absolument dépendante de la signalisation par les TLR via les molécules MyD88 et Trif. Il est supposé que l'activation TLR-dépendante des cellules dendritiques, et la production d'IL-12 qui en découle, soit le prérequis pour l'activation des lymphocytes NKT dans le cas de cette bactérie particulière[515,601]. En revanche, l'activation des lymphocytes NKT dans le cas d'une infection parasitaire à helminthe (œufs de *Schistosoma mansoni*) ne requiert aucune activation des cellules dendritiques MyD88

dépendante, mais requiert la reconnaissance du glycolipide endogène iGb3[602]. Des résultats préliminaires suggèrent que les lymphomes NKT apparaissent dans des doubles KO MyD88$^{-/-}$p53$^{-/-}$ que nous avons générés, et ceci avec ou sans injection de pneumococque inactivé à la chaleur. Dès lors, on peut imaginer que l'activation des cellules dendritiques par des ligands de TLR ne soit pas une nécessité dans notre modèle murin de lymphomagénèse, laissant à penser, du moins dans le cas du groupe pneumocoque, que la stimulation du TCR soit directe par des glycolipides pneumococciques. Nous espérons pouvoir confirmer la reconnaissance directe de tels glycolipides pneumococciques par les lymphomes NKT cryoconservés à l'aide des outils développés par l'équipe de Mitchell Kronenberg (La Jolla Institute, San Diego, CA, USA). Le cas du groupe PBS est plus complexe, puisqu'il peut s'agir de glycolipides endogènes tels que iGb3 mais aussi de glycolipides de la flore commensale, l'ensemble des ligands glycolipidiques exogènes étant loin d'avoir été défini. Dans tous les cas, nous pensons que les signatures transcriptomiques obtenues, et notamment l'extinction massive des gènes de la voie du TCR, sont très évocateurs d'une stimulation chronique TCR-dépendante dans le cas du groupe pneumocoque mais aussi du groupe contrôle, même si la preuve formelle reste à établir.

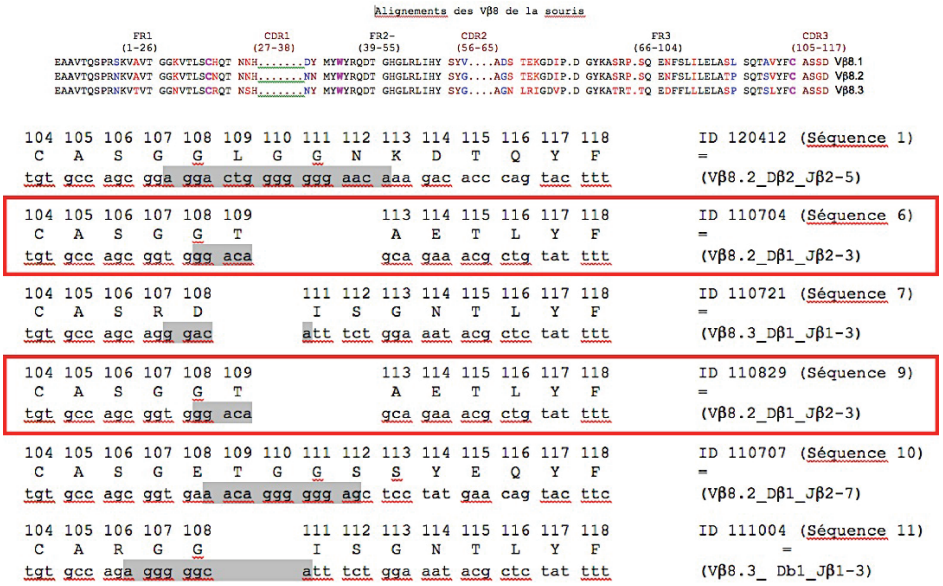


Figure 22. Séquençage et alignement des séquences de 6 lymphomes NKT périphériques exprimant une chaîne Vß8, obtenus dans le modèle murin p53-déficient (groupe pneumocoque=5 lymphomes, groupe PBS=1 lymphome (ID 120412)). Noter 2 lymphomes NKT porteurs de la même chaîne Vß8 et de la même séquence CDR3 (encadrés en rouge). En position 104, on retrouve la cystéine (C) canonique des Vß et en position 118, la phénylalanine (F) canonique des Jß. La séquence ombrée correspond aux régions de réarrangements contenant les séquences Dß et les additions N.

L'hypothèse d'une transformation de cellules à la frontière de l'immunité innée et de l'immunité adaptatrice, chroniquement stimulées par des ligands glycolipidiques endogènes ou exogènes, pourrait entraîner une conception radicalement différente de la lymphomagénèse T si de telles entités sont

retrouvées chez l'homme. Notamment, jusqu'à présent, l'hypothèse d'une lymphomagénèse en contexte de stimulation antigénique chronique était quasi-exclusivement évoquée pour la lymphomagénèse B, surtout les lymphomes de la zone marginale comme discuté dans l'introduction de ce travail de thèse. Même si l'idée d'un lien entre lymphome T et infection chronique ou maladie auto-immune a été envisagée pour le cas des leucémies à LGL, du syndrome de Sézary, du mycosis fongoïde ou des EATL, aucune preuve ni aucun modèle physiopathologique clair n'ont été établis. Il nous semble tout à fait intriguant que ces 3 pathologies concentrent des anomalies récurrentes, régulièrement évoquées dans la littérature, suggérant qu'elles puissent dériver de telles cellules à la frontière entre immunités innée et adaptative. Ainsi, au-delà d'une hypothèse de stimulation (auto)-antigénique, des anomalies de la voie p53 ont été évoquées dans les 3 entités, des marqueurs NK sont fréquemment retrouvés et il existe des biais dans l'utilisation des V_{β}. Même si l'hypothèse d'une nature unique, de type NKT de type II par exemple, semble peu probable, d'autres lymphocytes T non-conventionnels (c'est-à-dire notamment stimulés par des molécules CMH de classe I « like » telles que CD1a, b ou c chez l'homme, MICA ou MICB ou par des antigènes non présentés par des molécules CMH-like tels que les lymphocytes γδ) nous paraît envisageable[603,604]. Ainsi, les lymphocytes T CD8αα dont on pense qu'ils peuvent être activés par des ligands MHC-I non-conventionnels (Thymic leukemia antigen ou TL chez la souris dont l'équivalent chez l'homme n'est pas connu mais pourrait être le HLA-G), pourraient être d'autres candidats potentiels. A ce titre, il est intéressant de noter que ces molécules MHC-I like, telles que TL chez la souris, sont exprimées principalement au niveau des entérocytes et sont surexprimées en cas d'inflammation. On imagine ainsi comment une maladie auto-immune du tube digestif puisse entraîner une surexpression de molécules de MHC-I non-conventionnelles activant de façon non spécifique des clones particuliers de lymphocytes intra-épithéliaux et aboutissant *in fine* à une transformation tumorale en cas de déficit de la voie p53 par exemple. Il est par ailleurs éloquent que de récents polymorphismes de HLA-G aient été associés au risque de développement de maladie coeliaque[605].

F. Perspectives

Pour conclure, en ce qui concerne le modèle animal, nous cherchons actuellement à explorer plusieurs axes concernant ce rôle de la stimulation antigénique chronique dans le modèle p53-déficient même si tous ne pourront être poursuivis:

1/ genèse d'un modèle de développement maximal de lymphomes NKT murins en s'affranchissement des lymphomes thymiques: souris p53 thymectomisées à l'âge de 4-5 semaines, transfert de iNKT $p53^{-/-}$ dans des souris CD3ε KO, modèle Cre-Lox spécifique (PLZF-Cre ou autre) chacun permettant aussi de tester une hypothèse complémentaire (rôle des émigrants thymiques iNKT dans la lymphomagénèse, développement tumoral « cell-autonomous » ou non par exemple) ;

2/ étude d'autres modes de stimulation : bactéries vivantes (notamment *Borrelia sp.*), voie intranasal pour le pneumocoque inactivé ou non, α-GalCer injecté par voie systémique ou cellules dendritiques chargées par α-GalCer ;

3/ analyse du développement de lymphomes NKT en conditions axéniques afin d'identifier le rôle éventuel de la flore commensale ;

3/ poursuite des expériences de lymphomagénèse chez des souris $p53^{-/-}$MyD88$^{-/-}$ afin de déterminer la contribution des voies de signalisation des TLR (sauf TLR3 reposant sur TRIF et TLR4 reposant en partie sur TRIF) et de l'IL-1R ;

4/ étude des souris KO pour le gène de la ß-hexosaminidase B (responsable de la génération du principal ligand endogène iGb3) et p53 afin de déterminer la contribution d'une stimulation endogène versus exogène ;

5/ reconstitution de la population intra-épithéliale lymphocytaire intestinale par des lymphocytes p53-/- (transfert ? modèle Cre-Lox ?) dans l'objectif de développer un modèle d'EATL.

Pour ce qui concerne l'homme, nous sommes en train d'explorer également plusieurs axes de recherche, parallèlement bien sûr à l'identification d'une éventuelle entité NKT humaine, thème largement développé précédemment :

1/ documentation d'une éventuelle inactivation de la voie p53 dans les leucémies T-LGL, généralisant ainsi l'hypothèse d'un rôle central de cette voie dans les hémopathies supposées liées à une stimulation antigénique chronique. A ce propos, il est intéressant de noter que des mutations de STAT3 entraînant son activation constitutive ont été décrites dans près de 30-40% des cas de leucémies T-LGL[606] (et plus récemment dans les NK-LGL[607]). Or, il est établi que STAT3 est capable d'inhiber p53 au niveau transcriptionnel[608]. Les résultats sont attendus dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr Thierry Lamy (Hôpital Pontchaillou, Rennes) et le service d'hématologie cellulaire de la Pitié Salpêtrière (Dr Magali Legarff Tavernier, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris) ;

2/ recherche d'une éventuelle signature transcriptomique (sur les données publiques de microarrays : GEO, Gene Expression Omnibus, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) en faveur : d'une inhibition de la voie du TCR évocatrice d'une stimulation chronique TCR-dépendante, d'une expression de PLZF ou

autres gènes surexprimés dans les lymphocytes T non conventionnels dans les LGL, PTCL-NOS, EATL, SS et mycosis fongoïde;
3/ étude de l'expression d'AID dans les lymphomes T matures et corrélations éventuelles avec, d'une part, des mutations de Notch-1 par séquençage et, d'autre part, une surexpression de p53 en immunohistochimie (couplée à un séquençage de p53 afin de démontrer une accumulation de la protéine non liée à une mutation – ie un statut mutationnel mutuellement exclusif de p53 et Notch-1).

Partant d'une hypothèse où nous souhaitions modéliser la lymphomagénèse humaine dans un modèle animal, il est original que nous ayons abouti à la démarche inverse, à savoir la recherche chez l'homme d'une corrélation avec une nouvelle entité décrite chez la souris. Il est vraisemblable que l'identification d'hémopathies lymphoïdes à la frontière entre l'immunité innée et l'immunité adaptative dépendra sans doute du développement de nouveaux outils permettant le marquage spécifiques de telles populations lymphocytaires (tétramères de CD1a, b, c ou e couplés avec leurs ligands pour l'heure inconnus, tétramères de CD1d avec divers glycolipides tels que le sulfamide ou autres). Enfin, au-delà de l'identification précise d'un lymphome NKT chez l'homme, nous espérons déterminer de façon plus large dans quelle mesure une stimulation chronique associée à une altération de la voie p53 peut jouer un rôle dans la lymphomagénèse T humaine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Swerdlow, S., Campo, E. & Harris, N. World Health Organization Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *IARC Press* (2008).
2. Inghirami, G., Foitl, D.R., Sabichi, A., Zhu, B.Y. & Knowles, D.M. Autoantibody-associated cross-reactive idiotype-bearing human B lymphocytes: distribution and characterization, including Ig VH gene and CD5 antigen expression. *Blood* **78**, 1503-1515 (1991).
3. Kipps, T.J. The CD5 B cell. *Adv Immunol* **47**, 117-185 (1989).
4. Hummel, M., Tamaru, J., Kalvelage, B. & Stein, H. Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle. *Blood* **84**, 403-407 (1994).
5. Chiorazzi, N., Rai, K.R. & Ferrarini, M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **352**, 804-815 (2005).
6. Jaffe, E.S. Pathobiology of peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **126**, 317-322 (2006).
7. de Leval, L.*, et al.* The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood* **109**, 4952-4963 (2007).
8. Dupuis, J.*, et al.* Expression of CXCL13 by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL): a new diagnostic marker providing evidence that AITL derives from follicular helper T cells. *Am J Surg Pathol* **30**, 490-494 (2006).
9. Morton, L.M.*, et al.* Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* **107**, 265-276 (2006).
10. Adamson, P.*, et al.* Time trends in the registration of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas in Europe. *Eur J Cancer* **43**, 391-401 (2007).
11. Armitage, J.O. & Weisenburger, D.D. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* **16**, 2780-2795 (1998).
12. Anderson, J.R., Armitage, J.O. & Weisenburger, D.D. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol* **9**, 717-720 (1998).
13. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* **89**, 3909-3918 (1997).
14. Wang, S.S.*, et al.* Family history of hematopoietic malignancies and risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL): a pooled analysis of 10 211 cases and 11 905 controls from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph). *Blood* **109**, 3479-3488 (2007).
15. Frankenfeld, C.L.*, et al.* Dietary flavonoid intake and non-Hodgkin lymphoma risk. *Am J Clin Nutr* **87**, 1439-1445 (2008).
16. Viel, J.F.*, et al.* Risk for non Hodgkin's lymphoma in the vicinity of French municipal solid waste incinerators. *Environ Health* **7**, 51 (2008).
17. Viel, J.F.*, et al.* Dioxin emissions from a municipal solid waste incinerator and risk of invasive breast cancer: a population-based case-control study with GIS-derived exposure. *Int J Health Geogr* **7**, 4 (2008).
18. Orsi, L.*, et al.* Occupation and lymphoid malignancies: results from a French case-control study. *J Occup Environ Med* **49**, 1339-1350 (2007).
19. Boffetta, P.*, et al.* Exposure to ultraviolet radiation and risk of malignant lymphoma and multiple myeloma--a multicentre European case-control study. *Int J Epidemiol* **37**, 1080-1094 (2008).
20. Swerdlow, S., Campo, E. & Vardiman, J.W. World Health Organisation Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. (2008).
21. Kuppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L. & Rajewsky, K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* **341**, 1520-1529 (1999).
22. Kuppers, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* **5**, 251-262 (2005).
23. Stevenson, F.K.*, et al.* The occurrence and significance of V gene mutations in B cell-derived human malignancy. *Adv Cancer Res* **83**, 81-116 (2001).

24. Alizadeh, A.A., *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503-511 (2000).
25. Klein, U., *et al.* Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* **194**, 1625-1638 (2001).
26. Shaffer, A.L., Rosenwald, A. & Staudt, L.M. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nature reviews. Immunology* **2**, 920-932 (2002).
27. Kuppers, R. & Dalla-Favera, R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* **20**, 5580-5594 (2001).
28. Willis, T.G. & Dyer, M.J. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* **96**, 808-822 (2000).
29. Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E. & Croce, C.M. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* **229**, 1390-1393 (1985).
30. Hiom, K., Melek, M. & Gellert, M. DNA transposition by the RAG1 and RAG2 proteins: a possible source of oncogenic translocations. *Cell* **94**, 463-470 (1998).
31. Goossens, T., Klein, U. & Kuppers, R. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2463-2468 (1998).
32. Bross, L., *et al.* DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity* **13**, 589-597 (2000).
33. Pasqualucci, L., *et al.* Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* **412**, 341-346 (2001).
34. Kraus, M., Alimzhanov, M.B., Rajewsky, N. & Rajewsky, K. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* **117**, 787-800 (2004).
35. Lam, K.P., Kuhn, R. & Rajewsky, K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* **90**, 1073-1083 (1997).
36. Gunven, P., Klein, G., Klein, E., Norin, T. & Singh, S. Surface immunoglobulins on Burkitt's lymphoma biopsy cells from 91 patients. *Int J Cancer* **25**, 711-719 (1980).
37. Segal, G.H., *et al.* Concomitant delineation of surface Ig, B-cell differentiation antigens, and HLADR on lymphoid proliferations using three-color immunocytometry. *Cytometry* **12**, 350-359 (1991).
38. de Jong, D., *et al.* Translocation t(14;18) in B cell lymphomas as a cause for defective immunoglobulin production. *J Exp Med* **169**, 613-624 (1989).
39. Meeker, T., *et al.* Emergence of idiotype variants during treatment of B-cell lymphoma with anti-idiotype antibodies. *N Engl J Med* **312**, 1658-1665 (1985).
40. Klein, U., *et al.* Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev* **162**, 261-280 (1998).
41. Kanzler, H., Kuppers, R., Hansmann, M.L. & Rajewsky, K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* **184**, 1495-1505 (1996).
42. Gaidano, G. & Carbone, A. Primary effusion lymphoma: a liquid phase lymphoma of fluid-filled body cavities. *Adv Cancer Res* **80**, 115-146 (2001).
43. Timms, J.M., *et al.* Target cells of Epstein-Barr-virus (EBV)-positive post-transplant lymphoproliferative disease: similarities to EBV-positive Hodgkin's lymphoma. *Lancet* **361**, 217-223 (2003).
44. Caldwell, R.G., Wilson, J.B., Anderson, S.J. & Longnecker, R. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* **9**, 405-411 (1998).
45. Streubel, B., Vinatzer, U., Willheim, M., Raderer, M. & Chott, A. Novel t(5;9)(q33;q22) fuses ITK to SYK in unspecified peripheral T-cell lymphoma. *Leukemia* **20**, 313-318 (2006).
46. Huang, Y., *et al.* Peripheral T-cell lymphomas with a follicular growth pattern are derived from follicular helper T cells (TFH) and may show overlapping features with angioimmunoblastic T-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* **33**, 682-690 (2009).
47. Mason, D.Y., *et al.* CD30-positive large cell lymphomas ('Ki-1 lymphoma') are associated with a chromosomal translocation involving 5q35. *Br J Haematol* **74**, 161-168 (1990).

48. Morris, S.W., *et al.* Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* **263**, 1281-1284 (1994).
49. Brito-Babapulle, V. & Catovsky, D. Inversions and tandem translocations involving chromosome 14q11 and 14q32 in T-prolymphocytic leukemia and T-cell leukemias in patients with ataxia telangiectasia. *Cancer Genet Cytogenet* **55**, 1-9 (1991).
50. Feldman, A.L., *et al.* Incidence of TCR and TCL1 gene translocations and isochromosome 7q in peripheral T-cell lymphomas using fluorescence in situ hybridization. *American Journal of Clinical Pathology* **130**, 178-185 (2008).
51. Almire, C., *et al.* PVRL2 is translocated to the TRA@ locus in t(14;19)(q11;q13)-positive peripheral T-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* **46**, 1011-1018 (2007).
52. Feldman, A.L., *et al.* Recurrent translocations involving the IRF4 oncogene locus in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **23**, 574-580 (2009).
53. Piccaluga, P.P., *et al.* Gene expression analysis of angioimmunoblastic lymphoma indicates derivation from T follicular helper cells and vascular endothelial growth factor deregulation. *Cancer Research* **67**, 10703-10710 (2007).
54. Lemonnier, F., *et al.* Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters. *Blood* (2012).
55. 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).
56. Murray, F., *et al.* Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* **111**, 1524-1533 (2008).
57. Dunn-Walters, D., Thiede, C., Alpen, B. & Spencer, J. Somatic hypermutation and B-cell lymphoma. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**, 73-82 (2001).
58. Darzentas, N., *et al.* A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia* **24**, 125-132 (2010).
59. Epstein, M.A., Achong, B.G. & Barr, Y.M. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **1**, 702-703 (1964).
60. Frand, U.I. & Ramot, B. [Malignant Lymphomata in Israel. An Epidemiological Study Based on 399 Cases]. *Harefuah* **65**, 83-86 (1963).
61. Ramot, B., Shahin, N. & Bubis, J.J. Malabsorption Syndrome in Lymphoma of Small Intestine. A Study of 13 Cases. *Isr J Med Sci* **1**, 221-226 (1965).
62. Seligmann, M., Danon, F., Hurez, D., Mihaesco, E. & Preud'homme, J.L. Alpha-chain disease: a new immunoglobulin abnormality. *Science* **162**, 1396-1397 (1968).
63. Galian, A., *et al.* Pathological study of alpha-chain disease, with special emphasis on evolution. *Cancer* **39**, 2081-2101 (1977).
64. Isaacson, P. & Wright, D.H. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* **52**, 1410-1416 (1983).
65. Isaacson, P. & Wright, D.H. Extranodal malignant lymphoma arising from mucosa-associated lymphoid tissue. *Cancer* **53**, 2515-2524 (1984).
66. Hill, A.B. The Environment and Disease: Association or Causation? *Proc R Soc Med* **58**, 295-300 (1965).
67. Wotherspoon, A.C., Ortiz-Hidalgo, C., Falzon, M.R. & Isaacson, P.G. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *The Lancet* **338**, 1175-1176 (1991).
68. Doglioni, C., Wotherspoon, A.C., Moschini, A., de Boni, M. & Isaacson, P.G. High incidence of primary gastric lymphoma in northeastern Italy. *Lancet* **339**, 834-835 (1992).
69. Parsonnet, J., *et al.* Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* **330**, 1267-1271 (1994).
70. Wotherspoon, A.C., *et al.* Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori. *The Lancet* **342**, 575-577 (1993).
71. Isaacson, P.G., *et al.* Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma treated by eradication of H. pylori with antibodies. *Gastroenterology* **117**, 750-751 (1999).

72. Bayerdorffer, E.*, et al.* Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of Helicobacter pylori infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet* **345**, 1591-1594 (1995).
73. Horstmann, M., Erttmann, R. & Winkler, K. Relapse of MALT lymphoma associated with Helicobacter pylori after antibiotic treatment. *Lancet* **343**, 1098-1099 (1994).
74. Savio, A.*, et al.* Relapse of low-grade gastric MALT lymphoma after Helicobacter pylori eradication: true relapse or persistence? Long-term post-treatment follow-up of a multicenter trial in the north-east of Italy and evaluation of the diagnostic protocol's adequacy. *Recent Results Cancer Res* **156**, 116-124 (2000).
75. Fischbach, W., Goebeler-Kolve, M.E., Dragosics, B., Greiner, A. & Stolte, M. Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive Helicobacter pylori eradication therapy: experience from a large prospective series. *Gut* **53**, 34-37 (2004).
76. Hussell, T., Isaacson, P.G., Crabtree, J.E. & Spencer, J. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to Helicobacter pylori. *Lancet* **342**, 571-574 (1993).
77. Hussell, T., Isaacson, P.G., Crabtree, J.E. & Spencer, J. Helicobacter pylori-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *J Pathol* **178**, 122-127 (1996).
78. 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).
79. Hauer, A.C., Finn, T.M., MacDonald, T.T., Spencer, J. & Isaacson, P.G. Analysis of TH1 and TH2 cytokine production in low grade B cell gastric MALT-type lymphomas stimulated in vitro with Helicobacter pylori. *J Clin Pathol* **50**, 957-959 (1997).
80. Knorr, C.*, et al.* Expression of costimulatory molecules in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphomas in vivo. *Am J Pathol* **155**, 2019-2027 (1999).
81. Mueller, A.*, et al.* The role of antigenic drive and tumor-infiltrating accessory cells in the pathogenesis of helicobacter-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Pathol* **167**, 797-812 (2005).
82. Qin, Y.*, et al.* Somatic hypermutation in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type B-cell lymphoma. *Blood* **86**, 3528-3534 (1995).
83. Du, M.*, et al.* Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **10**, 1190-1197 (1996).
84. Hussell, T., Isaacson, P.G., Crabtree, J.E., Dogan, A. & Spencer, J. Immunoglobulin specificity of low grade B cell gastrointestinal lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) type. *Am J Pathol* **142**, 285-292 (1993).
85. Greiner, A.*, et al.* Idiotype identity in a MALT-type lymphoma and B cells in Helicobacter pylori associated chronic gastritis. *Lab Invest* **70**, 572-578 (1994).
86. Craig, V.J.*, et al.* Gastric MALT lymphoma B cells express polyreactive, somatically mutated immunoglobulins. *Blood* **115**, 581-591 (2010).
87. Hoogeboom, R., Bende, R.J. & van Noesel, C.J. MALT lymphoma-derived rheumatoid factors are nonpolyreactive high-affinity antibodies. *Blood* **116**, 1818-1819; author reply 1819-1820 (2010).
88. Lenze, D.*, et al.* Influence of antigen on the development of MALT lymphoma. *Blood* **107**, 1141-1148 (2006).
89. Enno, A.*, et al.* MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with Helicobacter felis. A mouse model of Helicobacter pylori-induced gastric lymphoma. *Am J Pathol* **147**, 217-222 (1995).
90. Enno, A., O'Rourke, J., Braye, S., Howlett, R. & Lee, A. Antigen-dependent progression of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma in the stomach. Effects of antimicrobial therapy on gastric MALT lymphoma in mice. *Am J Pathol* **152**, 1625-1632 (1998).
91. Fischbach, W., Jung, T., Goebeler-Kolve, M. & Eck, M. Comparative analysis of the Helicobacter pylori status in patients with gastric MALT-type lymphoma and their respective spouses. *Z Gastroenterol* **38**, 627-630 (2000).

92. Jukes, T.H. & King, J.L. Evolutionary nucleotide replacements in DNA. *Nature* **281**, 605-606 (1979).
93. Isaacson, P.G. & Price, S.K. Light chains in Mediterranean lymphoma. *J Clin Pathol* **38**, 601-607 (1985).
94. Smith, W.J., Price, S.K. & Isaacson, P.G. Immunoglobulin gene rearrangement in immunoproliferative small intestinal disease (IPSID). *J Clin Pathol* **40**, 1291-1297 (1987).
95. Harzic, M.*, et al.* [Bacteriological, parasitological and virological study of the digestive flora in alpha-chain disease]. *Gastroenterol Clin Biol* **9**, 472-479 (1985).
96. Fischbach, W., Tacke, W., Greiner, A., Konrad, H. & Muller, H. Regression of immunoproliferative small intestinal disease after eradication of Helicobacter pylori. *Lancet* **349**, 31-32 (1997).
97. Malekzadeh, R.*, et al.* Lack of association between Helicobacter pylori infection and immunoproliferative small intestinal disease. *Arch Iran Med* **2**, 1-4 (1999).
98. Puri, A.S.*, et al.* Explosive Campylobacter jejuni diarrhea in immunoproliferative small intestinal disease. *Indian J Gastroenterol* **11**, 141-143 (1992).
99. Isaacson, P. Middle East lymphoma and alpha-chain disease. An immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* **3**, 431-441 (1979).
100. Uren, T.K.*, et al.* Role of the polymeric Ig receptor in mucosal B cell homeostasis. *J Immunol* **170**, 2531-2539 (2003).
101. Al-Saleem, T. & Al-Mondhiry, H. Immunoproliferative small intestinal disease (IPSID): a model for mature B-cell neoplasms. *Blood* **105**, 2274-2280 (2005).
102. Nieters, A.*, et al.* Hepatitis C and risk of lymphoma: results of the European multicenter case-control study EPILYMPH. *Gastroenterology* **131**, 1879-1886 (2006).
103. Giordano, T.P.*, et al.* Risk of non-Hodgkin lymphoma and lymphoproliferative precursor diseases in US veterans with hepatitis C virus. *Jama* **297**, 2010-2017 (2007).
104. Dal Maso, L. & Franceschi, S. Hepatitis C virus and risk of lymphoma and other lymphoid neoplasms: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**, 2078-2085 (2006).
105. de Sanjose, S.*, et al.* Hepatitis C and non-Hodgkin lymphoma among 4784 cases and 6269 controls from the International Lymphoma Epidemiology Consortium. *Clin Gastroenterol Hepatol* **6**, 451-458 (2008).
106. Matsuo, K.*, et al.* Effect of hepatitis C virus infection on the risk of non-Hodgkin's lymphoma: a meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Sci* **95**, 745-752 (2004).
107. Ambrosetti, A.*, et al.* Most cases of primary salivary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma are associated either with Sjoegren syndrome or hepatitis C virus infection. *Br J Haematol* **126**, 43-49 (2004).
108. Arcaini, L.*, et al.* Splenic and nodal marginal zone lymphomas are indolent disorders at high hepatitis C virus seroprevalence with distinct presenting features but similar morphologic and phenotypic profiles. *Cancer* **100**, 107-115 (2004).
109. Collier, J.D.*, et al.* No association between hepatitis C and B-cell lymphoma. *Hepatology* **29**, 1259-1261 (1999).
110. McColl, M.D.*, et al.* The role of hepatitis C virus in the aetiology of non-Hodgkins lymphoma--a regional association? *Leuk Lymphoma* **26**, 127-130 (1997).
111. Hermine, O.*, et al.* Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **347**, 89-94 (2002).
112. Saadoun, D.*, et al.* Splenic lymphoma with villous lymphocytes, associated with type II cryoglobulinemia and HCV infection: a new entity? *Blood* **105**, 74-76 (2005).
113. Kelaidi, C.*, et al.* Response to antiviral treatment in hepatitis C virus-associated marginal zone lymphomas. *Leukemia* **18**, 1711-1716 (2004).
114. Vallisa, D.*, et al.* Role of anti-hepatitis C virus (HCV) treatment in HCV-related, low-grade, B-cell, non-Hodgkin's lymphoma: a multicenter Italian experience. *J Clin Oncol* **23**, 468-473 (2005).
115. Bachy, E., Besson, C., Suarez, F. & Hermine, O. Hepatitis C virus infection and lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **2**, e2010004 (2010).
116. Pileri, P.*, et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938-941 (1998).

117. Machida, K., *et al.* Hepatitis C virus infection activates the immunologic (type II) isoform of nitric oxide synthase and thereby enhances DNA damage and mutations of cellular genes. *J Virol* **78**, 8835-8843 (2004).
118. Machida, K., *et al.* Hepatitis C virus induces a mutator phenotype: enhanced mutations of immunoglobulin and protooncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4262-4267 (2004).
119. Machida, K., *et al.* Hepatitis C virus causes uncoupling of mitotic checkpoint and chromosomal polyploidy through the Rb pathway. *J Virol* **83**, 12590-12600 (2009).
120. Sansonno, D., *et al.* Hepatitis C virus productive infection in mononuclear cells from patients with cryoglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* **147**, 241-248 (2007).
121. Levine, A.M., Shimodaira, S. & Lai, M.M. Treatment of HCV-related mantle-cell lymphoma with ribavirin and pegylated interferon Alfa. *N Engl J Med* **349**, 2078-2079 (2003).
122. Suarez, F., Lefrere, F., Besson, C. & Hermine, O. Splenic lymphoma with villous lymphocytes, mixed cryoglobulinemia and HCV infection: deciphering the role of HCV in B-cell lymphomagenesis. *Dig Liver Dis* **39 Suppl 1**, S32-37 (2007).
123. Casato, M., Lagana, B., Antonelli, G., Dianzani, F. & Bonomo, L. Long-term results of therapy with interferon-alpha for type II essential mixed cryoglobulinemia. *Blood* **78**, 3142-3147 (1991).
124. Mazzaro, C., *et al.* Regression of monoclonal B-cell expansion in patients affected by mixed cryoglobulinemia responsive to alpha-interferon therapy. *Cancer* **77**, 2604-2613 (1996).
125. Saadoun, D. & Cacoub, P. Treatment with Peg-interferon alfa-2b and ribavirin of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia. *J Hepatol* **43**, 737; author reply 738 (2005).
126. Saadoun, D., Resche-Rigon, M., Thibault, V., Piette, J.C. & Cacoub, P. Antiviral therapy for hepatitis C virus--associated mixed cryoglobulinemia vasculitis: a long-term followup study. *Arthritis Rheum* **54**, 3696-3706 (2006).
127. Marasca, R., *et al.* Immunoglobulin gene mutations and frequent use of VH1-69 and VH4-34 segments in hepatitis C virus-positive and hepatitis C virus-negative nodal marginal zone B-cell lymphoma. *Am J Pathol* **159**, 253-261 (2001).
128. Ivanovski, M., *et al.* Somatic hypermutation, clonal diversity, and preferential expression of the VH 51p1/VL kv325 immunoglobulin gene combination in hepatitis C virus-associated immunocytomas. *Blood* **91**, 2433-2442 (1998).
129. De Re, V., *et al.* HCV-NS3 and IgG-Fc crossreactive IgM in patients with type II mixed cryoglobulinemia and B-cell clonal proliferations. *Leukemia* **20**, 1145-1154 (2006).
130. Quinn, E.R., *et al.* The B-cell receptor of a hepatitis C virus (HCV)-associated non-Hodgkin lymphoma binds the viral E2 envelope protein, implicating HCV in lymphomagenesis. *Blood* **98**, 3745-3749 (2001).
131. Flint, M. & McKeating, J.A. The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. *Rev Med Virol* **10**, 101-117 (2000).
132. Machida, K., Cheng, K.T., Pavio, N., Sung, V.M. & Lai, M.M. Hepatitis C virus E2-CD81 interaction induces hypermutation of the immunoglobulin gene in B cells. *J Virol* **79**, 8079-8089 (2005).
133. Batten, M., *et al.* BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med* **192**, 1453-1466 (2000).
134. Fabris, M., *et al.* B-Lymphocyte stimulator (BLyS) up-regulation in mixed cryoglobulinaemia syndrome and hepatitis-C virus infection. *Rheumatology (Oxford)* **46**, 37-43 (2007).
135. Sene, D., *et al.* Hepatitis C virus-associated B-cell proliferation--the role of serum B lymphocyte stimulator (BLyS/BAFF). *Rheumatology (Oxford)* **46**, 65-69 (2007).
136. Matteucci, C., *et al.* Different genomic imbalances in low- and high-grade HCV-related lymphomas. *Leukemia* **22**, 219-222 (2008).
137. Zuckerman, E., *et al.* The effect of antiviral therapy on t(14;18) translocation and immunoglobulin gene rearrangement in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Blood* **97**, 1555-1559 (2001).
138. Burgdorfer, W., *et al.* Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science* **216**, 1317-1319 (1982).
139. de la Fouchardiere, A., Vandenesch, F. & Berger, F. Borrelia-associated primary cutaneous MALT lymphoma in a nonendemic region. *Am J Surg Pathol* **27**, 702-703 (2003).
140. Cerroni, L., Zochling, N., Putz, B. & Kerl, H. Infection by Borrelia burgdorferi and cutaneous B-cell lymphoma. *J Cutan Pathol* **24**, 457-461 (1997).

141. Kutting, B., Bonsmann, G., Metze, D., Luger, T.A. & Cerroni, L. Borrelia burgdorferi-associated primary cutaneous B cell lymphoma: complete clearing of skin lesions after antibiotic pulse therapy or intralesional injection of interferon alfa-2a. *J Am Acad Dermatol* **36**, 311-314 (1997).
142. Anttila, T.I*., et al.* Serological evidence of an association between chlamydial infections and malignant lymphomas. *Br J Haematol* **103**, 150-156 (1998).
143. Laurila, A.L*., et al.* Serological evidence of an association between Chlamydia pneumoniae infection and lung cancer. *Int J Cancer* **74**, 31-34 (1997).
144. Coupland, S.E., Foss, H.D., Anagnostopoulos, I., Hummel, M. & Stein, H. Immunoglobulin VH gene expression among extranodal marginal zone B-cell lymphomas of the ocular adnexa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 555-562 (1999).
145. Williams, D.G. & Taylor, P.C. Clonal analysis of immunoglobulin mRNA in rheumatoid arthritis synovium: characterization of expanded IgG3 populations. *Eur J Immunol* **27**, 476-485 (1997).
146. Silberstein, L.E*., et al.* Variable region gene analysis of pathologic human autoantibodies to the related i and I red blood cell antigens. *Blood* **78**, 2372-2386 (1991).
147. Isenberg, D., Spellerberg, M., Williams, W., Griffiths, M. & Stevenson, F. Identification of the 9G4 idiotope in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* **32**, 876-882 (1993).
148. de Cremoux, P*., et al.* Re: Evidence for an association between Chlamydia psittaci and ocular adnexal lymphomas. *J Natl Cancer Inst* **98**, 365-366 (2006).
149. Chanudet, E*., et al.* Chlamydia psittaci is variably associated with ocular adnexal MALT lymphoma in different geographical regions. *J Pathol* **209**, 344-351 (2006).
150. Goebel, N*., et al.* Chlamydia psittaci, Helicobacter pylori and ocular adnexal lymphoma-is there an association? The German experience. *Leukemia Research* **31**, 1450-1452 (2007).
151. Ruiz, A*., et al.* Extranodal marginal zone B-cell lymphomas of the ocular adnexa: multiparameter analysis of 34 cases including interphase molecular cytogenetics and PCR for Chlamydia psittaci. *Am J Surg Pathol* **31**, 792-802 (2007).
152. Vargas, R.L*., et al.* Is there an association between ocular adnexal lymphoma and infection with Chlamydia psittaci? The University of Rochester experience. *Leukemia Research* **30**, 547-551 (2006).
153. Zhang, G.S*., et al.* Lack of an association between Chlamydia psittaci and ocular adnexal lymphoma. *Leukemia & lymphoma* **48**, 577-583 (2007).
154. Rosado, M.F*., et al.* Ocular adnexal lymphoma: a clinicopathologic study of a large cohort of patients with no evidence for an association with Chlamydia psittaci. *Blood* **107**, 467-472 (2006).
155. Chan, C.C*., et al.* Detection of Helicobacter pylori and Chlamydia pneumoniae genes in primary orbital lymphoma. *Trans Am Ophthalmol Soc* **104**, 62-70 (2006).
156. Ferreri, A.J*., et al.* Association between Helicobacter pylori infection and MALT-type lymphoma of the ocular adnexa: clinical and therapeutic implications. *Hematol Oncol* **24**, 33-37 (2006).
157. Sjo, N.C*., et al.* Role of Helicobacter pylori in conjunctival mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Ophthalmology* **114**, 182-186 (2007).
158. Lee, S.B., Yang, J.W. & Kim, C.S. The association between conjunctival MALT lymphoma and Helicobacter pylori. *Br J Ophthalmol* **92**, 534-536 (2008).
159. Arnaud, P*., et al.* Hepatitis C virus infection and MALT-type ocular adnexal lymphoma. *Ann Oncol* **18**, 400-401; author reply 401-403 (2007).
160. Madico, G., Quinn, T.C., Boman, J. & Gaydos, C.A. Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of Chlamydia trachomatis, C. pneumoniae, and C. psittaci using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes. *J Clin Microbiol* **38**, 1085-1093 (2000).
161. Decaudin, D*., et al.* Variable association between Chlamydophila psittaci infection and ocular adnexal lymphomas: methodological biases or true geographical variations? *Anticancer Drugs* **19**, 761-765 (2008).
162. Ruskone-Fourmestraux, A*., et al.* EGILS consensus report. Gastric extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT. *Gut* **60**, 747-758 (2011).
163. Chen, L.T*., et al.* Prospective study of Helicobacter pylori eradication therapy in stage I(E) high-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the stomach. *J Clin Oncol* **19**, 4245-4251 (2001).

164. Morgner, A., *et al.* Complete remission of primary high-grade B-cell gastric lymphoma after cure of Helicobacter pylori infection. *J Clin Oncol* **19**, 2041-2048 (2001).
165. Kuo, S.H., *et al.* Helicobacter pylori eradication therapy is effective in the treatment of early-stage H pylori-positive gastric diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* **119**, 4838-4844 (2012).
166. Besson, C., *et al.* Characteristics and outcome of diffuse large B-cell lymphoma in hepatitis C virus-positive patients in LNH 93 and LNH 98 Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte programs. *J Clin Oncol* **24**, 953-960 (2006).
167. Dores, G.M., *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol* **139**, 809-819 (2007).
168. Matutes, E., *et al.* The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **8**, 1640-1645 (1994).
169. Fais, F., *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* **102**, 1515-1525 (1998).
170. Damle, R.N., *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1840-1847 (1999).
171. Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G. & Stevenson, F.K. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1848-1854 (1999).
172. Klein, U. & Dalla-Favera, R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature reviews. Immunology* **8**, 22-33 (2008).
173. Tobin, G., *et al.* Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood* **101**, 4952-4957 (2003).
174. Messmer, B.T., Albesiano, E., Messmer, D. & Chiorazzi, N. The pattern and distribution of immunoglobulin VH gene mutations in chronic lymphocytic leukemia B cells are consistent with the canonical somatic hypermutation process. *Blood* **103**, 3490-3495 (2004).
175. Ghia, P., *et al.* Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* **105**, 1678-1685 (2005).
176. Stamatopoulos, K., *et al.* Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* **109**, 259-270 (2007).
177. Schroeder, H.W., Jr. & Dighiero, G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* **15**, 288-294 (1994).
178. Hervé, M., *et al.* Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J. Clin. Invest.* **115**, 1636-1643 (2005).
179. Forster, I., Gu, H. & Rajewsky, K. Germline antibody V regions as determinants of clonal persistence and malignant growth in the B cell compartment. *Embo J* **7**, 3693-3703 (1988).
180. Montecino-Rodriguez, E. & Dorshkind, K. New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends in Immunology* **27**, 428-433 (2006).
181. Fischer, M., Klein, U. & Kuppers, R. Molecular single-cell analysis reveals that CD5-positive peripheral blood B cells in healthy humans are characterized by rearranged Vkappa genes lacking somatic mutation. *J Clin Invest* **100**, 1667-1676 (1997).
182. Weller, S., *et al.* Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* **104**, 3647-3654 (2004).
183. Pasqualucci, L., Neri, A., Baldini, L., Dalla-Favera, R. & Migliazza, A. BCL-6 mutations are associated with immunoglobulin variable heavy chain mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Research* **60**, 5644-5648 (2000).
184. Fukita, Y., Jacobs, H. & Rajewsky, K. Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* **9**, 105-114 (1998).
185. Matejuk, A., *et al.* Exclusion of natural autoantibody-producing B cells from IgG memory B cell compartment during T cell-dependent immune responses. *J Immunol* **182**, 7634-7643 (2009).
186. Catera, R., *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells recognize conserved epitopes associated with apoptosis and oxidation. *Mol Med* **14**, 665-674 (2008).

187. Chu, C.C., *et al.* Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. *Blood* **112**, 5122-5129 (2008).
188. Stevenson, F.K. & Caligaris-Cappio, F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* **103**, 4389-4395 (2004).
189. Ghiotto, F., *et al.* Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* **113**, 1008-1016 (2004).
190. Briles, D.E., *et al.* Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 streptococcus pneumoniae. *J Exp Med* **153**, 694-705 (1981).
191. Ochsenbein, A.F., *et al.* Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* **286**, 2156-2159 (1999).
192. Diamond, B. & Scharff, M.D. Somatic mutation of the T15 heavy chain gives rise to an antibody with autoantibody specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5841-5844 (1984).
193. Lanemo Myhrinder, A., *et al.* A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood* **111**, 3838-3848 (2008).
194. Landgren, O., *et al.* Respiratory tract infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **109**, 2198-2201 (2007).
195. Kienle, D., *et al.* VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* **102**, 3003-3009 (2003).
196. Orchard, J., *et al.* A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood* **101**, 4975-4981 (2003).
197. Camacho, F.I., *et al.* Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood* **101**, 4042-4046 (2003).
198. Schraders, M., *et al.* Hypermutation in mantle cell lymphoma does not indicate a clinical or biological subentity. *Mod Pathol* **22**, 416-425 (2009).
199. Thorselius, M., *et al.* Somatic hypermutation and V(H) gene usage in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* **68**, 217-224 (2002).
200. Walsh, S.H., *et al.* Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood* **101**, 4047-4054 (2003).
201. Thelander, E.F. & Rosenquist, R. Molecular genetic characterization reveals new subsets of mantle cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma* **49**, 1042-1049 (2008).
202. Hadzidimitriou, A., *et al.* Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood* **118**, 3088-3095 (2011).
203. Loughran, T.P., Jr., *et al.* Leukemia of large granular lymphocytes: association with clonal chromosomal abnormalities and autoimmune neutropenia, thrombocytopenia, and hemolytic anemia. *Ann Intern Med* **102**, 169-175 (1985).
204. Dhodapkar, M.V., Li, C.Y., Lust, J.A., Tefferi, A. & Phyliky, R.L. Clinical spectrum of clonal proliferations of T-large granular lymphocytes: a T-cell clonopathy of undetermined significance? *Blood* **84**, 1620-1627 (1994).
205. Loughran, T.P., Jr. Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood* **82**, 1-14 (1993).
206. Bareau, B., *et al.* Analysis of a French cohort of patients with large granular lymphocyte leukemia: a report on 229 cases. *Haematologica* **95**, 1534-1541 (2010).
207. Lamy, T. & Loughran, T.P., Jr. How I treat LGL leukemia. *Blood* **117**, 2764-2774 (2011).
208. Wherry, E.J. T cell exhaustion. *Nat Immunol* **131**, 492-499 (2011).
209. Fischer, L., Hummel, M., Burmeister, T., Schwartz, S. & Thiel, E. Skewed expression of natural-killer (NK)-associated antigens on lymphoproliferations of large granular lymphocytes (LGL). *Hematol Oncol* **24**, 78-85 (2006).
210. Gorczyca, W., *et al.* An approach to diagnosis of T-cell lymphoproliferative disorders by flow cytometry. *Cytometry* **50**, 177-190 (2002).
211. Lundell, R., Hartung, L., Hill, S., Perkins, S.L. & Bahler, D.W. T-cell large granular lymphocyte leukemias have multiple phenotypic abnormalities involving pan-T-cell antigens and receptors for MHC molecules. *American Journal of Clinical Pathology* **124**, 937-946 (2005).

212. Morice, W.G., Kurtin, P.J., Leibson, P.J., Tefferi, A. & Hanson, C.A. Demonstration of aberrant T-cell and natural killer-cell antigen expression in all cases of granular lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **120**, 1026-1036 (2003).
213. van Dongen, J.J*., et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **17**, 2257-2317 (2003).
214. Yang, J*., et al.* Antigen activation and impaired Fas-induced death-inducing signaling complex formation in T-large-granular lymphocyte leukemia. *Blood* **111**, 1610-1616 (2007).
215. Starkebaum, G. Chronic neutropenia associated with autoimmune disease. *Semin Hematol* **39**, 121-127 (2002).
216. Langerak, A.W*., et al.* Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalphabeta T-cell proliferations. *Blood* **98**, 165-173 (2001).
217. Zambello, R*., et al.* Analysis of the T cell receptor in the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: superantigen activation of clonal CD3+ granular lymphocytes. *Cancer Research* **55**, 6140-6145 (1995).
218. Davey, M.P., Starkebaum, G. & Loughran, T.P., Jr. CD3+ leukemic large granular lymphocytes utilize diverse T-cell receptor V beta genes. *Blood* **85**, 146-150 (1995).
219. Lima, M*., et al.* Immunophenotypic analysis of the TCR-Vbeta repertoire in 98 persistent expansions of CD3(+)/TCR-alphabeta(+) large granular lymphocytes: utility in assessing clonality and insights into the pathogenesis of the disease. *Am J Pathol* **159**, 1861-1868 (2001).
220. O'Keefe, C.L*., et al.* Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J Immunol* **172**, 1960-1969 (2004).
221. Wlodarski, M.W*., et al.* Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia. *Blood* **106**, 2769-2780 (2005).
222. Garrido, P*., et al.* Monoclonal TCR-Vbeta13.1+/CD4+/NKa+/CD8-/+dim T-LGL lymphocytosis: evidence for an antigen-driven chronic T-cell stimulation origin. *Blood* **109**, 4890-4898 (2007).
223. Rodriguez-Caballero, A*., et al.* Expanded cells in monoclonal TCR- +/CD4+/NKa+/CD8-/+dim T-LGL lymphocytosis recognize hCMV antigens. *Blood* **112**, 4609-4616 (2008).
224. Shah, M.V*., et al.* Molecular profiling of LGL leukemia reveals role of sphingolipid signaling in survival of cytotoxic lymphocytes. *Blood* **112**, 770-781 (2008).
225. Zhang, R*., et al.* Network model of survival signaling in large granular lymphocyte leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 16308-16313 (2008).
226. Chen, J*., et al.* Increased serum soluble IL-15R levels in T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood* **119**, 137-143 (2012).
227. Epling-Burnette, P.K*., et al.* ERK couples chronic survival of NK cells to constitutively activated Ras in lymphoproliferative disease of granular lymphocytes (LDGL). *Oncogene* **23**, 9220-9229 (2004).
228. Epling-Burnette, P.K*., et al.* Clinical improvement by farnesyltransferase inhibition in NK large granular lymphocyte leukemia associated with imbalanced NK receptor signaling. *Blood* **112**, 4694-4698 (2008).
229. Schade, A.E., Powers, J.J., Wlodarski, M.W. & Maciejewski, J.P. Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase pathway activation protects leukemic large granular lymphocytes from undergoing homeostatic apoptosis. *Blood* **107**, 4834-4840 (2006).
230. Epling-Burnette, P.K*., et al.* Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest* **107**, 351-362 (2001).
231. Shah, M.V., Zhang, R. & Loughran Jr., T.P. Never Say Die: Survival Signaling in Large Granular Lymphocyte Leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* **9**, S244-S253 (2009).
232. Fierro, M.T*., et al.* CD45RA+ immunophenotype in mycosis fungoides: clinical, histological and immunophenotypical features in 22 patients. *J Cutan Pathol* **28**, 356-362 (2001).

233. Tothova, S.M., Bonin, S., Trevisan, G. & Stanta, G. Mycosis fungoides: is it a Borrelia burgdorferi-associated disease? *British journal of cancer* **94**, 879-883 (2006).
234. Pancake, B.A., Zucker-Franklin, D. & Coutavas, E.E. The cutaneous T cell lymphoma, mycosis fungoides, is a human T cell lymphotropic virus-associated disease. A study of 50 patients. *J Clin Invest* **95**, 547-554 (1995).
235. Shimakage, M.*, et al.* Expression of Epstein-Barr virus in cutaneous T-cell lymphoma including mycosis fungoides. *Int J Cancer* **92**, 226-231 (2001).
236. Herne, K.L., Talpur, R., Breuer-McHam, J., Champlin, R. & Duvic, M. Cytomegalovirus seropositivity is significantly associated with mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Blood* **101**, 2132-2136 (2003).
237. Boni, R., Davis-Daneshfar, A., Burg, G., Fuchs, D. & Wood, G.S. No detection of HTLV-I proviral DNA in lesional skin biopsies from Swiss and German patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol* **134**, 282-284 (1996).
238. Wood, G.S.*, et al.* Evidence against a role for human T-cell lymphotrophic virus type I (HTLV-I) in the pathogenesis of American cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* **107**, 301-307 (1996).
239. Jackow, C.M.*, et al.* Association of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma, superantigen-positive Staphylococcus aureus, and oligoclonal T-cell receptor V beta gene expansion. *Blood* **89**, 32-40 (1997).
240. Abrams, J.T., Balin, B.J. & Vonderheid, E.C. Association between Sezary T cell-activating factor, Chlamydia pneumoniae, and cutaneous T cell lymphoma. *Ann N Y Acad Sci* **941**, 69-85 (2001).
241. van der Fits, L.*, et al.* A restricted clonal T-cell receptor αβ repertoire in Sézary syndrome is indicative of superantigenic stimulation. *British Journal of Dermatology* **165**, 78-84 (2011).
242. Dereure, O., Levi, E., Vonderheid, E.C. & Kadin, M.E. Infrequent Fas mutations but no Bax or p53 mutations in early mycosis fungoides: a possible mechanism for the accumulation of malignant T lymphocytes in the skin. *J Invest Dermatol* **118**, 949-956 (2002).
243. Nagasawa, T.*, et al.* Fas gene mutations in mycosis fungoides: analysis of laser capture-microdissected specimens from cutaneous lesions. *Oncology* **67**, 130-134 (2004).
244. Nakamura, S., Akazawa, K., Yao, T. & Tsuneyoshi, M. A clinicopathologic study of 233 cases with special reference to evaluation with the MIB-1 index. *Cancer* **76**, 1313-1324 (1995).
245. Harris, N.L.*, et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* **84**, 1361-1392 (1994).
246. Bordessoule, D., Gaulard, P. & Mason, D.Y. Preferential localisation of human lymphocytes bearing gamma delta T cell receptors to the red pulp of the spleen. *J Clin Pathol* **43**, 461-464 (1990).
247. Bucy, R.P., Chen, C.L. & Cooper, M.D. Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T gamma delta cells in humans. *J Immunol* **142**, 3045-3049 (1989).
248. Belhadj, K.*, et al.* Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: report on a series of 21 patients. *Blood* **102**, 4261-4269 (2003).
249. Travert, M.*, et al.* Molecular features of hepatosplenic T-cell lymphoma unravels potential novel therapeutic targets. *Blood* (2012).
250. Kraus, M.D.*, et al.* T gamma/delta hepatosplenic lymphoma in a heart transplant patient after an Epstein-Barr virus positive lymphoproliferative disorder: a case report. *Cancer* **82**, 983-992 (1998).
251. Wu, H.*, et al.* Hepatosplenic gamma-delta T-cell lymphoma as a late-onset posttransplant lymphoproliferative disorder in renal transplant recipients. *American Journal of Clinical Pathology* **113**, 487-496 (2000).
252. Chauvet, E., Misslin, C., Randrianjohany, A., Gaulard, P. & Daigre, J.L. LymphomeT gamma-delta : complication possible d'une splénomégalie palustre hyperactive ? *La Revue de Médecine Interne* **30**, 85-87 (2009).
253. Hassan, R.*, et al.* Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma following seven malaria infections. *Pathol Int* **56**, 668-673 (2006).
254. Ozaki, S.*, et al.* Hepatosplenic gamma delta T-cell lymphoma associated with hepatitis B virus infection. *J Med Invest* **44**, 215-217 (1998).

255. Bates, I. & Bedu-Addo, G. Chronic malaria and splenic lymphoma: clues to understanding lymphoma evolution. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **11**, 2162-2167 (1997).
256. Falk, M.C.*, et al.* T-cell receptor V gamma and V delta gene expression in serial renal allograft biopsies. *Transplant Proc* **26**, 10-12 (1994).
257. Falini, B.*, et al.* Distribution of T cells bearing different forms of the T cell receptor gamma/delta in normal and pathological human tissues. *J Immunol* **143**, 2480-2488 (1989).
258. Arnulf, B.*, et al.* Nonhepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma: a subset of cytotoxic lymphomas with mucosal or skin localization. *Blood* **91**, 1723-1731 (1998).
259. Brennan, F.M.*, et al.* T cells expressing gamma delta chain receptors in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* **1**, 319-326 (1988).
260. Halstensen, T.S., Scott, H. & Brandtzaeg, P. Intraepithelial T cells of the TcR gamma/delta+ CD8- and V delta 1/J delta 1+ phenotypes are increased in coeliac disease. *Scand J Immunol* **30**, 665-672 (1989).
261. Hohlfeld, R., Engel, A.G., Ii, K. & Harper, M.C. Polymyositis mediated by T lymphocytes that express the gamma/delta receptor. *N Engl J Med* **324**, 877-881 (1991).
262. Horsman, D.E., Gascoyne, R.D., Coupland, R.W., Coldman, A.J. & Adomat, S.A. Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14; 18) in follicular lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology* **103**, 472-478 (1995).
263. Greeve, J.*, et al.* Expression of activation-induced cytidine deaminase in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **101**, 3574-3580 (2003).
264. Ramiro, A.R.*, et al.* AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* **118**, 431-438 (2004).
265. Roulland, S.*, et al.* BCL-2/JH translocation in peripheral blood lymphocytes of unexposed individuals: lack of seasonal variations in frequency and molecular features. *Int J Cancer* **104**, 695-698 (2003).
266. Schmitt, C.*, et al.* The bcl-2/IgH rearrangement in a population of 204 healthy individuals: occurrence, age and gender distribution, breakpoints, and detection method validity. *Leuk Res* **30**, 745-750 (2006).
267. Summers, K.E.*, et al.* Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* **19**, 420-424 (2001).
268. McDonnell, T.J. & Korsmeyer, S.J. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* **349**, 254-256 (1991).
269. McDonnell, T.J.*, et al.* bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* **57**, 79-88 (1989).
270. Roulland, S.*, et al.* Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med* **203**, 2425-2431 (2006).
271. Agopian, J.*, et al.* Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 1473-1483 (2009).
272. Roulland, S.*, et al.* Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Res* **64**, 2264-2269 (2004).
273. Kitay-Cohen, Y.*, et al.* Bcl-2 rearrangement in patients with chronic hepatitis C associated with essential mixed cryoglobulinemia type II. *Blood* **96**, 2910-2912 (2000).
274. Bakhshi, A.*, et al.* Mechanism of the t(14;18) chromosomal translocation: structural analysis of both derivative 14 and 18 reciprocal partners. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2396-2400 (1987).
275. Smit, L.A.*, et al.* Expression of activation-induced cytidine deaminase is confined to B-cell non-Hodgkin's lymphomas of germinal-center phenotype. *Cancer Research* **63**, 3894-3898 (2003).
276. Bende, R.J., Smit, L.A. & van Noesel, C.J. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **21**, 18-29 (2007).
277. Wolfe, F. & Michaud, K. Lymphoma in rheumatoid arthritis: the effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy in 18,572 patients. *Arthritis and rheumatism* **50**, 1740-1751 (2004).

278. Askling, J., *et al.* Haematopoietic malignancies in rheumatoid arthritis: lymphoma risk and characteristics after exposure to tumour necrosis factor antagonists. *Ann Rheum Dis* **64**, 1414-1420 (2005).
279. Franklin, J., Lunt, M., Bunn, D., Symmons, D. & Silman, A. Incidence of lymphoma in a large primary care derived cohort of cases of inflammatory polyarthritis. *Ann Rheum Dis* **65**, 617-622 (2006).
280. Kauppi, M., Pukkala, E. & Isomaki, H. Elevated incidence of hematologic malignancies in patients with Sjogren's syndrome compared with patients with rheumatoid arthritis (Finland). *Cancer Causes Control* **8**, 201-204 (1997).
281. Pertovaara, M., Pukkala, E., Laippala, P., Miettinen, A. & Pasternack, A. A longitudinal cohort study of Finnish patients with primary Sjogren's syndrome: clinical, immunological, and epidemiological aspects. *Ann Rheum Dis* **60**, 467-472 (2001).
282. Theander, E., *et al.* Lymphoma and other malignancies in primary Sjogren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Ann Rheum Dis* **65**, 796-803 (2006).
283. Smedby, K.E., *et al.* Autoimmune and chronic inflammatory disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma by subtype. *J Natl Cancer Inst* **98**, 51-60 (2006).
284. Bjornadal, L., Lofstrom, B., Yin, L., Lundberg, I.E. & Ekbom, A. Increased cancer incidence in a Swedish cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* **31**, 66-71 (2002).
285. Bernatsky, S., Clarke, A. & Ramsey-Goldman, R. Malignancy and systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* **4**, 351-358 (2002).
286. Holm, L.E., Blomgren, H. & Lowhagen, T. Cancer risks in patients with chronic lymphocytic thyroiditis. *N Engl J Med* **312**, 601-604 (1985).
287. Kato, I., *et al.* Chronic thyroiditis as a risk factor of B-cell lymphoma in the thyroid gland. *Jpn J Cancer Res* **76**, 1085-1090 (1985).
288. Derringer, G.A., *et al.* Malignant lymphoma of the thyroid gland: a clinicopathologic study of 108 cases. *Am J Surg Pathol* **24**, 623-639 (2000).
289. Hill, C.L., *et al.* Frequency of specific cancer types in dermatomyositis and polymyositis: a population-based study. *Lancet* **357**, 96-100 (2001).
290. Murray, A., Cuevas, E.C., Jones, D.B. & Wright, D.H. Study of the immunohistochemistry and T cell clonality of enteropathy-associated T cell lymphoma. *AJPA* **146**, 509-519 (1995).
291. Malamut, G., *et al.* IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease–associated inflammation and lymphomagenesis. *J. Clin. Invest.* **120**, 2131-2143 (2010).
292. Stein, H., *et al.* The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* **66**, 848-858 (1985).
293. Benharroch, D., *et al.* ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood* **91**, 2076-2084 (1998).
294. Bonzheim, I., *et al.* Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. *Blood* **104**, 3358-3360 (2004).
295. Foss, H.D., *et al.* Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood* **88**, 4005-4011 (1996).
296. Falini, B., *et al.* ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum. *Am J Pathol* **153**, 875-886 (1998).
297. de Jong, D., *et al.* Anaplastic large-cell lymphoma in women with breast implants. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **300**, 2030-2035 (2008).
298. de Jong, D., *et al.* Anaplastic large-cell lymphoma in women with breast implants. *JAMA* **300**, 2030-2035 (2008).
299. Wong, A.K., Lopategui, J., Clancy, S., Kulber, D. & Bose, S. Anaplastic large cell lymphoma associated with a breast implant capsule: a case report and review of the literature. *Am. J. Surg. Pathol.* **32**, 1265-1268 (2008).
300. Aladily, T.N., *et al.* Anaplastic Large Cell Lymphoma Associated With Breast Implants: A Report of 13 Cases. *Am J Surg Pathol* (2012).

301. Aladily, T.N., Medeiros, L.J., Alayed, K. & Miranda, R.N. Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma: a newly recognized entity that needs further refinement of its definition. *Leukemia & lymphoma* **53**, 749-750 (2012).
302. van Diest, P.J., Beekman, W.H. & Hage, J.J. Pathology of silicone leakage from breast implants. *J Clin Pathol* **51**, 493-497 (1998).
303. Adams, J.M.*, et al.* The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* **318**, 533-538 (1985).
304. Davis, R.E.*, et al.* Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* **463**, 88-92 (2010).
305. Latour, S., Fournel, M. & Veillette, A. Regulation of T-cell antigen receptor signalling by Syk tyrosine protein kinase. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 4434-4441 (1997).
306. Feldman, A.L.*, et al.* Overexpression of Syk tyrosine kinase in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **22**, 1139-1143 (2008).
307. Pechloff, K.*, et al.* The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 1031-1044 (2010).
308. Wang, X.*, et al.* TCR-dependent transformation of mature memory phenotype T cells in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 3834-3845 (2011).
309. Boyman, O. A major histocompatibility complex class I-dependent subset of memory phenotype CD8+ cells. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 1817-1825 (2006).
310. Murali-Krishna, K.*, et al.* Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* **286**, 1377-1381 (1999).
311. Luckey, C.J.*, et al.* Memory T and memory B cells share a transcriptional program of self-renewal with long-term hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3304-3309 (2006).
312. Xiong, J., Armato, M.A. & Yankee, T.M. Immature single-positive CD8+ thymocytes represent the transition from Notch-dependent to Notch-independent T-cell development. *International Immunology* **23**, 55-64 (2011).
313. Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E. & Petrie, H.T. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* **194**, 127-134 (2001).
314. MacDonald, H.R., Radtke, F. & Wilson, A. T cell fate specification and alphabeta/gammadelta lineage commitment. *Current Opinion in Immunology* **13**, 219-224 (2001).
315. Hernandez-Munain, C., Sleckman, B.P. & Krangel, M.S. A developmental switch from TCR delta enhancer to TCR alpha enhancer function during thymocyte maturation. *Immunity* **10**, 723-733 (1999).
316. Nemazee, D. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **18**, 19-51 (2000).
317. Casellas, R.*, et al.* Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* **291**, 1541-1544 (2001).
318. Petrie, H.T.*, et al.* Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J Exp Med* **178**, 615-622 (1993).
319. Ioannidis, V., Beermann, F., Clevers, H. & Held, W. The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nature immunology* **2**, 691-697 (2001).
320. Guo, J.*, et al.* Regulation of the TCRalpha repertoire by the survival window of CD4(+)CD8(+) thymocytes. *Nature immunology* **3**, 469-476 (2002).
321. Brandle, D., Muller, C., Rulicke, T., Hengartner, H. & Pircher, H. Engagement of the T-cell receptor during positive selection in the thymus down-regulates RAG-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9529-9533 (1992).
322. Hogquist, K.A.*, et al.* Identification of a naturally occurring ligand for thymic positive selection. *Immunity* **6**, 389-399 (1997).
323. Santori, F.R.*, et al.* Rare, structurally homologous self-peptides promote thymocyte positive selection. *Immunity* **17**, 131-142 (2002).

324. Sasada, T., Ghendler, Y., Neveu, J.M., Lane, W.S. & Reinherz, E.L. A naturally processed mitochondrial self-peptide in complex with thymic MHC molecules functions as a selecting ligand for a viral-specific T cell receptor. *J Exp Med* **194**, 883-892 (2001).
325. Nikolic-Zugic, J. & Bevan, M.J. Role of self-peptides in positively selecting the T-cell repertoire. *Nature* **344**, 65-67 (1990).
326. Stefanski, H.E., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A. Positive selection is limited by available peptide-dependent MHC conformations. *J Immunol* **164**, 3519-3526 (2000).
327. Ashton-Rickardt, P.G.*, et al.* Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* **76**, 651-663 (1994).
328. Sebzda, E.*, et al.* Mature T cell reactivity altered by peptide agonist that induces positive selection. *J Exp Med* **183**, 1093-1104 (1996).
329. Pircher, H., Burki, K., Lang, R., Hengartner, H. & Zinkernagel, R.M. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* **342**, 559-561 (1989).
330. Stockinger, B. T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms. *Adv Immunol* **71**, 229-265 (1999).
331. Sant'Angelo, D.B. & Janeway, C.A., Jr. Negative selection of thymocytes expressing the D10 TCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6931-6936 (2002).
332. Page, D.M., Roberts, E.M., Peschon, J.J. & Hedrick, S.M. TNF receptor-deficient mice reveal striking differences between several models of thymocyte negative selection. *J Immunol* **160**, 120-133 (1998).
333. Martin, S. & Bevan, M.J. Antigen-specific and nonspecific deletion of immature cortical thymocytes caused by antigen injection. *Eur J Immunol* **27**, 2726-2736 (1997).
334. Strasser, A., Harris, A.W., von Boehmer, H. & Cory, S. Positive and negative selection of T cells in T-cell receptor transgenic mice expressing a bcl-2 transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1376-1380 (1994).
335. Bouillet, P.*, et al.* BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* **415**, 922-926 (2002).
336. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365 (1997).
337. Punt, J.A., Osborne, B.A., Takahama, Y., Sharrow, S.O. & Singer, A. Negative selection of CD4+CD8+ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *J Exp Med* **179**, 709-713 (1994).
338. Wang, J.*, et al.* The critical role of LIGHT, a TNF family member, in T cell development. *J Immunol* **167**, 5099-5105 (2001).
339. Alberola-Ila, J., Forbush, K.A., Seger, R., Krebs, E.G. & Perlmutter, R.M. Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* **373**, 620-623 (1995).
340. Alberola-Ila, J., Hogquist, K.A., Swan, K.A., Bevan, M.J. & Perlmutter, R.M. Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med* **184**, 9-18 (1996).
341. Werlen, G., Hausmann, B. & Palmer, E. A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* **406**, 422-426 (2000).
342. Mariathasan, S.*, et al.* Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J Immunol* **167**, 4966-4973 (2001).
343. Madrenas, J.*, et al.* Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* **267**, 515-518 (1995).
344. Delgado, P., Fernandez, E., Dave, V., Kappes, D. & Alarcon, B. CD3delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection. *Nature* **406**, 426-430 (2000).
345. Haks, M.C.*, et al.* Contributions of the T cell receptor-associated CD3gamma-ITAM to thymocyte selection. *J Exp Med* **196**, 1-13 (2002).
346. Wong, P., Barton, G.M., Forbush, K.A. & Rudensky, A.Y. Dynamic tuning of T cell reactivity by self-peptide-major histocompatibility complex ligands. *J Exp Med* **193**, 1179-1187 (2001).
347. Dautigny, N. & Lucas, B. Developmental regulation of TCR efficiency. *Eur J Immunol* **30**, 2472-2478 (2000).

348. Lucas, B., Stefanova, I., Yasutomo, K., Dautigny, N. & Germain, R.N. Divergent changes in the sensitivity of maturing T cells to structurally related ligands underlies formation of a useful T cell repertoire. *Immunity* **10**, 367-376 (1999).
349. Moody, A.M.*, et al.* Developmentally regulated glycosylation of the CD8alphabeta coreceptor stalk modulates ligand binding. *Cell* **107**, 501-512 (2001).
350. Daniels, M.A.*, et al.* CD8 binding to MHC class I molecules is influenced by T cell maturation and glycosylation. *Immunity* **15**, 1051-1061 (2001).
351. Shahinian, A.*, et al.* Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* **261**, 609-612 (1993).
352. Tan, J.T., Whitmire, J.K., Ahmed, R., Pearson, T.C. & Larsen, C.P. 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J Immunol* **163**, 4859-4868 (1999).
353. Whitmire, J.K.*, et al.* CD40-CD40 ligand costimulation is required for generating antiviral CD4 T cell responses but is dispensable for CD8 T cell responses. *J Immunol* **163**, 3194-3201 (1999).
354. Kopf, M.*, et al.* OX40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL Responses after virus infection. *Immunity* **11**, 699-708 (1999).
355. Kundig, T.M.*, et al.* Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* **5**, 41-52 (1996).
356. Iezzi, G., Karjalainen, K. & Lanzavecchia, A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* **8**, 89-95 (1998).
357. Ahmed, R. & Gray, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* **272**, 54-60 (1996).
358. Busch, D.H., Pilip, I.M., Vijh, S. & Pamer, E.G. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* **8**, 353-362 (1998).
359. Hou, S., Hyland, L., Ryan, K.W., Portner, A. & Doherty, P.C. Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature* **369**, 652-654 (1994).
360. Murali-Krishna, K.*, et al.* Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* **8**, 177-187 (1998).
361. Whitmire, J.K., Asano, M.S., Murali-Krishna, K., Suresh, M. & Ahmed, R. Long-term CD4 Th1 and Th2 memory following acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Journal of Virology* **72**, 8281-8288 (1998).
362. Agarwal, S. & Rao, A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* **9**, 765-775 (1998).
363. Bachmann, M.F., Barner, M., Viola, A. & Kopf, M. Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *Eur J Immunol* **29**, 291-299 (1999).
364. Grayson, J.M., Murali-Krishna, K., Altman, J.D. & Ahmed, R. Gene expression in antigen-specific CD8+ T cells during viral infection. *J Immunol* **166**, 795-799 (2001).
365. Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A. & Rocha, B. Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nature immunology* **1**, 47-53 (2000).
366. Slifka, M.K., Rodriguez, F. & Whitton, J.L. Rapid on/off cycling of cytokine production by virus-specific CD8+ T cells. *Nature* **401**, 76-79 (1999).
367. Moser, B. & Loetscher, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature immunology* **2**, 123-128 (2001).
368. Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L. & Lefrancois, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* **291**, 2413-2417 (2001).
369. Reinhardt, R.L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T. & Jenkins, M.K. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* **410**, 101-105 (2001).
370. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712 (1999).
371. 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).
372. Homann, D., Teyton, L. & Oldstone, M.B. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nature medicine* **7**, 913-919 (2001).

373. Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D.F. & Sprent, J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* **8**, 591-599 (1998).
374. Ku, C.C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J. & Marrack, P. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* **288**, 675-678 (2000).
375. Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C. & Lefrancois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nature immunology* **1**, 426-432 (2000).
376. Arbones, M.L*., et al.* Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* **1**, 247-260 (1994).
377. Warnock, R.A., Askari, S., Butcher, E.C. & von Andrian, U.H. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* **187**, 205-216 (1998).
378. Campbell, J.J*., et al.* 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *J Cell Biol* **141**, 1053-1059 (1998).
379. Iezzi, G., Scheidegger, D. & Lanzavecchia, A. Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* **193**, 987-993 (2001).
380. Stemberger, C*., et al.* A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity* **27**, 985-997 (2007).
381. Jacob, J. & Baltimore, D. Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo. *Nature* **399**, 593-597 (1999).
382. Opferman, J.T., Ober, B.T. & Ashton-Rickardt, P.G. Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science* **283**, 1745-1748 (1999).
383. Hu, H*., et al.* CD4(+) T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division. *Nature immunology* **2**, 705-710 (2001).
384. Kaech, S.M. & Ahmed, R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nature immunology* **2**, 415-422 (2001).
385. Mercado, R*., et al.* Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol* **165**, 6833-6839 (2000).
386. Manjunath, N*., et al.* Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* **108**, 871-878 (2001).
387. Chang, J.T*., et al.* Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* **315**, 1687-1691 (2007).
388. Zajac, A.J*., et al.* Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* **188**, 2205-2213 (1998).
389. Appay, V*., et al.* HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* **192**, 63-75 (2000).
390. Kostense, S*., et al.* High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8(+) T cell expansions: evidence for impaired CTL effector function. *Eur J Immunol* **31**, 677-686 (2001).
391. Lechner, F*., et al.* Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* **191**, 1499-1512 (2000).
392. Surh, C.D. & Sprent, J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* **29**, 848-862 (2008).
393. Sprent, J., Cho, J.H., Boyman, O. & Surh, C.D. T cell homeostasis. *Immunol Cell Biol* **86**, 312-319 (2008).
394. Garbi, N., Hammerling, G.J., Probst, H.C. & van den Broek, M. Tonic T cell signalling and T cell tolerance as opposite effects of self-recognition on dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* **22**, 601-608 (2010).
395. von Freeden-Jeffry, U*., et al.* Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* **181**, 1519-1526 (1995).
396. Schluns, K.S. & Lefrancois, L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nature reviews. Immunology* **3**, 269-279 (2003).
397. Jacobs, S.R., Michalek, R.D. & Rathmell, J.C. IL-7 is essential for homeostatic control of T cell metabolism in vivo. *J Immunol* **184**, 3461-3469 (2010).
398. Fujikawa, K*., et al.* Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells. *J Exp Med* **198**, 1595-1608 (2003).

399. Cotta-de-Almeida, V., *et al.* Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15424-15429 (2007).
400. Roy, E., *et al.* Nck adaptors are positive regulators of the size and sensitivity of the T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15529-15534 (2010).
401. Wu, Z., *et al.* Memory T cell RNA rearrangement programmed by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hnRNPLL. *Immunity* **29**, 863-875 (2008).
402. Randall, K.L., *et al.* Dock8 mutations cripple B cell immunological synapses, germinal centers and long-lived antibody production. *Nature immunology* **10**, 1283-1291 (2009).
403. Takada, K. & Jameson, S.C. Self-class I MHC molecules support survival of naive CD8 T cells, but depress their functional sensitivity through regulation of CD8 expression levels. *J Exp Med* **206**, 2253-2269 (2009).
404. Labrecque, N., *et al.* How much TCR does a T cell need? *Immunity* **15**, 71-82 (2001).
405. Polic, B., Kunkel, D., Scheffold, A. & Rajewsky, K. How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8744-8749 (2001).
406. Tanchot, C., Lemonnier, F.A., Perarnau, B., Freitas, A.A. & Rocha, B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* **276**, 2057-2062 (1997).
407. Martin, B., Bourgeois, C., Dautigny, N. & Lucas, B. On the role of MHC class II molecules in the survival and lymphopenia-induced proliferation of peripheral CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6021-6026 (2003).
408. Starr, T.K., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 139-176 (2003).
409. Grossman, Z. & Singer, A. Tuning of activation thresholds explains flexibility in the selection and development of T cells in the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14747-14752 (1996).
410. Modiano, J.F., Johnson, L.D. & Bellgrau, D. Negative regulators in homeostasis of naive peripheral T cells. *Immunol Res* **41**, 137-153 (2008).
411. Ernst, B., Lee, D.S., Chang, J.M., Sprent, J. & Surh, C.D. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* **11**, 173-181 (1999).
412. Kieper, W.C., Burghardt, J.T. & Surh, C.D. A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J Immunol* **172**, 40-44 (2004).
413. Park, J.H., *et al.* 'Coreceptor tuning': cytokine signals transcriptionally tailor CD8 coreceptor expression to the self-specificity of the TCR. *Nature immunology* **8**, 1049-1059 (2007).
414. Berard, M., Brandt, K., Bulfone-Paus, S. & Tough, D.F. IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *J Immunol* **170**, 5018-5026 (2003).
415. Cho, J.H., *et al.* An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8+ cells driven by IL-2. *J Exp Med* **204**, 1787-1801 (2007).
416. Cho, J.H., Kim, H.O., Surh, C.D. & Sprent, J. T cell receptor-dependent regulation of lipid rafts controls naive CD8+ T cell homeostasis. *Immunity* **32**, 214-226 (2010).
417. Mueller, D.L., Seiffert, S., Fang, W. & Behrens, T.W. Differential regulation of bcl-2 and bcl-x by CD3, CD28, and the IL-2 receptor in cloned CD4+ helper T cells. A model for the long-term survival of memory cells. *J Immunol* **156**, 1764-1771 (1996).
418. Boise, L.H., *et al.* CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* **3**, 87-98 (1995).
419. Alderson, M.R., *et al.* Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* **181**, 71-77 (1995).
420. Mogil, R.J., *et al.* Fas (CD95) participates in peripheral T cell deletion and associated apoptosis in vivo. *International Immunology* **7**, 1451-1458 (1995).
421. Brunner, T., *et al.* Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* **373**, 441-444 (1995).
422. Sytwu, H.K., Liblau, R.S. & McDevitt, H.O. The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* **5**, 17-30 (1996).
423. Groghan, T.W., *et al.* Diminished expression of the T cell receptor on the expanded lymphocyte population in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Autoimmunity* **2**, 97-111 (1989).
424. Fisher, G.H., *et al.* Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935-946 (1995).

425. Irmler, M., *et al.* Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-195 (1997).
426. Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C.A., Tschopp, J. & Abbas, A.K. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* **8**, 615-623 (1998).
427. Ivanovska, I., Galonek, H.L., Hildeman, D.A. & Hardwick, J.M. Regulation of cell death in the lymphoid system by Bcl-2 family proteins. *Acta Haematol* **111**, 42-55 (2004).
428. Bouillet, P. & Strasser, A. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* **115**, 1567-1574 (2002).
429. Strasser, A., Harris, A.W. & Cory, S. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* **67**, 889-899 (1991).
430. Bouillet, P., *et al.* Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* **286**, 1735-1738 (1999).
431. Hildeman, D.A., *et al.* Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* **16**, 759-767 (2002).
432. Davey, G.M., *et al.* Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J Exp Med* **196**, 947-955 (2002).
433. Wei, M.C., *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-730 (2001).
434. Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M. & Strasser, A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Molecular Cell* **3**, 287-296 (1999).
435. Weant, A.E., *et al.* Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8+ T cell contraction. *Immunity* **28**, 218-230 (2008).
436. Hutcheson, J., *et al.* Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity* **28**, 206-217 (2008).
437. Hughes, P.D., *et al.* Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity* **28**, 197-205 (2008).
438. Green, D.R. Fas Bim boom! *Immunity* **28**, 141-143 (2008).
439. Gravestein, L.A., *et al.* The TNF receptor family member CD27 signals to Jun N-terminal kinase via Traf-2. *Eur J Immunol* **28**, 2208-2216 (1998).
440. Arch, R.H. & Thompson, C.B. 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 558-565 (1998).
441. Mitchell, T.C., *et al.* Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. *Nature immunology* **2**, 397-402 (2001).
442. Tough, D.F., Borrow, P. & Sprent, J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* **272**, 1947-1950 (1996).
443. Tan, J.T., *et al.* Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J Exp Med* **195**, 1523-1532 (2002).
444. Kennedy, M.K., *et al.* Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* **191**, 771-780 (2000).
445. Lodolce, J.P., *et al.* IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* **9**, 669-676 (1998).
446. Murali-Krishna, K. Persistence of Memory CD8 T Cells in MHC Class I-Deficient Mice. *Science* **286**, 1377-1381 (1999).
447. Boyman, O., Cho, J.H., Tan, J.T., Surh, C.D. & Sprent, J. A major histocompatibility complex class I-dependent subset of memory phenotype CD8+ cells. *J Exp Med* **203**, 1817-1825 (2006).
448. Selin, L.K., *et al.* Attrition of T cell memory: selective loss of LCMV epitope-specific memory CD8 T cells following infections with heterologous viruses. *Immunity* **11**, 733-742 (1999).
449. Freitas, A.A. & Rocha, B. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu Rev Immunol* **18**, 83-111 (2000).

450. Szabolcs, P., *et al.* Coexistent naive phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood. *Exp Hematol* **31**, 708-714 (2003).
451. Byrne, J.A., Stankovic, A.K. & Cooper, M.D. A novel subpopulation of primed T cells in the human fetus. *J Immunol* **152**, 3098-3106 (1994).
452. Dobber, R., Hertogh-Huijbregts, A., Rozing, J., Bottomly, K. & Nagelkerken, L. The involvement of the intestinal microflora in the expansion of CD4+ T cells with a naive phenotype in the periphery. *Dev Immunol* **2**, 141-150 (1992).
453. Vos, Q., Jones, L.A. & Kruisbeek, A.M. Mice deprived of exogenous antigenic stimulation develop a normal repertoire of functional T cells. *J Immunol* **149**, 1204-1210 (1992).
454. Huang, T., Wei, B., Velazquez, P., Borneman, J. & Braun, J. Commensal microbiota alter the abundance and TCR responsiveness of splenic naive CD4+ T lymphocytes. *Clinical Immunology* **117**, 221-230 (2005).
455. Takada, K. & Jameson, S.C. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nature reviews. Immunology* **9**, 823-832 (2009).
456. Napolitano, L.A., *et al.* Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nature medicine* **7**, 73-79 (2001).
457. Guimond, M., *et al.* Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nature immunology* **10**, 149-157 (2009).
458. Surh, C.D., Boyman, O., Purton, J.F. & Sprent, J. Homeostasis of memory T cells. *Immunol Rev* **211**, 154-163 (2006).
459. Obar, J.J., Khanna, K.M. & Lefrancois, L. Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* **28**, 859-869 (2008).
460. Haluszczak, C., *et al.* The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *J Exp Med* **206**, 435-448 (2009).
461. Moon, J.J., *et al.* Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* **27**, 203-213 (2007).
462. Maroof, A., Beattie, L., Kirby, A., Coles, M. & Kaye, P.M. Dendritic cells matured by inflammation induce CD86-dependent priming of naive CD8+ T cells in the absence of their cognate peptide antigen. *J Immunol* **183**, 7095-7103 (2009).
463. Probst, H.C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T. & van den Broek, M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nature immunology* **6**, 280-286 (2005).
464. Makino, Y., Kanno, R., Ito, T., Higashino, K. & Taniguchi, M. Predominant expression of invariant V alpha 14+ TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations. *International Immunology* **7**, 1157-1161 (1995).
465. Budd, R.C., *et al.* Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes. *J Exp Med* **166**, 577-582 (1987).
466. Fowlkes, B.J., *et al.* A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* **329**, 251-254 (1987).
467. Ceredig, R., Lynch, F. & Newman, P. Phenotypic properties, interleukin 2 production, and developmental origin of a "mature" subpopulation of Lyt-2- L3T4- mouse thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8578-8582 (1987).
468. Lee, H., *et al.* The presence of CD8+ invariant NKT cells in mice. *Exp Mol Med* **41**, 866-872 (2009).
469. Ohteki, T. & MacDonald, H.R. Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice. *J Exp Med* **180**, 699-704 (1994).
470. Bix, M., Coles, M. & Raulet, D. Positive selection of V beta 8+ CD4-8- thymocytes by class I molecules expressed by hematopoietic cells. *J Exp Med* **178**, 901-908 (1993).
471. Bendelac, A., Killeen, N., Littman, D.R. & Schwartz, R.H. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* **263**, 1774-1778 (1994).
472. Bendelac, A., *et al.* CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* **268**, 863-865 (1995).

473. Lantz, O. & Bendelac, A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med* **180**, 1097-1106 (1994).
474. Beckman, E.M.*, et al.* Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature* **372**, 691-694 (1994).
475. Kawano, T.*, et al.* CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* **278**, 1626-1629 (1997).
476. Coles, M.C. & Raulet, D.H. NK1.1+ T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4+CD8+ cells. *J Immunol* **164**, 2412-2418 (2000).
477. Bendelac, A. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med* **182**, 2091-2096 (1995).
478. Dellabona, P., Padovan, E., Casorati, G., Brockhaus, M. & Lanzavecchia, A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med* **180**, 1171-1176 (1994).
479. Porcelli, S., Yockey, C.E., Brenner, M.B. & Balk, S.P. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med* **178**, 1-16 (1993).
480. Gombert, J.M.*, et al.* Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur J Immunol* **26**, 2989-2998 (1996).
481. Joyce, S.*, et al.* Expansion of natural (NK1+) T cells that express alpha beta T cell receptors in transporters associated with antigen presentation-1 null and thymus leukemia antigen positive mice. *J Exp Med* **184**, 1579-1584 (1996).
482. Bix, M. & Locksley, R.M. Natural T cells. Cells that co-express NKRP-1 and TCR. *J Immunol* **155**, 1020-1022 (1995).
483. Sato, N.*, et al.* Functional characterization of NK1.1 + Ly-6C+ cells. *Immunol Lett* **54**, 5-9 (1996).
484. Smyth, M.J.*, et al.* NKT cells - conductors of tumor immunity? *Current Opinion in Immunology* **14**, 165-171 (2002).
485. Oh, S.J., Kim, J.H., Min, C.K. & Chung, D.H. Role of type II NKT cells in the suppression of graft-versus-host disease. *Crit Rev Immunol* **28**, 249-267 (2008).
486. Terabe, M. & Berzofsky, J.A. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res* **101**, 277-348 (2008).
487. Bezbradica, J.S., Hill, T., Stanic, A.K., Van Kaer, L. & Joyce, S. Commitment toward the natural T (iNKT) cell lineage occurs at the CD4+8+ stage of thymic ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5114-5119 (2005).
488. Benlagha, K., Wei, D.G., Veiga, J., Teyton, L. & Bendelac, A. Characterization of the early stages of thymic NKT cell development. *J Exp Med* **202**, 485-492 (2005).
489. Gapin, L., Matsuda, J.L., Surh, C.D. & Kronenberg, M. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nature immunology* **2**, 971-978 (2001).
490. Zhou, D.*, et al.* Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* **306**, 1786-1789 (2004).
491. Schwartzberg, P.L., Mueller, K.L., Qi, H. & Cannons, J.L. SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nature reviews. Immunology* **9**, 39-46 (2009).
492. Nichols, K.E.*, et al.* Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nature medicine* **11**, 340-345 (2005).
493. Pasquier, B.*, et al.* Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med* **201**, 695-701 (2005).
494. Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L. & Bendelac, A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* **296**, 553-555 (2002).
495. Mycko, M.P.*, et al.* Selective requirement for c-Myc at an early stage of V(alpha)14i NKT cell development. *J Immunol* **182**, 4641-4648 (2009).
496. Berzins, S.P., McNab, F.W., Jones, C.M., Smyth, M.J. & Godfrey, D.I. Long-term retention of mature NK1.1+ NKT cells in the thymus. *J Immunol* **176**, 4059-4065 (2006).

497. D'Cruz, L.M., Knell, J., Fujimoto, J.K. & Goldrath, A.W. An essential role for the transcription factor HEB in thymocyte survival, Tcra rearrangement and the development of natural killer T cells. *Nature immunology* **11**, 240-249 (2010).
498. D'Cruz, L.M., Yang, C.Y. & Goldrath, A.W. Transcriptional regulation of NKT cell development and homeostasis. *Current Opinion in Immunology* **22**, 199-205 (2010).
499. Kim, P.J*., et al.* GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells. *J Immunol* **177**, 6650-6659 (2006).
500. Townsend, M.J*., et al.* T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* **20**, 477-494 (2004).
501. Savage, A.K*., et al.* The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* **29**, 391-403 (2008).
502. Castillo, E.F., Acero, L.F., Stonier, S.W., Zhou, D. & Schluns, K.S. Thymic and peripheral microenvironments differentially mediate development and maturation of iNKT cells by IL-15 transpresentation. *Blood* **116**, 2494-2503 (2010).
503. Ohteki, T., Ho, S., Suzuki, H., Mak, T.W. & Ohashi, P.S. Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development. *J Immunol* **159**, 5931-5935 (1997).
504. Matsuda, J.L*., et al.* Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nature immunology* **3**, 966-974 (2002).
505. McNab, F.W*., et al.* The influence of CD1d in postselection NKT cell maturation and homeostasis. *J Immunol* **175**, 3762-3768 (2005).
506. McNab, F.W*., et al.* Peripheral NK1.1 NKT cells are mature and functionally distinct from their thymic counterparts. *J Immunol* **179**, 6630-6637 (2007).
507. Hammond, K.J*., et al.* CD1d-restricted NKT cells: an interstrain comparison. *J Immunol* **167**, 1164-1173 (2001).
508. Eberl, G*., et al.* Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J Immunol* **162**, 6410-6419 (1999).
509. Hammond, K.J*., et al.* NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur J Immunol* **29**, 3768-3781 (1999).
510. Terabe, M*., et al.* NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nature immunology* **1**, 515-520 (2000).
511. Gumperz, J.E., Miyake, S., Yamamura, T. & Brenner, M.B. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* **195**, 625-636 (2002).
512. Godfrey, D.I., Stankovic, S. & Baxter, A.G. Raising the NKT cell family. *Nature immunology* **11**, 197-206 (2010).
513. Brigl, M. & Brenner, M.B. How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens. *Seminars in Immunology* **22**, 79-86 (2010).
514. Sada-Ovalle, I., Chiba, A., Gonzales, A., Brenner, M.B. & Behar, S.M. Innate invariant NKT cells recognize Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria. *PLoS pathogens* **4**, e1000239 (2008).
515. Mattner, J*., et al.* Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* **434**, 525-529 (2005).
516. Darmoise, A*., et al.* Lysosomal alpha-galactosidase controls the generation of self lipid antigens for natural killer T cells. *Immunity* **33**, 216-228 (2010).
517. Coquet, J.M*., et al.* Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11287-11292 (2008).
518. Lee, P.T., Benlagha, K., Teyton, L. & Bendelac, A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med* **195**, 637-641 (2002).
519. Sullivan, B.A*., et al.* Mechanisms for glycolipid antigen-driven cytokine polarization by Valpha14i NKT cells. *J Immunol* **184**, 141-153 (2010).
520. Crowe, N.Y*., et al.* Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells. *J Immunol* **171**, 4020-4027 (2003).

521. Wilson, M.T., *et al.* The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10913-10918 (2003).
522. Park, S.H., Kyin, T., Bendelac, A. & Carnaud, C. The contribution of NKT cells, NK cells, and other gamma-chain-dependent non-T non-B cells to IL-12-mediated rejection of tumors. *J Immunol* **170**, 1197-1201 (2003).
523. Behar, S.M., Podrebarac, T.A., Roy, C.J., Wang, C.R. & Brenner, M.B. Diverse TCRs recognize murine CD1. *J Immunol* **162**, 161-167 (1999).
524. Chiu, Y.H., *et al.* Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments. *J Exp Med* **189**, 103-110 (1999).
525. Cardell, S., *et al.* CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J Exp Med* **182**, 993-1004 (1995).
526. Park, S.H., *et al.* The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families. *J Exp Med* **193**, 893-904 (2001).
527. Skold, M., Faizunnessa, N.N., Wang, C.R. & Cardell, S. CD1d-specific NK1.1+ T cells with a transgenic variant TCR. *J Immunol* **165**, 168-174 (2000).
528. Huber, S., Sartini, D. & Exley, M. Role of CD1d in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Immunol* **170**, 3147-3153 (2003).
529. Gadola, S.D., Dulphy, N., Salio, M. & Cerundolo, V. Valpha24-JalphaQ-independent, CD1d-restricted recognition of alpha-galactosylceramide by human CD4(+) and CD8alphabeta(+) T lymphocytes. *J Immunol* **168**, 5514-5520 (2002).
530. Exley, M.A., *et al.* A major fraction of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can suppress mixed lymphocyte responses. *J Immunol* **167**, 5531-5534 (2001).
531. Girardi, E., *et al.* Type II natural killer T cells use features of both innate-like and conventional T cells to recognize sulfatide self antigens. *Nature immunology* **13**, 851-856 (2012).
532. Patel, O., *et al.* Recognition of CD1d-sulfatide mediated by a type II natural killer T cell antigen receptor. *Nature immunology* **13**, 857-863 (2012).
533. Heiken, H., Schulz, R.J., Ravetch, J.V., Reinherz, E.L. & Koyasu, S. T lymphocyte development in the absence of Fc epsilon receptor I gamma subunit: analysis of thymic-dependent and independent alpha beta and gamma delta pathways. *Eur J Immunol* **26**, 1935-1943 (1996).
534. Legendre, V., *et al.* Selection of phenotypically distinct NK1.1+ T cells upon antigen expression in the thymus or in the liver. *Eur J Immunol* **29**, 2330-2343 (1999).
535. Iwabuchi, C., *et al.* Intrathymic selection of NK1.1(+)alpha/beta T cell antigen receptor (TCR)+ cells in transgenic mice bearing TCR specific for chicken ovalbumin and restricted to I-Ad. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8199-8204 (1998).
536. Slifka, M.K., Pagarigan, R.R. & Whitton, J.L. NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8+ and CD4+ T cells. *J Immunol* **164**, 2009-2015 (2000).
537. Kim, C.H., Johnston, B. & Butcher, E.C. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* **100**, 11-16 (2002).
538. Treiner, E., *et al.* Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* **422**, 164-169 (2003).
539. Carding, S.R. & Egan, P.J. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nature reviews. Immunology* **2**, 336-345 (2002).
540. Godfrey, D.I., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J. & Van Kaer, L. NKT cells: what's in a name? *Nature reviews. Immunology* **4**, 231-237 (2004).
541. Tatemichi, M., *et al.* Suppression of thymic lymphomas and increased nonthymic lymphomagenesis in Trp53-deficient mice lacking inducible nitric oxide synthase gene. *Int. J. Cancer* **111**, 819-828 (2004).
542. Lukacs-Kornek, V., *et al.* Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nature immunology* **12**, 1096-1104 (2011).
543. Donehower, L.A. The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies. *Semin. Cancer Biol.* **7**, 269-278 (1996).

544. Donehower, L.A., *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215-221 (1992).
545. French, J.E., *et al.* Loss of heterozygosity frequency at the Trp53 locus in p53-deficient (+/-) mouse tumors is carcinogen-and tissue-dependent. *Carcinogenesis* **22**, 99-106 (2001).
546. Harvey, M., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Bradley, A. & Donehower, L.A. Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *FASEB J.* **7**, 938-943 (1993).
547. Harvey, M., *et al.* Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat Genet* **5**, 225-229 (1993).
548. Jacks, T., *et al.* Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* **4**, 1-7 (1994).
549. Liao, M.J., *et al.* No requirement for V(D)J recombination in p53-deficient thymic lymphoma. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 3495-3501 (1998).
550. Min, J.-N., Huang, L., Zimonjic, D.B., Moskophidis, D. & Mivechi, N.F. Selective suppression of lymphomas by functional loss of Hsf1 in a p53-deficient mouse model for spontaneous tumors. *Oncogene* **26**, 5086-5097 (2007).
551. Bertout, J.A., *et al.* Heterozygosity for hypoxia inducible factor 1alpha decreases the incidence of thymic lymphomas in a p53 mutant mouse model. *Cancer Research* **69**, 3213-3220 (2009).
552. Deriano, L., *et al.* The RAG2 C terminus suppresses genomic instability and lymphomagenesis. *Nature* **471**, 119-123 (2011).
553. Kitamura, A., *et al.* Primary lymphoma arising in the nasal cavity among Japanese. *Histopathology* **47**, 523-532 (2005).
554. Jeon, Y.K., *et al.* Expression of the promyelocytic leukemia zinc-finger in T-lymphoblastic lymphoma and leukemia has strong implications for their cellular origin and greater association with initial bone marrow involvement. *Mod Pathol* **25**, 1236-1245 (2012).
555. Kreslavsky, T., *et al.* TCR-inducible PLZF transcription factor required for innate phenotype of a subset of gammadelta T cells with restricted TCR diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12453-12458 (2009).
556. Pomerantz, R.G., Mirvish, E.D., Erdos, G., Falo, L.D., Jr. & Geskin, L.J. Novel approach to gene expression profiling in Sezary syndrome. *Br J Dermatol* **163**, 1090-1094 (2010).
557. Lamprecht, B., *et al.* The tumour suppressor p53 is frequently nonfunctional in Sezary syndrome. *Br J Dermatol* **167**, 240-246 (2012).
558. Brito-Babapulle, V., *et al.* p53 allele deletion and protein accumulation occurs in the absence of p53 gene mutation in T-prolymphocytic leukaemia and Sezary syndrome. *Br. J. Haematol.* **110**, 180-187 (2000).
559. Qin, J.Z., *et al.* Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myb genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood* **98**, 2778-2783 (2001).
560. Yu, J., *et al.* NKp46 identifies an NKT cell subset susceptible to leukemic transformation in mouse and human. *J Clin Invest* **121**, 1456-1470 (2011).
561. Kinjo, Y., *et al.* Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nature immunology* **12**, 966-974 (2011).
562. Kinjo, Y., *et al.* Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nature immunology* **7**, 978-986 (2006).
563. Doebbeling, U. A mouse model for the Sezary syndrome. *J Exp Clin Cancer Res* **29**, 11 (2010).
564. van der Fits, L., *et al.* A novel mouse model for Sezary Syndrome using xenotransplantation of Sezary cells into immunodeficient RAG2(-/-) gammac(-/-) mice. *Exp Dermatol* **21**, 706-709 (2012).
565. Wang, J., *et al.* Cutting edge: CD28 engagement releases antigen-activated invariant NKT cells from the inhibitory effects of PD-1. *J Immunol* **182**, 6644-6647 (2009).
566. Klemke, C.D., *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 Research* **69**, 4175-4183 (2009).
567. Nebozhyn, M., *et al.* Quantitative PCR on 5 genes reliably identifies CTCL patients with 5% to 99% circulating tumor cells with 90% accuracy. *Blood* **107**, 3189-3196 (2006).
568. Vasmatzis, G., *et al.* Genome-wide analysis reveals recurrent structural abnormalities of TP63 and other p53-related genes in peripheral T-cell lymphomas. *Blood* (2012).

569. Boehme, S.A. & Lenardo, M.J. TCR-mediated death of mature T lymphocytes occurs in the absence of p53. *J Immunol* **156**, 4075-4078 (1996).
570. Grayson, J.M., Lanier, J.G., Altman, J.D. & Ahmed, R. The role of p53 in regulating antiviral T cell responses. *J. Immunol.* **167**, 1333-1337 (2001).
571. Xu-Monette, Z.Y.*, et al.* Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood* (2012).
572. Petit, B.*, et al.* Expression of p53 protein in T- and natural killer-cell lymphomas is associated with some clinicopathologic entities but rarely related to p53 mutations. *Human Pathology* **32**, 196-204 (2001).
573. Matsushima, A.Y., Cesarman, E., Chadburn, A. & Knowles, D.M. Post-thymic T cell lymphomas frequently overexpress p53 protein but infrequently exhibit p53 gene mutations. *AJPA* **144**, 573-584 (1994).
574. Renno, T., Hahne, M., Tschopp, J. & MacDonald, H.R. Peripheral T cells undergoing superantigen-induced apoptosis in vivo express B220 and upregulate Fas and Fas ligand. *J Exp Med* **183**, 431-437 (1996).
575. Renno, T.*, et al.* Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Eur. J. Immunol.* **28**, 540-547 (1998).
576. Parekh, V.V.*, et al.* Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. *J Clin Invest* **115**, 2572-2583 (2005).
577. Sullivan, B.A. & Kronenberg, M. Activation or anergy: NKT cells are stunned by alpha-galactosylceramide. *J Clin Invest* **115**, 2328-2329 (2005).
578. Matsuda, J.L.*, et al.* Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8395-8400 (2003).
579. Pellicci, D.G.*, et al.* DX5/CD49b-positive T cells are not synonymous with CD1d-dependent NKT cells. *J Immunol* **175**, 4416-4425 (2005).
580. Komarova, E.A.*, et al.* p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. *Faseb J* **19**, 1030-1032 (2005).
581. Slatter, T.L.*, et al.* Hyperproliferation, cancer, and inflammation in mice expressing a Δ133p53-like isoform. *Blood* **117**, 5166-5177 (2011).
582. De Giovanni, C.*, et al.* Wild-type p53-mediated down-modulation of interleukin 15 and interleukin 15 receptors in human rhabdomyosarcoma cells. *British Journal of Cancer* **78**, 1541-1546 (1998).
583. Fehniger, T.A.*, et al.* Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* **193**, 219-231 (2001).
584. Sato, N.*, et al.* Development of an IL-15-autocrine CD8 T-cell leukemia in IL-15-transgenic mice requires the cis expression of IL-15R *Blood* **117**, 4032-4040 (2011).
585. Tarapore, P. & Fukasawa, K. Loss of p53 and centrosome hyperamplification. *Oncogene* **21**, 6234-6240 (2002).
586. Martinez-Delgado, B.*, et al.* Correlation between mutations in p53 gene and protein expression in human lymphomas. *Am. J. Hematol.* **55**, 1-8 (1997).
587. Kim, S.B.*, et al.* Activated Notch1 interacts with p53 to inhibit its phosphorylation and transactivation. *Cell Death Differ.* **14**, 982-991 (2007).
588. Cejkova, P.*, et al.* Amplification of NOTCH1 and ABL1 gene loci is a frequent aberration in enteropathy-type T-cell lymphoma. *Virchows Arch.* **446**, 416-420 (2005).
589. van der Fits, L.*, et al.* NOTCH1 Signaling as a Therapeutic Target in Sezary Syndrome. *J Invest Dermatol* (2012).
590. Kamstrup, M.R.*, et al.* Notch1 as a potential therapeutic target in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* **116**, 2504-2512 (2010).
591. Beverly, L.J. Suppression of p53 by Notch in Lymphomagenesis: Implications for Initiation and Regression. *Cancer Research* **65**, 7159-7168 (2005).
592. Okazaki, I.m.*, et al.* Constitutive Expression of AID Leads to Tumorigenesis. *Journal of Experimental Medicine* **197**, 1173-1181 (2003).
593. Kotani, A.*, et al.* A target selection of somatic hypermutations is regulated similarly between T and B cells upon activation-induced cytidine deaminase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 4506-4511 (2005).

594. Komeno, Y., *et al.* AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. *Leukemia* **24**, 1018-1024 (2010).
595. Qin, H., *et al.* Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in CD4+ T Cells is Associated with a Unique IL-10-Producing Subset that Increases with Age. *PLoS ONE* **6**, e29141 (2011).
596. Wirth, T.C., *et al.* Repetitive Antigen Stimulation Induces Stepwise Transcriptome Diversification but Preserves a Core Signature of Memory CD8+ T Cell Differentiation. *Immunity* **33**, 128-140 (2010).
597. Chang, W.S., *et al.* Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. *J Immunol* **181**, 6707-6710 (2008).
598. Uldrich, A.P., *et al.* NKT cell stimulation with glycolipid antigen in vivo: costimulation-dependent expansion, Bim-dependent contraction, and hyporesponsiveness to further antigenic challenge. *J Immunol* **175**, 3092-3101 (2005).
599. Sidobre, S., *et al.* The V alpha 14 NKT cell TCR exhibits high-affinity binding to a glycolipid/CD1d complex. *J Immunol* **169**, 1340-1348 (2002).
600. Cantu, C., 3rd, Benlagha, K., Savage, P.B., Bendelac, A. & Teyton, L. The paradox of immune molecular recognition of alpha-galactosylceramide: low affinity, low specificity for CD1d, high affinity for alpha beta TCRs. *J Immunol* **170**, 4673-4682 (2003).
601. Brigl, M., Bry, L., Kent, S.C., Gumperz, J.E. & Brenner, M.B. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nature immunology* **4**, 1230-1237 (2003).
602. Mallevaey, T., *et al.* Activation of invariant NKT cells by the helminth parasite schistosoma mansoni. *J Immunol* **176**, 2476-2485 (2006).
603. Huang, Y., *et al.* Mucosal memory CD8(+) T cells are selected in the periphery by an MHC class I molecule. *Nature immunology* **12**, 1086-1095 (2011).
604. Hayday, A., Theodoridis, E., Ramsburg, E. & Shires, J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nature immunology* **2**, 997-1003 (2001).
605. Fabris, A., *et al.* HLA-G 14 bp deletion/insertion polymorphism in celiac disease. *Am J Gastroenterol* **106**, 139-144 (2011).
606. Koskela, H.L., *et al.* Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **366**, 1905-1913 (2012).
607. Jerez, A., *et al.* STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood* (2012).
608. Niu, G., *et al.* Role of Stat3 in Regulating p53 Expression and Function. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 7432-7440 (2005).