

Université de Montréal

Découverte de cellules souches potentielles de l'épithélium thymique

par

Maude Dumont-Lagacé

**Programmes de Biologie Moléculaire,
Faculté de Médecine**

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître es Science (M.Sc.)
en Biologie Moléculaire, option générale

Mai 2014

© Maude Dumont-Lagacé, 2014

Résumé

Le thymus subit un vieillissement précoce, appelé involution thymique, qui cause une perte de fonction du thymus avec l'âge. À ce jour, les mécanismes de renouvellement des cellules épithéliales thymiques (TECs) sont encore mal compris, c'est pourquoi nous avons voulu identifier les cellules souches de l'épithélium thymique. Comme les cellules souches sont quiescentes dans plusieurs tissus, les objectifs de notre étude étaient de déterminer si l'épithélium thymique contenait des cellules quiescentes et d'étudier la cinétique de prolifération des TECs chez les souris jeunes et adultes. Pour ce faire, nous avons utilisé une souris transgénique (H2B-GFP Tet-On) nous permettant d'identifier les cellules ne se divisant pas sur une longue période de temps (LRC, *label-retaining cells*). Nous avons d'abord montré que les TECs proliféraient plus rapidement chez les femelles que les mâles. De plus, nous avons trouvé plusieurs différences entre l'épithélium thymique post-natal et adulte : (1) les TECs corticales (cTECs) et médullaires (mTECs) ont un taux de prolifération similaire chez les jeunes souris, mais chez l'adulte, les cTECs prolifèrent plus lentement que les mTECs; (2) les TECs prolifèrent plus rapidement chez les souris jeunes que adultes; (3) des LRC sont détectées chez l'adulte, mais pas chez les jeunes souris. Les LRC, retrouvées dans le compartiment cTEC, sous-expriment des gènes associés à la sénescence et surexpriment des gènes importants pour le développement et le renouvellement des TECs. Ces résultats montrent que ces cellules sont quiescentes et suggèrent qu'elles pourraient bel et bien être les progéniteurs thymiques responsables du renouvellement des TECs adultes.

Mots-clés : Cellules épithéliales thymiques, involution, cellules souches, *label-retaining assay*, développement thymique.

Abstract

The thymus undergoes a rapid degeneration with age termed thymic involution that causes a loss of function of the thymus with age. To this day, mechanisms of thymic maintenance are still unknown. This is why we aimed to identify thymic epithelial stem cells. Since stem cells are quiescent in many tissues in adults, our main objectives were to determine whether the thymic epithelium contains quiescent cells and study the proliferation kinetics of thymic epithelial cells in neonatal and adult mice. To this end, we used the transgenic mouse model H2B-GFP Tet-On, a label-retaining assay allowing us to identify cells that have not divided for a prolonged period of time, which are called label-retaining cells (LRC). First, we showed that in the adult thymus, females' thymic epithelial cells (TECs) proliferated more actively than males' TECs. We observed three main differences between neonatal and adult thymi: (1) cTECs and mTECs have similar proliferation rates in young, but mTECs cycled more actively in adult mice; (2) neonatal TECs have a higher turnover rate than adult's TECs, and (3) we were able to detect LRC in adult mice, but not in neonatal mice. These LRC are contained in the cTEC compartment and express very low levels of senescence-associated proteins and show a high expression of genes important for thymic development and. These results show that the LRC identified in adult thymi are not senescent cells and therefore might represent the elusive thymic progenitor cells responsible for thymic maintenance and regeneration in adult mice.

Keywords: Thymic epithelial cells, thymic involution, stem cells, label-retaining assay, development.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xi
Introduction.....	1
1.1 Introduction générale.....	1
1.2 Fonctions et propriétés du thymus.....	2
1.2.1 Rôles du thymus et des TECs.....	2
1.2.2 L'épithélium thymique : des populations cellulaires hétérogènes.....	3
1.3 Développement et cellules souches du thymus.....	4
1.3.1 Organogenèse et morphogenèse du thymus.....	4
1.3.2 Modèles actuels des voies de différenciation des TECs.....	6
1.3.3 L'épithélium thymique adulte : renouvellement et régénération.....	8
1.3.4 Cellules souches : ce que nous apprennent les autres tissus.....	10
1.3.5 Modèles d'étude des cellules souches.....	11
2. Projet de recherche.....	14
2.1 Principes.....	14
2.2 Hypothèse.....	14
2.3 Objectifs.....	15
3. Manuscrit.....	16
3.1 Déclaration de l'étudiant concernant l'article.....	16
3.2 Adult thymic epithelium contains nonsenescent label-retaining cells.....	17
Abstract.....	18
Background.....	19
Materials and methods.....	21

Results.....	23
Discussion.....	35
Acknowledgement.....	37
Footnotes.....	37
References.....	38
4. Discussion.....	44
4.1 La force de l'âge : ce qui diffère entre jeunes et adultes.	44
4.2 Les LRC sont-elles des cellules souches ?.....	46
4.3 Dimorphisme sexuel des TECs.....	48
5. Conclusion et perspectives.....	50
Bibliographie.....	51
Figures supplémentaires.....	i

Liste des tableaux

Manuscrit

Table I – Turnover of TECs in young and adult mice.....	26
---	----

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Régions corticale et médullaire du thymus montrées par une coloration à l'hématoxyline et éosine	3
Figure 2. Développement embryonnaire du thymus et de la parathyroïde chez la souris	5
Figure 3. Modèles actuels des voies de différenciation des TECs	7
Figure 4. Modèle de souris transgénique H2B-GFP Tet-On.....	13

Manuscrit

Figure 1. Population dynamics of cTECs and mTECs in neonatal mice.....	25
Figure 2. Neonatal TECs contain no LRC.....	27
Figure 3. Turnover of TEC subsets in adult female mice.....	29
Figure 4. Turnover of TEC subsets in adult male mice.....	30
Figure 5. Cell size and gene expression profile of LRC.....	33
Figure 6. The clearance rate of GFP ^{hi} TECs is more rapid in young than in adult mice.....	34

Figures supplémentaires

Figure S1. Stratégies d'identification des TECs.....	60
Figure S2 : Stratégies de tri des LRC.....	61
Figure S3 : Diminution des cTECs à deux et trois semaines d'âge.....	62
Figure S4 : Les mTECs matures (MHC-II ^{hi}) prolifèrent plus rapidement que les mTECs immatures chez les souris femelles adultes.....	63

Liste des abréviations

7-AAD: 7-aminoactinomycine D

ADNc: ADN complémentaire

Aire : *Autoimmune Regulator*

BMP4 : *bone morphogenic protein 4*

BrdU : 5-bromo-2-désoxyuridine

cTECs: *cortical thymic epithelial cells*

cTEPC: *cortical thymic epithelial progenitor cell*

DLL4: *delta-like ligand 4*

EpCAM: *Epithelial cell adhesion molecule*

FGF8: *fibroblast growth factor 8*

FOXP1: *forkhead box N1*

Gcm2: *glial cell missing homolog 2*

GFP: *green fluorescent protein*

H2B-GFP: *histone H2B-GFP fusion protein*

HSCs: *hematopoietic stem cells*

IL-7: *interleukin 7*

K5: cytokératine 5 (Krt5)

K8: cytokératine 8 (Krt8)

LRC: *label-retaining cells*

Ly51: *glutamyl aminopeptidase*, aussi ENPEP

MHC: *major histocompatibility complex* (type I: MHC-I, type II: MHC-II)

mTECs: *medullary thymic epithelial cells*

mTEPC: *medullary thymic epithelial progenitor cell*

PRSS16: *protease serine 16*

PSMB11: *proteasome (posome, macropain) subunit, beta type, 11*, aussi connue comme $\beta 5t$

qPCR: *quantitative RT-PCR*

RTOC: *reaggregate thymic organ culture*

rtTA: *reverse tetracycline-controlled transactivator*

SHH: *sonic hedgehog*

TCR: T cell receptor

TECs: thymic epithelial cells

TEPC: thymic epithelial progenitor cells

Tregs: lymphocytes T régulateurs

UEA1: *Ulex Europaeus Agglutinin-1*

VIH: virus d'immunodéficience humain

WNT4: *Wingless-int 4*

WNT5B: *Wingless-int 5B*

*À mes parents, qui ont su allumer la flamme de
la science en moi.*

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier Claude Perreault pour m'avoir accueillie dans son laboratoire depuis maintenant deux ans, pour sa patience, ses conseils avisés et sa grande ouverture d'esprit. Nos discussions sont toujours une source d'inspiration pour moi.

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire pour leurs conseils et leur support au quotidien. La recherche étant semée d'embûches et de défis, leurs compétences et leur empathie m'ont aidée à surmonter les obstacles et à garder ma motivation au cours de ma maîtrise. Je remercie également Juan Ruiz Vanegas et Sylvie Brochu pour m'avoir supervisée lors de mes stages dans le laboratoire.

Un merci tout spécial à Céline Laumont et Assya Trofimov, qui ont passé de nombreux moments en ma compagnie, que ce soit au laboratoire ou ailleurs. Nous avons partagé ensemble nos victoires et nos défaites.

Enfin, je voudrais remercier Isabelle Caron pour son assistance dans la gestion des souris ainsi que le personnel de l'animalerie, Danièle Gagné et Gaël Dulude pour m'avoir enseigné la cytométrie de flux et pour leurs nombreux conseils au cours de mes expériences, Nadine Fradet et Jennifer Huber pour la réalisation des expériences de RT-PCR et finalement Sébastien Lemieux pour ses conseils sur les analyses statistiques.

Introduction

1.1 Introduction générale

Le plus important attribut du système immunitaire adaptatif est sa capacité à distinguer le soi du non-soi. Cette caractéristique nécessite une rigoureuse sélection des lymphocytes pendant leur maturation afin qu'ils ne réagissent pas contre des antigènes provenant de l'individu (le soi), tout en conservant la capacité de reconnaître une grande diversité d'antigènes étrangers (non-soi). Les lymphocytes T jouent un rôle clé dans le système immunitaire adaptatif, tant pour la régulation des réponses immunitaires que l'élimination des cellules infectées (1).

Le thymus est le seul organe lymphoïde primaire capable de supporter la maturation et la sélection des lymphocytes T tolérants au soi. Ce processus est principalement régulé par les cellules épithéliales thymiques (TECs, *thymic epithelial cells*), constituant principal du stroma thymique (2–4). Le thymus subit toutefois un vieillissement précoce, appelé involution thymique, qui entraîne une perte de fonction progressive avec l'âge (5). Cette involution est causée entre autres par une détérioration du stroma thymique, caractérisée par une diminution du nombre de TECs et une désorganisation de l'architecture de l'épithélium thymique (6). L'atrophie thymique a normalement peu de conséquences grâce à l'établissement d'une mémoire immunitaire périphérique, mais mènera éventuellement à une plus grande susceptibilité aux infections et aux cancers (7, 8). En outre, cette perte de fonction s'avère particulièrement problématique lors d'atteintes au système immunitaire périphérique, par exemple lors de chimiothérapie, d'exposition aux radiations ou encore lors d'infection par le virus d'immunodéficience humain (VIH), puisqu'il est alors impossible de reconstituer la mémoire immunitaire perdue (9, 10).

La dégénérescence tissulaire du thymus et la diminution du nombre de TECs restent mystérieuses considérant que les TECs prolifèrent activement (11) et montrent des capacités

régénératives importantes même chez l'adulte (11, 12). En outre, les cellules progénitrices de l'épithélium thymique n'ont pas encore été caractérisées chez l'adulte et l'identification de ces cellules représente la première étape vers le développement de stratégies permettant la prévention de l'involution thymique, ou encore la régénération complète du thymus. Dans les prochaines sections, je ferai une révision des fonctions et propriétés du thymus, ainsi que des connaissances actuelles sur les potentielles cellules progénitrices de l'épithélium thymique.

1.2 Fonctions et propriétés du thymus

1.2.1 Rôles du thymus et des TECs

La production des lymphocytes T est hautement régulée afin de générer des cellules qui soient non seulement fonctionnelles, mais aussi tolérantes aux antigènes du soi. Le thymus est séparé en 2 régions anatomiques, le cortex et la médulla (Figure 1, p.3), qui orchestrent séquentiellement la maturation des thymocytes. Les TECs situées dans la région corticale (cTECs, *cortical TECs*) sont responsables du recrutement des précurseurs des cellules T, de la régulation des premières étapes de maturation des thymocytes, i.e. l'initiation du réarrangement du récepteur des cellules T (TCR, *T cell receptor*), et la détermination de la lignée de différenciation. Elles sont également en charge de la sélection positive, processus qui éliminera les thymocytes dont le TCR n'est pas fonctionnel ou incapable d'interagir avec les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I ou II de l'individu (MHC-I et MHC-II, *major histocompatibility complex*). Pour leur part, les TECs médullaires (mTECs, *medullary TECs*), conjointement avec les cellules dendritiques de la médulla, sont responsables de la sélection négative. Cette étape permet d'éliminer les lymphocytes T autoréactifs, i.e. dont le TCR se lie trop fortement à un complexe MHC-peptide du soi. Ce processus vise à éliminer les lymphocytes T qui engendreraient une réaction auto-immune. C'est seulement après ces deux étapes de sélection que les thymocytes deviennent matures et fonctionnels, i.e. des lymphocytes T naïfs qui pourront alors quitter le thymus (3, 13, 14).

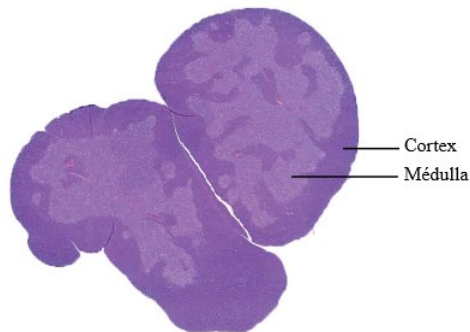


Figure 1. Régions corticale et médullaire du thymus montrées par une coloration à l'hématoxyline et éosine.

1.2.2 L'épithélium thymique : des populations cellulaires hétérogènes

Les TECs sont divisées en deux populations, cTECs et mTECs, exprimant toutes deux le marqueur épithélial EpCAM, mais ayant chacune leurs marqueurs spécifiques. Les cTECs sont caractérisées par l'expression de l'aminopeptidase Ly51, du récepteur endocytaire CD205, de la sous-unité du thymoprotéasome PSMB11 (ou $\beta 5T$), de la protéase PRSS16 et de la cytokératine 8 (K8) (3, 15, 16). Pour leur part, les mTECs sont principalement identifiées par leur motif de glycosylation reconnu par la lectine *Ulex europaeus agglutinin-1* (UEA1) et par l'expression de cytokératine 5 (K5), de claudine 3/4 et de CD40, un récepteur de la famille des *tumor necrosis factors* impliqué dans la différenciation des mTECs (3, 11, 15, 16).

Cependant, ces catégories sous-estiment la complexité et l'hétérogénéité de l'épithélium thymique. Tout d'abord, les mTECs sont divisées en trois populations selon leur niveau de différenciation (15, 17–19). Les mTECs immatures sont caractérisées par une faible expression de MHC-II et de CD80, et n'expriment pas le facteur de transcription *Autoimmune regulator* (AIRE; $MHC-II^{lo}CD80^{lo}AIRE^{-}$). Les mTECs matures ($MHC-II^{hi}CD80^{hi}AIRE^{+}$) jouent un rôle crucial dans la sélection négative puisque l'expression de AIRE leur permet de produire plusieurs antigènes tissu-spécifiques qui reproduisent l'immunopeptidome périphérique, permettant ainsi l'élimination des lymphocytes T potentiellement autoréactifs. Un troisième stade de maturation a récemment été découvert qui représente le stade de différenciation terminale des mTECs. En effet, une partie des mTECs matures diminuent leur

expression de MHC-II, de CD80 et de Aire (MHC-II^{lo}CD80^{lo}AIRE^{lo}) tout en conservant une expression faible des antigènes tissus-spécifiques, pour devenir des mTECs dites post-AIRE, terminalement différenciées et post-mitotiques (20). D'autre part, il existe des TECs dont le phénotype ne correspond pas aux catégories habituelles de cTECs et de mTECs. En effet, certaines TECs expriment à la fois des cytokératines spécifiquement associées aux cTECs, soit K8, et aux mTECs, soit K5. Le thymus embryonnaire au jour embryonnaire 12.5 (E12,5) est composé majoritairement de ces cellules double-positives (K5⁺K8⁺) (21–23). Elles sont également retrouvées en proportion beaucoup plus faible dans le thymus néo-natal, surtout à la jonction cortico-médullaire (11, 23–25).

Cette grande hétérogénéité rend difficile l'élucidation des voies de différenciation des TECs et, par conséquent, l'identification des cellules épithéliales progénitrices thymiques (TEPC, *thymic epithelial progenitor cells*). Il est donc primordial de connaître le développement embryonnaire des TECs et de comprendre les processus de renouvellement et de régénération du thymus chez l'adulte afin de mieux comprendre la biologie du thymus et les processus de différenciation des TECs.

1.3 Développement et cellules souches du thymus

1.3.1 Organogenèse et morphogenèse du thymus

L'organogenèse du thymus débute à E9,5 et se fait en deux étapes (16, 26–29). Premièrement, il y a induction et croissance des primordiums thymique et parathyroïdien à partir de la troisième poche pharyngienne de l'endoderme (Figure 2, p.5) (30, 31). À ce stade, les cellules progénitrices du thymus ne sont pas encore identifiables des autres cellules environnantes, car elles ne sont pas suffisamment différenciées. Ce n'est qu'au jour E11,5 qu'elles exprimeront FOXN1, le premier marqueur de TECs (Figure 2, p.5). Par la suite, les primordiums thymique et parathyroïdien se détachent du pharynx pour migrer vers leur emplacement final respectif. L'expression de FOXN1 est nécessaire à la différenciation initiale

des progéniteurs des TECs en cTECs et mTECs fonctionnels (27–29, 32), mais aussi au maintien du potentiel prolifératif des TECs et de la thymopoïèse tout au long de la vie (33, 34). En effet, les souris mutantes pour ce gène, appelée souris nues (*nude mice*, notées *Foxn1^{mut}*), ont un important défaut de développement du thymus qui reste à un état rudimentaire non différencié et n'est jamais colonisé par des lymphocytes (29, 35). De plus, une sous-expression de FOXN1 mène à une involution thymique précoce (34), alors qu'une surexpression de FOXN1, même dans un thymus entièrement atrophié, mènera à la régénération de l'épithélium thymique et de la thymopoïèse (36). D'autres facteurs de croissance sont requis pour la spécification cellulaire initiale du primordium, tels que *Sonic hedgehog* (SHH), *Wingless-int 5B* (WNT5B), WNT4, *bone morphogenic protein 4* (BMP4) et *fibroblast growth factor 8* (FGF8) (30, 31). Plus précisément, les protéines WNT4 et WNT5B sont deux régulateurs directs de l'expression de FOXN1 (37) et BMP4 est nécessaire pour le maintien de l'expression de FOXN1 (38). C'est en se penchant sur les processus développementaux du thymus qu'ont émergé les premières théories sur l'identité et le phénotype des TEPC, qui ont grandement évoluées au cours de la dernière décennie.

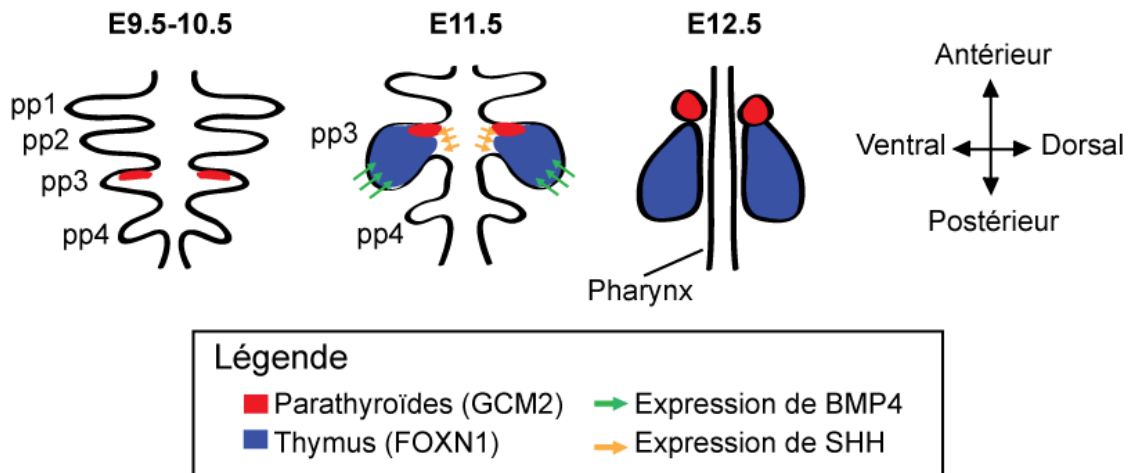


Figure 2. Développement embryonnaire du thymus et de la parathyroïde chez la souris. Le thymus et la parathyroïde se forment à partir de la troisième poche pharyngienne du feuillet de l'endoderme. Les précurseurs de la parathyroïde, qui expriment *Gcm2*, sont illustrés en rouge et les précurseurs du thymus, qui expriment *Foxn1*, sont illustrés en bleu. Les précurseurs de la parathyroïde apparaissent à E9,5, avant ceux du thymus

à E11,5. Les organes se détachent de l'œsophage et migrent vers leur emplacement respectif à partir de E12,5 (pp1 à pp4 : poches pharyngiennes 1 à 4).

1.3.2 Modèles actuels des voies de différenciation des TECs

Les premières théories sur les voies de différenciation des TECs ont été élaborées en se basant sur la morphogenèse du thymus. En observant les étapes d'apparition des différents marqueurs de cTECs et de mTECs, un premier modèle, dit modèle synchrone, a proposé l'hypothèse d'une TEPC bipotente ayant un phénotype mixte, marquant à la fois pour des antigènes spécifiques aux cTECs et aux mTECs (21, 23, 39). En effet, à E12,5, les TECs coexpriment K5 et K8 avant de se différencier. Ces cellules double-positives $K5^+K8^+$ sont capables de produire un microenvironnement thymique complet à E12,5 (21, 23), même à partir d'une seule cellule (22), démontrant ainsi l'existence d'un progéniteur bipotent chez l'embryon. Par la suite, d'autres études ont révélé l'existence de progéniteurs unipotents chez les deux populations de TECs (24, 40). Ce progéniteur générerait donc des progéniteurs unipotents, qui produiraient ensuite des cTECs et des mTECs (Figure 3A, p.7). Toutefois, le phénotype et les caractéristiques de ces progéniteurs restent à élucider et leur présence chez l'adulte n'a pas été démontrée.

Cependant, des travaux plus récents ont montrés que les mTECs dérivait de progéniteurs ayant précédemment exprimé des marqueurs spécifiques aux cTECs. Il a d'abord été observé qu'après avoir exprimé FOXN1, les TECs expriment d'abord K8 à E11,5, avant de coexprimer K5 à E12,5 (23, 39). Aussi, plusieurs études ont montré que les TECs à ce stade développemental expriment plusieurs marqueurs spécifiquement associés aux cTECs, soit CD205, $\beta 5t$, une forte expression de l'interleukine 7 (IL-7) et de *Delta-like ligand 4* (DLL4) (19, 41–44), tout en ayant la capacité de former un microenvironnement thymique fonctionnel complet (45). De plus, Ohigashi *et al* (2013) ont montré que toutes les mTECs proviennent de cellules progénitrices $\beta 5t^+$, une sous-unité du thymoprotéasome spécifiquement exprimée par les cTECs. Leur étude se base sur un modèle de souris transgéniques exprimant la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur de $\beta 5t$, permettant de marquer à la *green*

fluorescent protein (GFP) les cellules qui expriment ou ont exprimé la protéine $\beta 5t$ (46). Finalement, Ribeiro *et al* (2013) ont montré que des TECs $IL-7^+$ à E14,5, comprenant majoritairement des cTECs $CD205^+Ly51^+$, pouvaient se différencier à la fois en cTECs ($CD205^+Ly51^+$) et en mTECs ($CD80^+$) lors de culture d'organe réagrégé (RTOC, *reaggregate thymic organ culture*) (47). Toutes ces données, incompatibles avec le modèle synchrone, ont mené au modèle de différenciation asymétrique progressif, dans lequel une cellule épithéliale souche thymique (TEPC) génère un progéniteur transitoire ayant un phénotype semblable aux cTECs (tTEPC \approx cTEPC, Figure 3B, p.7). Ce progéniteur pourrait ensuite produire directement des cTECs ou un progéniteur de mTECs (mTEPC). À l'heure actuelle, il est impossible d'exclure la possibilité d'un troisième modèle de différenciation symétrique par étapes, dans lequel un progéniteur transitoire, portant des marqueurs spécifiques de cTECs, produirait des progéniteurs spécifiques aux cTECs (cTEPC) ou aux mTECs (mTEPC, Figure 3C, p.7).

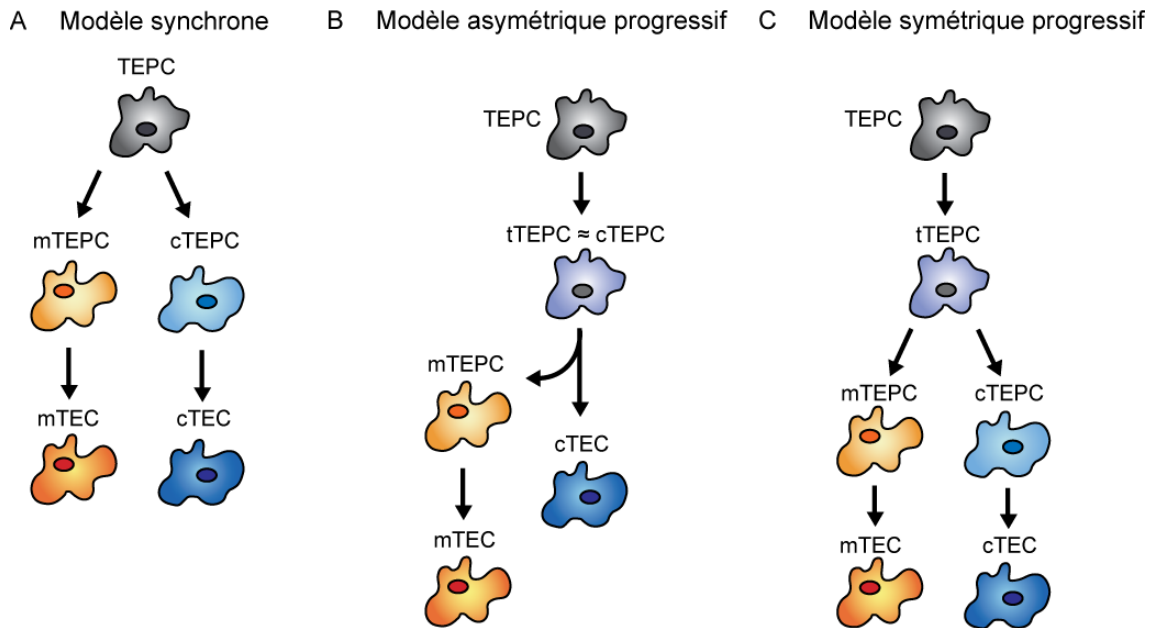


Figure 3. Modèles actuels des voies de différenciation des TECs. (A) Dans le modèle synchrone, les progéniteurs non différenciés bipotents (TEPC) divergent pour former des progéniteurs unipotents engagés vers la différenciation en cTECs (cTEPC) ou mTECs (mTEPC). (B) Dans le modèle asymétrique progressif, le progéniteur bipotent (TEPC) passe par un stade transitionnel (tTEPC) portant des caractéristiques associées

aux cTECs, pouvant à la fois produire des cTECs et des progéniteurs de mTECs (mTEPC). (C) Dans le modèle symétrique progressif, le progéniteur bipotent (TEPC) produit des progéniteurs transitoires (tTEPC) qui produisent des progéniteurs de cTECs (cTEPC) et de mTECs (mTEPC).

1.3.3 L'épithélium thymique adulte : renouvellement et régénération

Comme l'étude des TECs chez les souris adultes présente plusieurs obstacles, la plupart des études ont été effectuées chez l'embryon; les progéniteurs des TECs chez l'adulte n'ont donc toujours pas été identifiés. En effet, il s'avère pratiquement impossible de cultiver *in vitro* des TECs primaires extraites de souris adultes, rendant difficile l'évaluation du potentiel prolifératif des différentes catégories de TECs. Nous devons donc utiliser d'autres stratégies afin d'étudier la régénération et le maintien du thymus chez les souris adultes.

Le thymus subit de nombreux changements pendant la croissance et la vie adulte d'un individu. La croissance du thymus atteint son zénith à environ 4 semaines chez la souris, où la cellularité y est maximale tant dans le compartiment stromal que lymphoïde, puis le thymus commence à s'atrophier. De plus, le ratio cTECs : mTECs varie grandement avec l'âge. Les cTECs sont plus abondantes que les mTECs à E18 et à la naissance, mais les mTECs deviennent rapidement plus nombreuses après la naissance (11). Avec le vieillissement et l'involution du thymus, le nombre de TECs et la quantité de lymphocytes T produits diminuent, alors que le nombre de fibroblastes et d'adipocytes augmente (11, 34, 48–50).

Malgré cette perte cellulaire progressive, les TECs prolifèrent activement pendant la vie adulte : à 4 semaines, environ 10% des TECs sont produites par prolifération cellulaire quotidiennement et on trouve encore des cellules en prolifération chez la souris à 10 mois, bien qu'elles soient moins nombreuses (11). De plus, les TECs montrent une grande capacité régénérative même à un âge avancé. Par exemple, la castration induit une prolifération importante des TECs tant chez les souris adultes que chez les jeunes, bien que cette régénération soit seulement transitoire (11, 49, 51, 52). D'autre part, un thymus dont les cTECs ont été presque toutes éliminées par ablation sélective est apte à régénérer sa

population corticale. Cependant, cette capacité de régénération dépend des hormones sexuelles, puisque les souris mâles et les femelles virilisées par administration de 5 α -dihydrotestostérone sont incapables de rétablir le compartiment cortical des TECs, alors que les femelles et les mâles castrés montrent une régénération similaire 21 jours après l'ablation des cTECs (53). Ainsi, même avec l'âge, le thymus conserve une importante capacité de prolifération, mais qui semble dépendre des hormones sexuelles.

Le thymus est un organe très sensible aux changements physiologiques et métaboliques qu'un individu rencontre au cours de sa vie (6). Il subira une involution dans plusieurs situations, par exemple lors d'infection (54–57), de stress physiologique (58) ou psychologique (59) et pendant la grossesse (60–62). Il est également sensible au métabolisme énergétique de l'individu (6, 63–66).

Si le thymus est capable de prolifération et de régénération importante, il s'avère toutefois incapable de se préserver de l'atrophie liée à l'âge. Plusieurs hypothèses ont été émises quant aux raisons de l'involution thymique, mais aucune n'a encore été démontrée. Certains ont suggéré que l'arrêt de la production de lymphocytes T représentait une économie d'énergie, expliquant ainsi l'atrophie thymique aiguë observée pendant les périodes de gestation, de stress ou d'infection (67). D'autres ont proposé que le maintien de la production de lymphocytes T naïfs risquait d'augmenter la production de lymphocytes T régulateurs (Tregs) dirigés contre des antigènes infectieux, ou encore la production de lymphocytes T auxiliaires (CD4+) ou cytotoxiques (CD8+) dirigés contre des antigènes du soi, provoquant ainsi des maladies immunitaires (68). En outre, la longue durée de vie des lymphocytes T mémoires, dont le répertoire a été sélectionné et optimisé sur plusieurs années, réduit considérablement les conséquences néfastes que pourrait avoir une diminution de la production de lymphocytes T naïfs. Cependant, avec l'augmentation de l'espérance de vie, ce défaut immunitaire représente un problème grandissant. Afin de mieux comprendre la régulation de la prolifération des TECs et le processus de l'involution thymique, nous voulons identifier les cellules souches épithéliales thymiques. Ceci nous permettra éventuellement de déterminer des cibles thérapeutiques ou de développer une thérapie cellulaire visant la prévention de l'atrophie thymique ou encore la régénération complète du thymus. Pour ce

faire, nous nous sommes appuyés sur les connaissances actuelles sur les cellules souches d'autres tissus afin d'élaborer notre stratégie d'étude.

1.3.4 Cellules souches : ce que nous apprennent les autres tissus

Les cellules souches sont définies par leur capacité à produire des cellules différenciées, leur propre état non différencié et surtout, leur capacité à s'auto-renouveler, c'est-à-dire à se perpétuer sur une longue période de temps. Cette dernière propriété permet de distinguer les cellules souches des cellules progénitrices transitoires (*transit-amplifying cells*) (69).

Les cellules souches chez l'adulte ont des propriétés différentes selon leur tissu d'origine. Certaines se diviseront rapidement et posséderont une très grande capacité proliférative, et ce, sur une longue période de temps afin de remplacer les cellules perdues par l'usure normale du tissu ou de répondre à une situation pathologique. Dans cette catégorie se retrouvent les cellules souches hématopoïétiques (HSCs, *hematopoietic stem cells*), les cellules souches de l'épithélium intestinal, de l'épiderme et des glandes mammaires (69–71). D'autres cellules souches ont un taux de prolifération (ou *turnover*) relativement bas en conditions physiologiques, mais peuvent être fortement activées en situation d'insulte tissulaire, à l'instar des cellules souches des muscles squelettiques, du pancréas et du foie (69, 70, 72, 73). Dans d'autres tissus, les cellules souches ne se divisent que rarement et possèdent peu de potentiel clonogénique, même lors d'insulte tissulaire. C'est le cas par exemple pour les cellules souches rénales, du cerveau ou du cœur (70).

Les cellules souches sont majoritairement quiescentes chez l'adulte, c'est-à-dire qu'elles se divisent à une fréquence très faible (69, 70, 74, 75). Il a été suggéré que cette propriété leur permet de se préserver des dommages potentiels associés à la division cellulaire (76). Il existe toutefois une certaine hiérarchie dans les cellules souches. Chez la souris par exemple, certaines HSCs se divisent activement environ tous les 9 à 36 jours, alors que d'autres, appelées *dormant HSCs*, se divisent rarement, soit environ à tous les 56 à 145 jours

(73, 74). On trouve aussi des exceptions où les cellules souches ne sont pas quiescentes, comme les cellules souches de l'épithélium gastro-intestinal qui se divisent à tous les 2 à 7 jours (77). D'autre part, certains tissus ne possèdent pas de cellules souches quiescentes telles que définies plus haut. Par exemple, l'épithélium de l'œsophage possède une population uniforme de cellules progénitrices qui se divisent environ deux fois par semaines de manière stochastique afin de maintenir l'intégrité du tissu (78). Enfin, il peut y avoir différentes cellules souches pour différentes fonctions. Par exemple, le renouvellement de l'épiderme en conditions normales repose sur l'activité de cellules souches qui prolifèrent activement, alors que la réparation des blessures réactivera les cellules souches quiescentes des follicules pileux (76). Au vu de la grande diversité des cellules souches chez l'adulte, il est important d'avoir une méthode adaptée au tissu d'intérêt pour réussir à les identifier et à les caractériser.

1.3.5 Modèles d'étude des cellules souches

Plusieurs modèles expérimentaux ont été utilisés afin d'identifier et de caractériser les cellules souches. La majorité de ces modèles se basent sur le fait que celles-ci sont très souvent quiescentes; ces expériences sont regroupées sous la dénomination de *label-retaining assay* (75). Ceux-ci consistent à marquer les cellules avec une molécule fluorescente ou radioactive qui sera répartie de façon égale entre les cellules filles lors des divisions cellulaires, permettant ainsi d'évaluer la prolifération des cellules sur une longue période. Les premiers essais ont été effectués avec des marqueurs d'ADN comme la 5-bromo-2-désoxyuridine (BrdU), qui s'intègre dans les chromosomes lors de la réplication cellulaire à la place de la thymidine. Après une période d'exposition à la BrdU allant de quelques jours à plusieurs semaines (*pulse*), toutes les cellules ayant proliféré ont incorporé le marqueur. Par la suite, l'exposition à la BrdU est stoppée et s'ensuit une période appelée *chase*, durant habituellement entre 2 et 10 semaines. Pendant cette période, les cellules en division rapide perdront leur marquage par dilution de la molécule entre les cellules filles, tandis que les cellules différenciées et post-mitotiques qui auraient pu rester BrdU⁺ seront graduellement éliminées du tissu par usure normale. Ceci permet donc le marquage spécifique des cellules

qui se divisent rarement dans un tissu et possèdent une longue durée de vie, caractéristiques fréquentes des cellules souches. On nommera ces cellules *label-retaining cells* (LRC). Le même genre d'essai peut être réalisé avec la thymidine tritiée (H^3 -thymidine), l'identification des LRC se faisant par radiodétection (75). Il restera toutefois à démontrer que ces cellules sont bel et bien des cellules souches, le plus souvent par transplantation *in vivo* ou essais de clonogénicité *in vitro*. On peut également évaluer le profil d'expression génique des cellules par analyse du transcriptome (*microarray*, séquençage d'ARN de nouvelle génération, RT-PCR), bien que ces analyses ne soient pas aussi convaincantes qu'une démonstration directe de leur potentiel clonogénique.

L'utilisation de BrdU ou de H^3 -thymidine pose cependant certains problèmes. Si les analyses histologiques des LRC sont faciles à effectuer, l'analyse ou le tri des LRC par cytométrie de flux est plus problématique. En effet, cette technique nécessite la perméabilisation des cellules pour un marquage par anticorps fluorescent spécifique à la BrdU. D'autre part, l'utilisation de H^3 -thymidine ne permet pas la reconnaissance du marqueur par un anticorps et il est donc impossible d'analyser les cellules en cytométrie de flux ou de les trier. En conséquence, isoler ces cellules pour une transplantation ou encore pour l'analyse d'expression génique n'est pas possible. Afin de contourner ce problème, Tumber *et al* (2004) ont développé un modèle de souris transgénique permettant l'expression d'une histone H2B couplée à la GFP (H2B-GFP) sous le contrôle d'un promoteur inductible par la tétracycline (reverse-controlled tetracycline transactivator) dans les cellules de l'épiderme (79). Ce modèle, induisant l'expression d'une protéine fluorescente dans les cellules d'un tissu spécifique, rend possible le tri des LRC sans perméabilisation préalable et permet donc de tester leur potentiel clonogénique *in vivo* ou *in vitro*, ainsi que l'analyse de leur signature moléculaire. Différentes variantes de ce modèle ont d'ailleurs été fréquemment utilisées dans l'étude des cellules souches de plusieurs autres tissus, notamment des cellules souches hématopoïétiques (73, 74), de l'endomètre (80, 81), des muscles squelettiques (82), des reins (83), du tissu adipeux (84) et de l'épithélium de l'œsophage (78).

Pour l'étude des cellules souches de l'épithélium thymique, nous avons utilisé la souris produisant le facteur de transcription *reverse tetracycline-controlled transactivator* (rtTA) exprimé sous le contrôle du promoteur constitutif ROSA26 (Figure 4, p. 13). Ce facteur de

transcription activé en présence de tétracycline ou de son analogue, la doxycycline, induira l'expression de H2B-GFP. À l'aide de ce modèle, nous avons pu évaluer la présence de cellules se divisant rarement dans le thymus afin de les caractériser davantage.

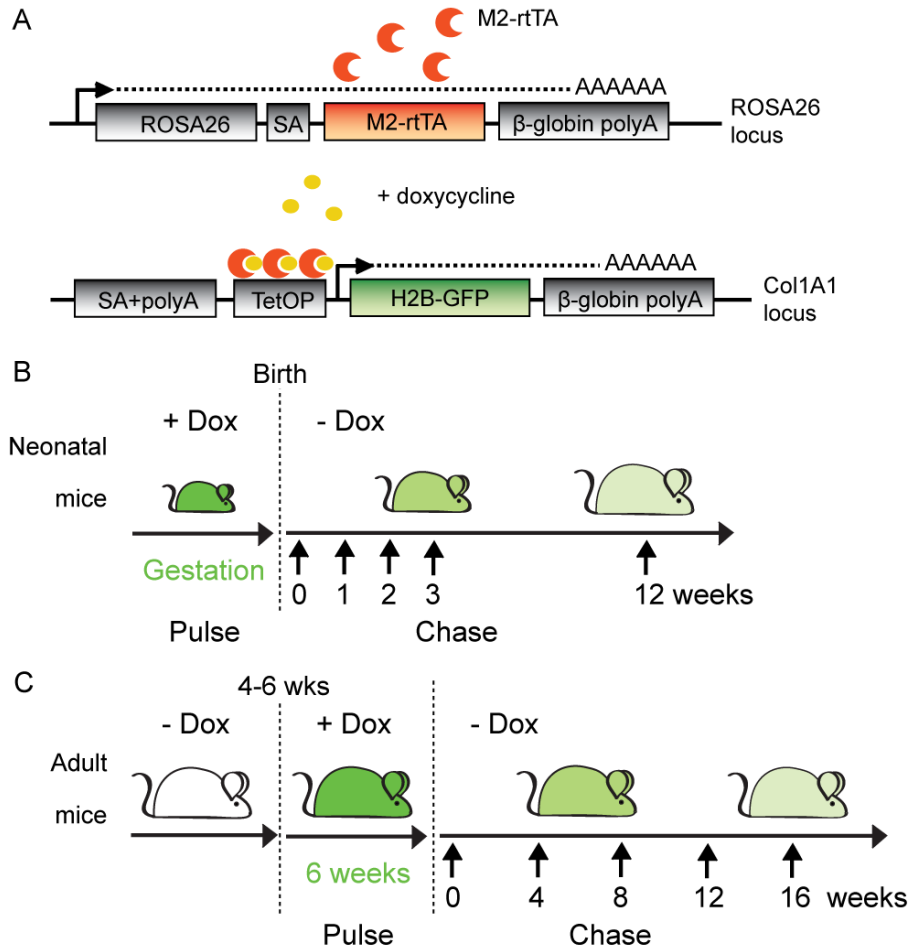


Figure 4. Modèle de souris transgénique H2B-GFP Tet-On. (A) Construits utilisés pour la génération des cellules souches embryonnaires et des souris transgéniques H2B-GFP. Le M2-rtTA est sous le contrôle du promoteur constitutif ROSA26 (en haut) et l'ADNc de H2B-GFP a été inséré dans le locus Col1A1 sous le contrôle du promoteur CMV minimal dépendant de la tétracycline (en bas). SA : *splice acceptor*; TetOP : *tetracycline operator elements fused to CMV minimal promotor*. (B-C) Schéma expérimental pour les souris néo-natales (B) et adultes (C), décrivant le traitement à la doxycycline (*pulse*) et la période de dilution de la H2B-GFP (*chase*). Les souris sont analysées à intervalle régulier après l'arrêt du traitement de doxycycline.

2. Projet de recherche

2.1 Principes

Le thymus subit un vieillissement précoce menant à une perte de fonction avec l'âge. En effet, l'involution du thymus engendre des conséquences importantes sur la santé des individus, telles qu'une augmentation de la susceptibilité aux infections et aux cancers chez les individus âgés. Afin de mieux comprendre et d'éventuellement trouver des moyens de prévenir cette dégénérescence, ou encore de reconstituer un microenvironnement thymique fonctionnel, nous voulons identifier et caractériser les TEPC chez les souris adultes, en plus de déterminer les cinétiques de prolifération des différentes populations épithéliales. Ceci nous permettra de mieux comprendre la biologie du thymus au cours de l'involution thymique et pourra nous renseigner sur des cibles thérapeutiques potentielles visant à régénérer ce tissu indispensable.

2.2 Hypothèse

Les cellules souches de plusieurs tissus sont quiescentes, comme les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches des follicules pileux, alors que d'autres cyclent continuellement, comme les cellules épithéliales intestinales. Nous voulons vérifier si le thymus adulte contient des cellules quiescentes en conditions physiologiques, qui représenteraient de potentielles cellules souches thymiques. Si le thymus contient de telles cellules quiescentes, nous pourrions les isoler afin de les caractériser davantage et éventuellement démontrer leur nature en tant que cellules progénitrices ou souches de l'épithélium thymique.

2.3 Objectifs

2.3.1 Déterminer s'il y a des cellules quiescentes dans le thymus néo-natal et adulte en utilisant le modèle de souris transgénique H2B-GFP Tet-On et les caractériser.

2.3.2 Comparer les cinétiques de prolifération des TECs dans plusieurs conditions physiologiques chez la souris.

2.3.2.1 Comparer le turnover des cTECs et de mTECs chez les souris jeunes et adultes à l'aide du modèle de souris transgénique H2B-GFP Tet-On.

2.3.2.2 Comparer le turnover des TECs mâles et femelles chez les adultes à l'aide du modèle de souris transgénique H2B-GFP Tet-On.

2.3.2.3 Définir les processus de croissance des populations épithéliales thymiques de la naissance jusqu'au stade adulte.

3. Manuscrit

3.1 Déclaration de l'étudiant concernant l'article

J'ai contribué à cet article en effectuant la planification et l'exécution de toutes les expériences, l'analyse et l'interprétation des résultats, ainsi que la rédaction du manuscrit. J'ai également participé à l'élaboration du design expérimental.

Sylvie Brochu a conçu le projet de recherche, participé aux expériences de *pulse-chase* sur les souris transgéniques et à la correction finale du manuscrit.

Charles St-Pierre a participé aux expériences de *pulse-chase* sur les souris transgéniques, à l'analyse de l'expression génique des LRC ainsi qu'à la correction finale du manuscrit.

Claude Perreault a conçu le projet de recherche, contribué à la planification des expériences et rédigé le manuscrit.

3.2 Adult thymic epithelium contains non-senescent label-retaining cells

Running Title: *Turnover of thymic epithelial cells*

Maude Dumont-Lagacé^{1,2,3}, Sylvie Brochu^{1,2,3}, Charles St-Pierre^{1,2} and Claude Perreault^{1,2}

¹Institute for Research in Immunology and Cancer

²Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada H3C 3J7

³M.D.L. and S.B. contributed equally to this work.

Copyright 2014. The American Association of Immunologists, Inc.

Abstract

Progress in our understanding of thymic epithelial cell (TEC) renewal and homeostasis is hindered by the lack of markers for TEC progenitors. Stem and progenitor cell populations display remarkable diversity in their proliferative behavior. In some but not all tissues, stemness is associated with quiescence. The primary goal of our study was to discover whether quiescent cells were present in neonatal and adult TECs. To this end, we used a transgenic label-retaining cell (LRC) assay in which a histone H2B-GFP fusion protein is expressed under the control of the reverse tetracycline-controlled transactivator and the tetracycline operator minimal promoter. In adult mice, we found that both cortical and medullary TECs (cTECs and mTECs) proliferated more actively in females than males. Moreover, we observed three main differences between neonatal and adult TECs: 1) neonatal TECs proliferated more actively than adult TECs, 2) whereas cTECs and mTECs had similar turnover rates in young mice, the turnover of mTECs more rapid than that of cTECs in adults, and 3) while no LRC could be detected in young mice, LRC were detectable after a 16-week chase in adults. In female mice, LRC were found almost exclusively among cTECs and expressed relatively low levels of *p16INK4a*, *p19ARF* and *Serpine1*, and high levels of *Bmi1*, *Foxn1*, *Trp63* and *Wnt4*. We conclude that LRC in adult TECs are not senescent post-mitotic cells and may represent the elusive progenitors responsible for TEC maintenance in the adult thymus.

Background

Thymic aging precedes that of other organs and leads to a progressive decline in thymic function with age in all jawed vertebrates (1-5). By the age of 45 years, approximately 75% of epithelial cells have been replaced by fibroblasts and adipocytes in the human thymus (1,6-8). Nonetheless, the precocious loss of thymic epithelial cells (TEC) is intriguing considering that TECs are not postmitotic cells such as mature neurons or differentiated cardiomyocytes. Indeed, based on Ki67 and BrdU labeling, Gray et al. found that in 4 week-old mice, about 10% of TECs arose from proliferation daily (9). The proportion of dividing TECs decreased with age, but some Ki67⁺ TECs could still be detected in 12 month-old mice (9). In line with this, Rode and Boehm demonstrated that in preadolescent and adult mice, after acute loss, cortical TECs (cTECs) were able to proliferate vigorously, albeit in a sexually dimorphic manner (10). Why is the substantial regenerative potential of TECs insufficient to prevent age-related thymic involution? Our inability to answer this question illustrates our lack of understanding of TEC homeostasis and the scarcity of data on the nature and properties of TEC progenitors (4,11-13).

Two groups directly demonstrated the existence of bipotent cTEC/mTEC progenitors. Rossi et al. reported that a single embryonic TEC injected into a fetal thymus gave rise to both cTEC and medullary TECs (mTECs) (14). Using in vivo cell lineage analysis, Bleul et al. demonstrated the presence of bipotent TEC progenitors at birth, but also detected unipotent progenitors (15). Nonetheless, the proportion and functional importance of unipotent vs. bipotent TEC progenitors are unknown and, alike what occurs in other tissues, might well change over time (4,15). Thus, the mammary gland initially develops from multipotent embryonic progenitors, which give rise to both myoepithelial cells and luminal cells, but later in life the maintenance of each lineage is ensured by unipotent progenitors able to differentiate into either myoepithelial or luminal lineages (16). Progress in our understanding of TEC renewal and homeostasis is hindered by the lack of markers or colony forming assays for TEC progenitors.

Stem and progenitor cell populations display remarkable diversity in their proliferative behavior (17). In some tissues, stemness is associated with quiescence. Thus, hematopoietic stem cells (HSCs) and hair follicle bulge divide infrequently to prevent stem-cell exhaustion (18-20). In other tissues, there are no slow-cycling or quiescent stem cells (21,22). Thus the esophageal epithelium is maintained by a single population of cells that divide stochastically to generate proliferating and differentiating daughters with equal probability (23). Stem cell behavior can also change as a function of age: HSCs proliferate extensively until 3 weeks of age, and then switch to a quiescent adult phenotype (24,25).

The primary goal of our study was to discover whether non-senescent quiescent cells were present in neonatal and adult TECs. To this end, we used a transgenic label-retaining cell (LRC) assay in which a histone H2B-GFP fusion protein (H2B-GFP) is expressed under the control of the reverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA) and the tetracycline operator minimal promoter (18,20,26). One advantage of this system is that H2B-GFP-retaining cells can be visualized and isolated alive, thereby enabling performance of additional analyses on LRC. Our secondary objective was to compare the turnover of cTECs and mTECs in neonatal and adult thymus. We report that 1) in adult but not neonatal mice, cTECs and mTECs show different turnover rates 2) adult TECs proliferate more extensively in female than male mice, and 3) LRC displaying putative features of progenitor cells are present in adult TECs.

Materials and methods

Mice

B6.Cg-*Gt(ROSA)26Sor^{tm1(rtTA*M2)Jae}/J* and STOCK Tg(tetO-HIST1H2BJ/GFP)47Efu/J mice purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor) were bred and housed under specific-pathogen-free conditions in sterile ventilated racks at the Institute for Research in Immunology and Cancer. For H2B-GFP pulse-chase experiments, doxycycline was incorporated in food (2 g/kg) (Hartlan Laboratories), or in drinking water (2 mg/ml of doxycycline supplemented with 5% sucrose) (27,28). All procedures were in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the Comité de Déontologie et Expérimentation Animale de l'Université de Montréal.

Flow cytometry analysis and sorting

Enrichment of thymic stromal cells was performed as previously described (9,29). Thymic stromal cells were stained with biotinylated Ulex Europaeus Lectin 1 (UEA1; Vector Laboratories) and PE-Cy7 or PE-TexasRed conjugated streptavidin (BD Biosciences) and the following antibodies: i) AlexaFluor-700 anti-CD45 and PE anti-I-A^b from BD Biosciences, ii) AlexaFluor-647 anti-Ly51 and APC-Cy7 anti-EpCAM from BioLegend. Viability of cells was assessed using 7-AAD (BD Biosciences). TECs were selected as CD45⁻EpCAM⁺. In neonatal mice, mTECs and cTECs were defined as UEA-1⁺Ly51⁻ and UEA-1⁻Ly51⁺, respectively. In adult mice, mTECs and cTECs were defined as Ly51⁻ and Ly51⁺, respectively (see Supplemental Figure 1, p.60 for gating strategies and isotype controls). Adult female H2B-GFP^{+/-} rtTA⁺ mice were treated with doxycycline and thymic stromal cells from 2 to 3 mice were sorted and pooled for quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis. Live TECs (7-AAD⁻ CD45⁻ EpCAM⁺) were sorted as cTECs (Ly51⁺ I-A^{b low}) and mTECs (Ly51⁻ I-A^{b low}), and further separated in GFP^{hi} (LRC) and GFP⁻ (non-LRC) populations (see Supplemental Figure 2, p. 61, for gating strategy). TECs were sorted on a three laser FACS Aria (BD Biosciences) or analyzed on a three laser LSR II (BD Biosciences) using FACSDiva and FlowJo softwares (BD Biosciences) (30).

RT-PCR experiments

Gene expression was compared between LRC and non-LRC from the same TEC preparations. Total RNA was isolated using Trizol™ as recommended by the manufacturer (Invitrogen), and then further purified using RNeasy Micro columns (Qiagen). Sample quality was assessed using Bioanalyzer RNA Pico chips (Agilent). Reverse transcription was performed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) as described by the manufacturer. Samples were pre-amplified for 12 cycles using TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystems). Gene expression levels were determined using pre-validated TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) and Universal Probe Library Assays (Roche). *Actb* (Mm00607939), *Gapdh* (Mm4352932) and *Hprt* (Mm01545399) were used as endogenous controls. Detection of qRT-PCR reaction was done using an ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) as described (31).

Statistical analyses

Unless stated otherwise, results are expressed as means \pm SD, statistical significance was tested using Student unpaired two-tailed t test, and differences with a p value < 0.05 were considered significant. The half-life of GFP⁺ cells were calculated with GraphPad Prism software V5.01 using a one-phase decay nonlinear regression analysis. Comparison between GFP dilution kinetics has been determined using extra sum-of-squares F test.

Results

Experimental model

Doxycycline leads to expression of H2B-GFP in all tissues of mice bearing the *rtTA* and the *H2B-GFP* genes. When doxycycline is withdrawn, because of the dynamic interchange of H2B among nucleosomes, H2B-GFP dilutes equally between two daughter cells during cell division (18,20,23,32). Thus, the H2B-GFP content can be analyzed in a manner similar to that used for CFSE staining (32). In quiescent cells, H2B-GFP is detectable for at least six months (33-35), and at least five cell divisions are required for a H2B-GFP⁺ cell to be rendered undetectable by flow cytometry (GFP⁻) (19,32). For pulse-chase experiments in adult mice, doxycycline administration was initiated at 4-5 weeks of age and was pursued for 6 weeks. For “neonatal” mice, doxycycline was administered throughout the gestation period and was terminated at birth. During the chase period, beginning at T0, we analyzed two parameters. First, we studied the percentage of GFP⁺ cells: cells whose GFP fluorescence intensity was greater than that of negative controls (mice with the *H2B-GFP* but not the *rtTA* gene). Second, we assessed the frequency of cells that had undergone 0 or 1 division only during the chase period (GFP^{hi} cells); cells that remained GFP^{hi} at the end of the chase period were considered to be LRC. When attempting to identify GFP^{hi} cells, we took into account that, in the absence of cell division, the GFP content of labeled cells decreases by 50% every 24 days due to H2B-GFP degradation (32); the gate defining GFP^{hi} cells was shifted accordingly during the chase period.

Population dynamics of cTECs and mTECs in neonates

TEC subsets change in number and proportion as a function of age, and these changes are particularly dramatic during the first month of life in mice (9). Therefore, as a prelude to our study of TEC turnover in young mice, we analyzed the numbers of cTECs (CD45⁻EpCAM⁺Ly51⁺UEA1⁻) and mTECs (CD45⁻EpCAM⁺Ly51⁻UEA1⁺) at several time points during the first 12 weeks of life (Fig. 1A,B, p.25). In accordance with previous results (9), cTECs represent the major TEC population at birth. Numbers of mTECs increased very

rapidly during the first three weeks, more slowly thereafter, and reached a zenith at around seven weeks. By contrast, the number of cTECs decreases sharply between week one and three (Fig. 1A,B, p.25). Hence, cTECs represent only $1.99\% \pm 0.66$ of TECs by three weeks. Notably, a similar decrease of cTECs was previously observed in 4 week-old C57BL6 mice (9). Also, the loss of cTECs could not be ascribed to a downregulation of the cTEC marker Ly51 because similar results were observed with another cTEC marker, CD205 (Supplemental Figure 3, p.62). Following a nadir at three weeks, cTEC numbers increased progressively and adult cTEC/mTEC ratios were reached at about seven weeks of age (Fig. 1A,B, p.25).

Turnover of TECs in young mice

Mice bearing the *rtTA* and the *H2B-GFP* genes were pulsed during gestation as their mothers were given doxycycline from conception to birth. Thereafter, GFP expression was chased from birth to 12 weeks of age. H2B-GFP dilution occurred at same rate in cTECs and mTECs: they exhibited similar proportions of GFP⁺ and GFP^{hi} cells (Fig. 2A-C, p.27) and the half-life of GFP⁺ cells was similar for both TEC subsets (Table I, p.26). The transient increase in the percentage of GFP⁺ cTECs at three weeks (Fig. 2B, p.27) was not significant and probably resulted from a loss of GFP⁻ cTECs since the absolute number of GFP⁺ cTECs in the thymus did not increase during this time frame (data not shown). Notably, all TECs were GFP⁻ after 12 weeks of chase (Fig. 2A,B, p.27). Hence, none of the TECs containing GFP at birth became an LRC. Our data are consistent with previous observations based on BrdU and Ki67 labeling showing that TECs proliferate extensively during the neonatal period (9). In addition, our data demonstrate that, in young mice, cTECs and mTECs have similar turnover kinetics.

These observations raise the question: if neonatal mTECs and cTECs display similar proliferation rates (Fig. 2A-C, Table I, p. 26-27), how can we explain the sharp decrease in cTEC numbers observed between week one and three (Fig. 1B, p.25)? During this period, the proportion of apoptotic cTECs was inferior or equal to that of apoptotic mTECs (Fig. 1C, p.25). Hence, the cTEC loss cannot be explained by preferential apoptosis of cTECs. We found a plausible explanation to this conundrum by using a metric that we called the GFP content index, which is the sum of the GFP fluorescence intensity of all GFP⁺ cells. In closed

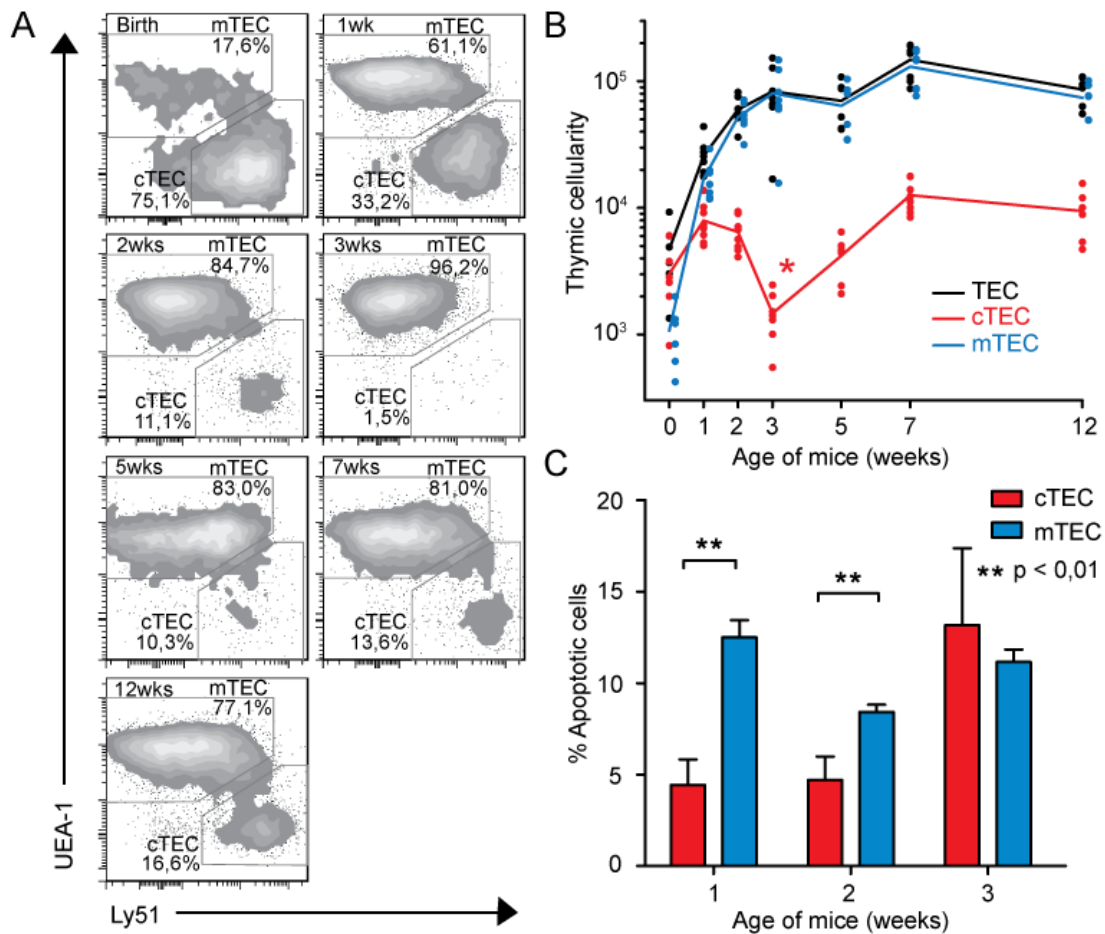


Figure 1. Population dynamics of cTECs and mTECs in neonatal mice. (A) TECs ($CD45^{\text{EpCAM}^+}$) were labeled with anti-Ly51 Ab and UEA1 to segregate cTECs ($UEA1^{\text{Ly51}^+}$) and mTECs ($UEA1^{\text{Ly51}^-}$). The gating strategy is depicted in Supplemental Fig. 1. (p.60) **(B)** Numbers of mTECs and cTECs show major variations during the neonatal period. A star indicates a significant decrease ($p < 0.05$) in the absolute cell number relative to the previous time point. **(C)** Percent of apoptotic cells in cTECs and mTECs, defined as $7\text{-AAD}^{\text{int}}$; necrotic cells (7-AAD^{hi}) were excluded from analysis. Each group includes 5 to 8 mice.

system, without any input of new GFP^+ cells, the total GFP content cannot increase; it can only decrease as a function of cell division and GFP catabolism. Any increase in the total GFP content implies the arrival of new GFP^+ cells during the chase period. At T0, the GFP content

of cTECs was superior to that of mTECs and, as expected for cells in a closed system (no new input), the GFP content of cTECs decreased progressively during the chase period (Fig. 2D, p.27). The salient finding was that the GFP content of mTECs showed a significant increase during week one ($p = 0.026$) and thereafter remained superior to that of cTECs (Fig. 2D, p.27). The increase in the GFP content of mTECs means that, at least during week one, mTECs receive new cell input. In other words, GFP⁺ cells that did not possess mTEC markers at birth acquired these markers after birth.

Table I. Turnover of TECs in young and adult mice.

		Young	Adult female	Adult male	p value Male vs Female
cTECs	% LRC	0.0%	7.6% ± 4.1	47.0% ± 5.7	1.1 x 10 ⁻⁷
	Half-life (wks)	1.1	15.4	35.0	0.0043
	(95% CI)	(0.9 to 1.6)	(12.7 to 19.4)	(25.6 to 55.0)	
	R ²	0.68	0.78	0.71	-
mTECs	% LRC	0.0%	1.1% ± 0,8	11.0% ± 4,2	2.2 x 10 ⁻⁵
	Half-life (wks)	0.9	5.7	10.9	0.0002
	(95% CI)	(0.8 to 1.2)	(5.2 to 6.3)	(9.0 to 13.9)	
	R ²	0.79	0.94	0.89	-
p value, Half-life cTECs vs mTECs		0.3676	< 0.0001	< 0.0001	-

Percentages of LRC after 16 weeks of chase are calculated from 5 to 10 mice for female and 3 to 4 mice for male. Standard deviations are indicated beside. Half-life of GFP⁺ cells is calculated by one phase decay nonlinear regression, with the constraint of the plateau equal to zero. The 95% confidence interval is indicated in parenthesis and R² represents the fitting of the nonlinear regression curve. Extra sum-of-squares F tests

were performed to compare GFP dilution kinetics in cTECs vs mTECs, and in male vs female adult mice. Unpaired two-tailed Student's t-test was performed to compare percentage of LRC in female and male adult mice. All calculations were done using GraphPad Prism software.

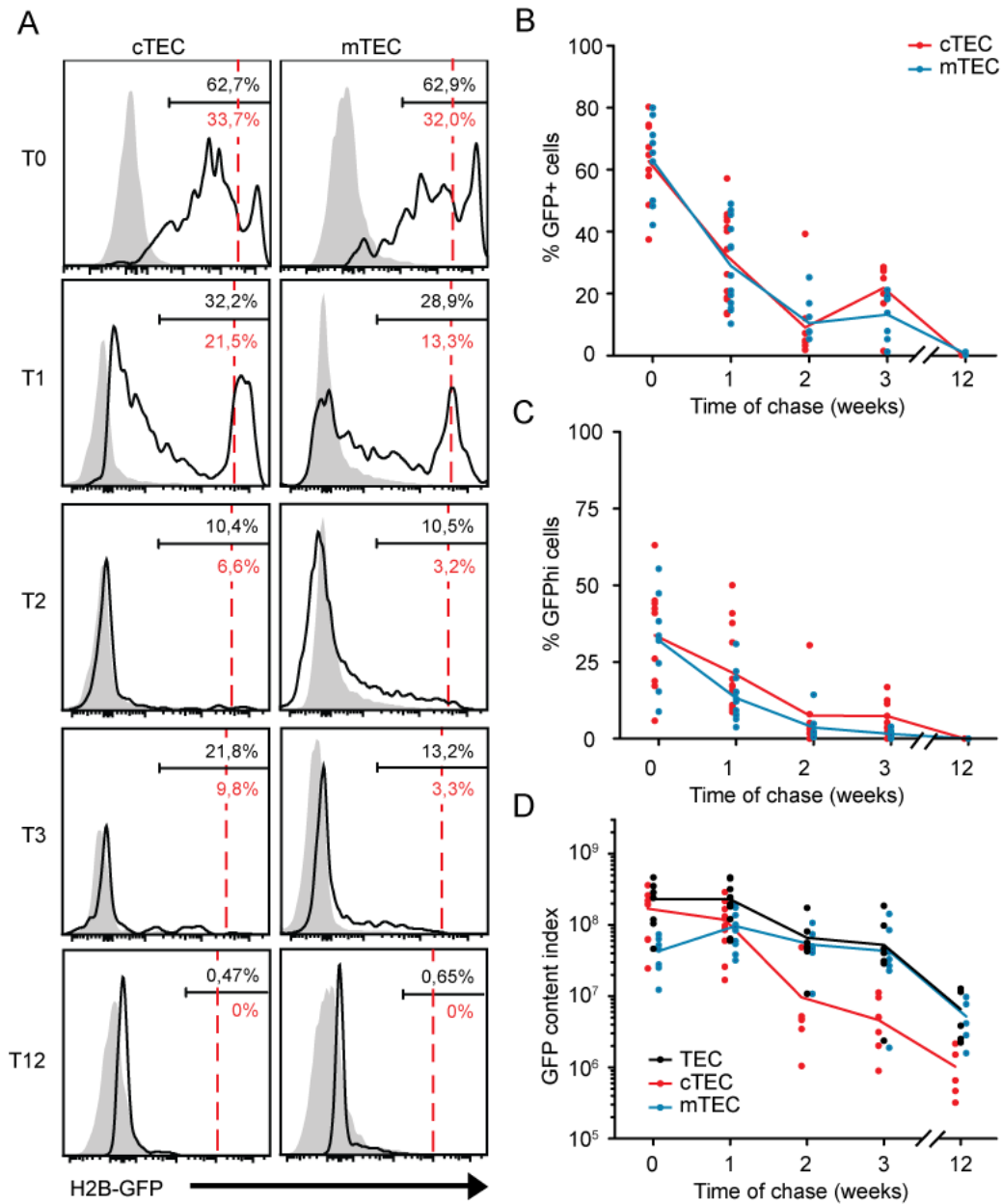


Figure 2. Neonatal TECs contain no LRC. (A) Representative profiles of H2B-GFP fluorescence intensity during a 12 week-chase period. Birth corresponds to the

beginning of chase period (T0) and time is indicated in weeks. Solid lines represent fluorescence in H2B-GFP⁺ rtTA⁺ mice; as a negative control, fluorescence in H2B-GFP⁺ rtTA⁻ mice is depicted in gray. Cells whose fluorescence intensity is greater than the negative control are considered to be GFP⁺. Cells to the right of red dashed lines correspond to cells that have undergone 0 or 1 division only and are referred to as GFP^{hi} cells. Percentages of GFP⁺ (black) and GFP^{hi} (red) cells are indicated in the gate delimiting the GFP⁺ region. Red dashed lines delimiting the GFP^{hi} gate were adjusted for all time points, considering the H2B-GFP half-life of 24 days (32). (B) Percentages of GFP⁺ cells in cTECs and mTECs. (C) Percentage of GFP^{hi} cells in TEC subsets. (D) GFP content index of TEC subsets. Each dot represents one mouse and lines connect the means. Each group included 5 to 13 mice.

Turnover of TECs in adult mice - Adult TECs contain long-term LRC

Following doxycycline administration for six weeks, adult male and female mice possessing the *rtTA* and *H2B-GFP* genes were analyzed during a chase period of 16 weeks. Mice were 26 to 27 weeks old at the end of the chase period. Consistent with previous studies based on BrdU and Ki67 labeling (9), GFP dilution curves revealed that TECs proliferated less actively in older (Fig. 3-4, Table I, p.26, 29-30) than in younger (Fig. 2, Table I, p.26-27) mice. Here, three notable findings emerged. Firstly, in both male and female adult mice, GFP dilution was much faster in mTECs than in cTECs (Fig. 3A,B and 4A,B, Table I, p.26, 29-30). Moreover, MHC-II^{hi} mTECs (mTEC^{hi}) lost their fluorescence faster than MHC-II^{lo} mTECs (mTEC^{lo}) (Supplemental Figure 4, p.63). Secondly, both cTECs and mTECs proliferated more actively in females (Fig. 3, p.29) than in males (Fig. 4, p.30). Indeed, based on one-phase decay non-linear regression analysis, the half-life of TECs was about twice shorter in females than in males (Table I, p.26). Thirdly, in contrast to young mice, adult mice contained LRC. In females, about 10% of cTECs, but virtually no mTECs, remained GFP^{hi} at the term of a 16-week chase (Fig. 3C, p.29). The proportion of GFP^{hi} was even greater in male mice (Fig. 4C, p.30).

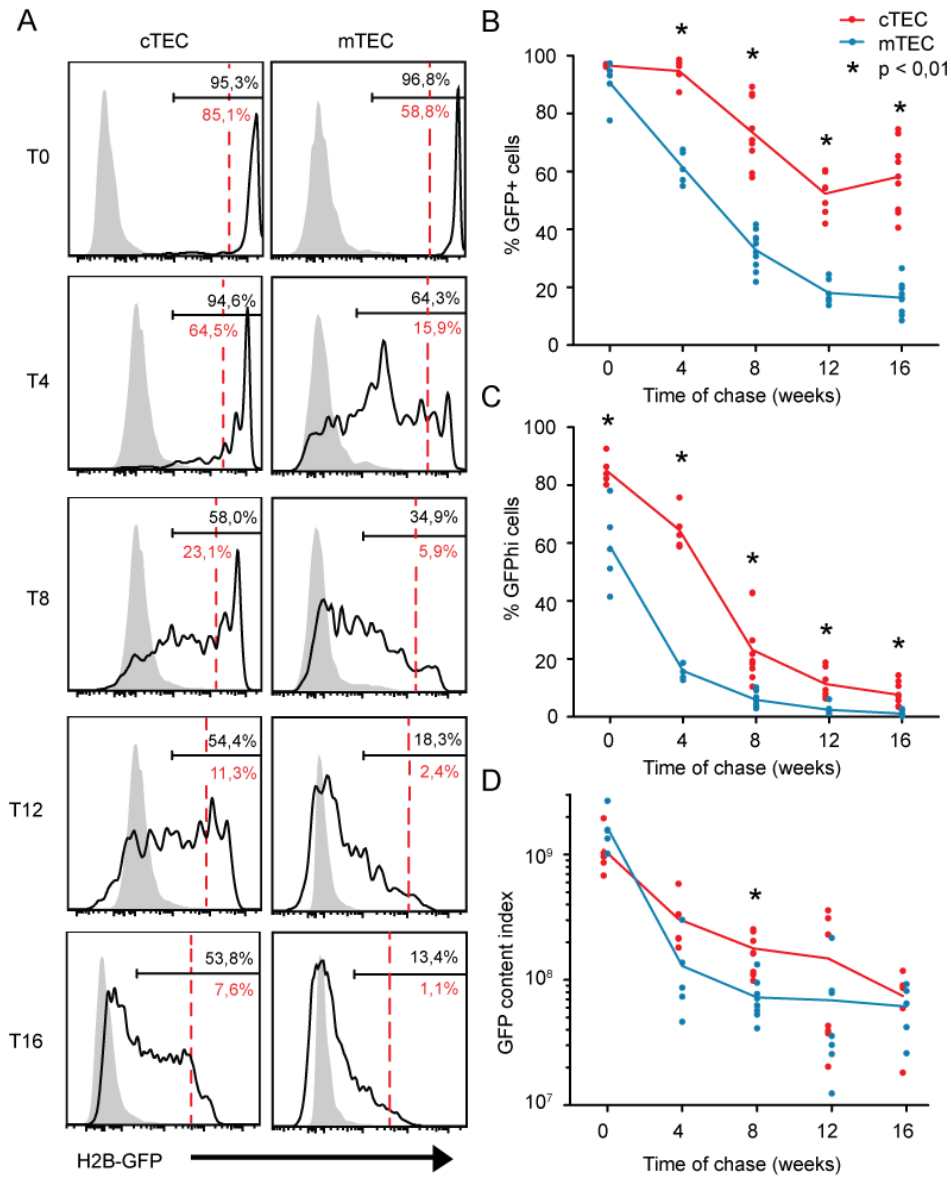


Figure 3. Turnover of TEC subsets in adult female mice. (A) Representative profiles of H2B-GFP intensity during a 16 week-chase period in adult female thymi. T0 corresponds to the beginning of the chase period and time is indicated in weeks. Solid lines represent fluorescence in H2B-GFP⁺ rtTA⁺ mice; as a negative control, fluorescence in H2B-GFP⁺ rtTA⁻ mice is depicted in gray. Percentages of GFP⁺ (black) and GFP^{hi} (red) cells are indicated in the gate delimiting the GFP⁺ region. Red dashed lines delimiting the GFP^{hi} gate were adjusted for all time point, considering the H2B-GFP half-life of 24 days (32). **(B)** Percentage of GFP⁺ cells in TEC subsets. **(C)** Percentage of GFP^{hi} cells in TEC subsets. **(D)** Total GFP content of TEC subsets. Each

dot represents one mouse and lines connect the means. Each group included 5 to 10 mice. Data for cTECs and mTECs were compared at all time points; * indicates a significant difference between cTECs and mTECs ($p < 0.01$).

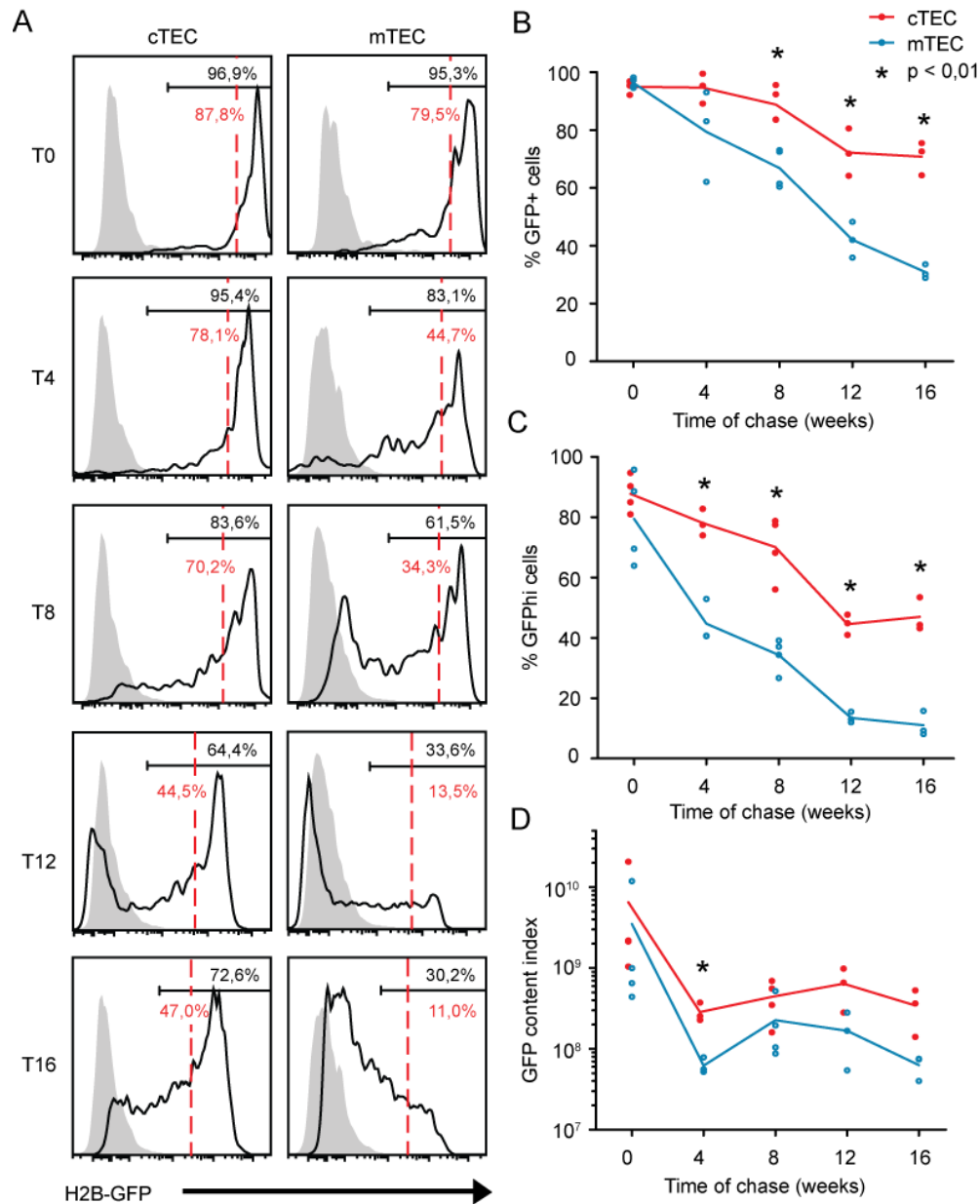


Figure 4. Turnover of TEC subsets in adult male mice. (A) Representative profiles of H2B-GFP intensity during a 16 week-chase period in adult male thymi. T0 corresponds to the beginning of the chase period and time is indicated in weeks. Solid lines represent

fluorescence in H2B-GFP⁺ rtTA⁺ mice; as a negative control, fluorescence in H2B-GFP⁺ rtTA⁻ mice is depicted in gray. Percentages of GFP⁺ (black) and GFP^{hi} (red) cells are indicated in the gate delimiting the GFP⁺ region. Red dashed lines delimit the GFP^{hi} gate and were adjusted for all time point, considering the H2B-GFP half-life of 24 days (32) (B) Percentages of GFP⁺ cells in TEC subsets. (C) Percentage of GFP^{hi} cells in TEC subsets. (D) GFP content index of TEC subsets. Each dot represents one individual and lines connect the means. Each group included 3 to 4 mice. Data for cTECS and mTECs were compared at all time points; * indicates a significant difference between cTECS and mTECs (p < 0.01).

The LRC phenotype is typically found in two cell types: i) postmitotic (terminally differentiated or senescent) cells that can no longer undergo cell division and ii) quiescent somatic progenitor/stem cells with clonogenic potential (18,19,33,36). In order to gain insights into the nature of thymic epithelial LRC, we analyzed the cell size and gene expression profile of TECs from adult mice chased for 16 weeks. We focused on female LRC because they represent a small discrete cell population in a rapidly proliferating compartment (Fig. 3C, p.29). By contrast, we surmised that LRC in males might be functionally more heterogeneous (Fig. 4C, p.30). Indeed, since the proliferation rate of male TECs is relatively modest, we hypothesized that their large LRC population might contain a mixture of progenitor cells and post-mitotic cells. One hallmark of senescent cells is that they increase in size (37). In accordance with this concept, we found that the size of mTEC^{hi} cells was larger than that of other TEC subsets (Fig. 5A, p.33). This makes sense since *Aire*⁺ mTECs are uniformly mTEC^{hi} and postmitotic (38). Notably, we observed that GFP^{hi} cTECs (LRC) were significantly smaller than GFP⁻ cTECs. We then sorted GFP^{hi} and GFP⁻ cTECs and GFP⁻ mTEC^{lo} cells [there were practically no GFP^{hi} mTECs in females at the end of a 16-week chase (Fig. 3C, p.29)] in order to assess the expression of three senescence-associated transcripts: *p16INK4a* and *p19ARF* which inhibits the G1- to S-phase transition in the cell cycle and is upregulated in senescent cells (37,39) and *Serpine1* which is both necessary and sufficient for the induction of replicative senescence downstream of p53 (40,41). We found that expression of *p16INK4a* and *Serpine1* transcripts was lower in LRC than in GFP⁻ cTECs and GFP⁻ mTEC^{lo} cells (Fig. 5B, p.33). Levels of *p19ARF* were similar in LRC and GFP⁻

cTECs but were upregulated in the mTEC^{lo} population. In order to gain insight into a possible progenitor cell functionality of adult cTEC LRC, we assessed the expression of four genes that promote TEC proliferation and maintenance and whose absence leads to thymic atrophy: *Bmi1*, *Foxn1*, *Trp63* and *Wnt4* (42-47). Expression of *Foxn1*, *Trp63* and *Wnt4* adopted the following hierarchy: LRC \geq GFP⁻ cTECs \geq mTEC^{lo} population (Fig. 5C, p.33). For *Bmi1*, the hierarchy was slightly different: LRC \geq mTEC^{lo} population \geq GFP⁻ cTECs. In addition, we evaluated the expression of transcripts overexpressed in cTECs (*Psmb11*, *Prss16*) or mTECs (*Cd40*, *Cd80* and *Tnfrsf11a*) (29,48). cTEC LRC did not show evidence of bipotentiality: their gene expression profile was typical of cTECs with no upregulation of mTEC markers. (Fig. 5D, p.33). In fact, LRC expressed even higher levels of cTEC markers (*Psmb11* and *Prss16*) than GFP⁻ cTECs (Fig. 5D, p.33). Finally, we observed no difference in the expression of MHC-II on GFP^{hi} and GFP⁻ cTECs (data not shown). Collectively, these data strongly suggest that, at least in females, cortical LRC are not senescent cells. Their transcriptomic profile rather suggests that they express genes promoting TEC replication potential and that they might therefore be TEC progenitor/stem cells.

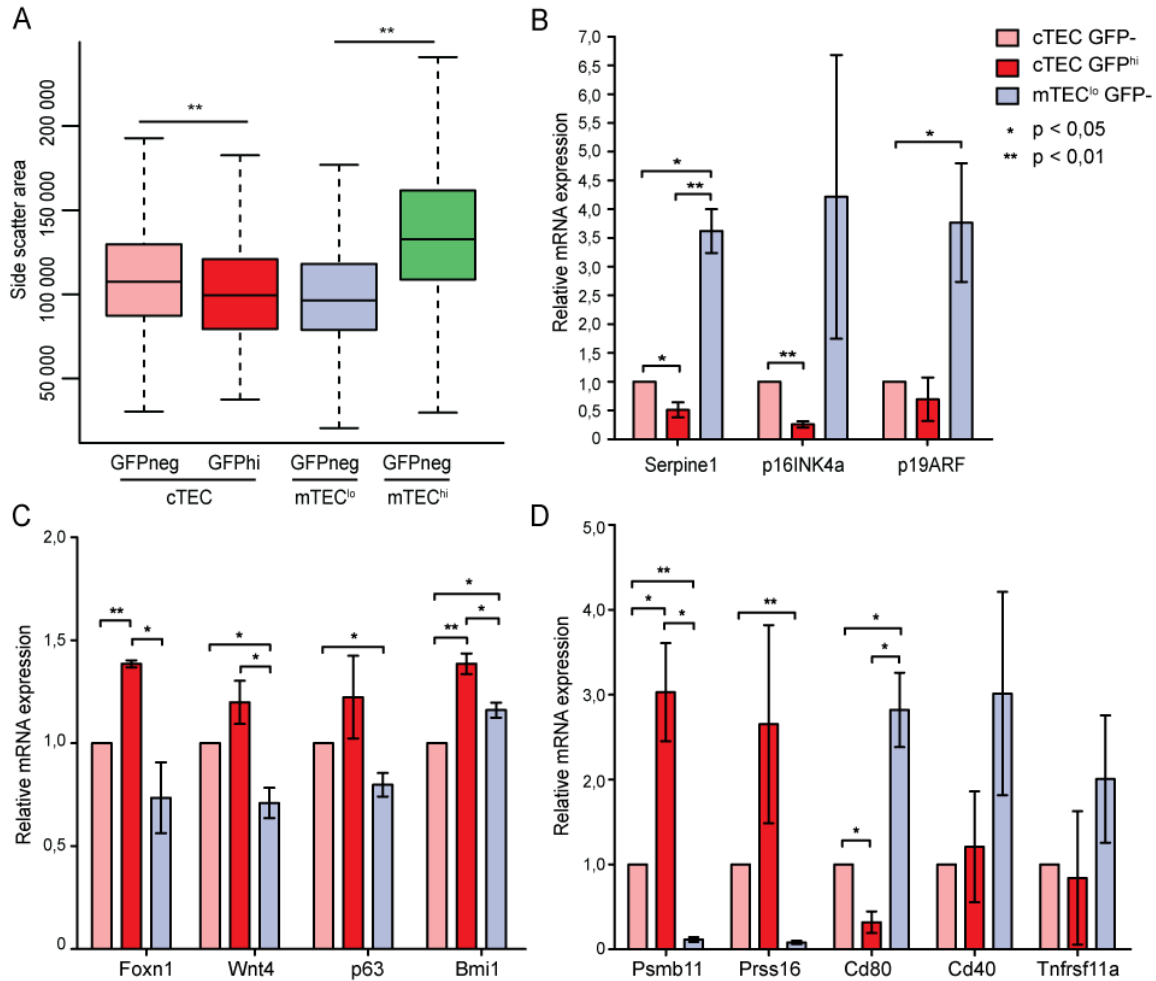


Figure 5. Cell size and gene expression profile of LRC. (A-D) Flow cytometry and qRT-PCR analyses were performed on TECs from female mice, treated with doxycycline for 6 weeks and chased for 16 weeks. Two experiments were performed on 2 and 3 pooled thymi. (A) Side scatter area of TEC subsets. As a function of their MHC-II expression, mTECs were separated into mTEC^{lo} (blue) and mTEC^{hi} (green). (B) qRT-PCR analysis of senescence-associated transcripts in TEC subsets. Data depict transcript abundance relative to GFP⁻ cTECs. (C) qRT-PCR analysis of transcripts associated with TEC development and maintenance. Data depict transcript abundance relative to GFP⁻ cTECs. (D) qRT-PCR analysis of transcripts associated with cTEC or mTEC lineages. Data depict transcript abundance relative to GFP⁻ cTECs.

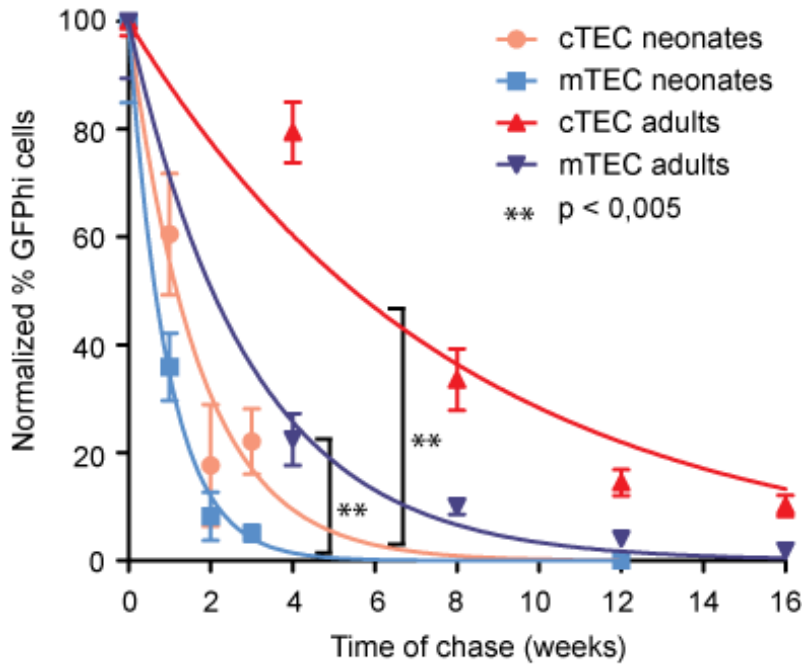


Figure 6. The clearance rate of GFP^{hi} TECs is more rapid in young than in adult mice. The clearance rate of GFP^{hi} cTECs and mTECs was calculated from data displayed in Fig. 2C (young mice) and Fig. 3C (adult female mice) after normalization according to the TEC frequency at T0 (the beginning of the chase period). Data are depicted as the mean ± SEM.

Discussion

Gray *et al.* previously demonstrated that the turnover of TECs diminished with age (9). We confirm this observation using a different mouse model and report supplemental differences between neonates and adult mice: i) whereas cTECs and mTECs had similar proliferation rates in young mice, mTECs proliferated more actively than cTECs in adults, and ii) LRC were detectable after a 16-week chase in adults (Fig. 3-4, p.29-30) but no LRC were found when the chase is initiated at birth (Fig. 2, p.27). Why did we detect LRC in adults but not young mice? H2B-GFP expression at T0 was lower in neonates than in adults: the percentage of TECs that were GFP^{hi} at the beginning of the chase period was about 70% in adults but 35% in neonates (Fig. 2-4, p.27, 29-30). However, this discrepancy in GFP fluorescence intensity could not be held solely responsible for the absence of LRC in neonates. Indeed, we calculated that the clearance rate of GFP^{hi} and GFP⁺ TECs was significantly more rapid in young than in adult mice (Fig. 6 and Table I, p.26 and 34). Accordingly, a plausible explanation for the absence of LRC in neonates would be that the mitotic behavior of TEC progenitor/stem cells is similar to that of HSCs. Thus, mouse HSCs are actively proliferating until three weeks after birth, at which time they abruptly switch to become a predominantly quiescent population (24, 25). Hence, by contrast to adult HSCs, neonatal HSCs are not LRC.

One notable point with neonatal TECs is that the cTEC/mTEC ratio changed dramatically during the first weeks of life: the number of mTECs steadily increased from birth to seven weeks whereas the number of cTECs showed a dramatic decrease between week one and week three (Fig. 1A,B, p.25). The discrepancies in the population dynamics of cTECs and mTECs cannot be explained by differences in apoptosis (Fig. 1C, p.25) or proliferation rates (Fig. 2A-C, Table I, p.26-27). One salient observation is that the total GFP content of mTECs increased from birth to week one. This means that during this period, mTECs were not in a closed compartment. They received some input of GFP⁺ cells that did not express mTEC markers at the beginning of the chase period. In theory, GFP⁺ cells that join the mTEC compartment during this period could be thymic or extrathymic cells. However, recent reports

have revealed that the majority of mTECs are derived from $\beta 5t$ -expressing precursor cells (49) and that embryonic TECs expressing the cTEC marker CD205 give rise to both cTECs and mTECs in reaggregate thymus organ cultures (48). Hence, our favorite hypothesis to explain the increase in mTEC total GFP content at week one (Fig. 2D, p.27) and the decrease of cTECs number at 3 weeks (Fig. 1B, p.25) is that cells with a cTEC phenotype ($Ly51^{+}UEA1^{-}$) at T0 acquire an mTEC phenotype ($Ly51^{-}UEA1^{+}$) during the neonatal period.

Two major points can be made from our observations in adult mice. First, both cTECs and mTECs proliferate more actively in females than males. This observation is consistent with the fact that following cTEC depletion in adult *Ccx-ckr1:hDTR* transgenic mice, restoration of thymopoietic activity (and presumably cTEC regeneration) was observed in females but not males (10). Moreover, thymic involution in mice and humans is more precocious in males than females (50-52). Further studies are warranted to decipher the mechanisms responsible for this sexual dimorphism. Androgens may have a direct effect on the thymus by affecting TEC metabolism or an indirect effect mediated, for instance, by changes in the microbiota which can enhance production of cytokines (such as $IFN-\gamma$) (10,53). Second, LRC are present in adult TECs. In females, LRC are found exclusively in the cTEC compartment. Based on their relatively small cell size, low expression of *p16INK4a*, *p19ARF* and *Serpine1*, and high expression of *Bmi1*, *Foxn1*, *Trp63* and *Wnt4*, we conclude that female cTEC LRC are not senescent post-mitotic cells and may well be TEC progenitors. They also express higher levels of $\beta 5T$ than other TECs, which further support the hypothesis that LRC would be progenitor TECs (49). To address to issue, our plan is to perform reaggregation and transplantation experiments along with transcriptome sequencing of female and male TEC LRC. Assuming that TEC LRC may represent adult TEC progenitor/stem cells, their transcriptomic analysis could provide us with novel insights into their functional potential and allow us to discover surface markers specific for this cell subset.

Acknowledgement

We are grateful to Juan Ruiz Vanegas, Danièle Gagné and Gaël Dulude (flow cytometry and cell sorting), Nadine Fradet and Jennifer Huber (qRT-PCR experiments) and to the staff of IRIC animal care facility for their assistance. Special thanks to Sébastien Lemieux for advice on statistical analyses.

Footnotes

This work was supported by grant MOP 42384 from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). M.D.L. is supported by a CIHR studentship and C.P. holds a Canada Research Chair in Immunobiology. The Institute for Research in Immunology and Cancer is supported in part by the Canada Foundation for Innovation and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

References

1. Dixit, V. D. 2010. Thymic fatness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging. *Curr. Opin. Immunol.* 22: 521-528.
2. Dooley, J., and A. Liston. 2012. Molecular control over thymic involution: From cytokines and microRNA to aging and adipose tissue. *Eur. J Immunol.* 42: 1073-1079.
3. Montecino-Rodriguez, E., B. Berent-Maoz, and K. Dorshkind. 2013. Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *J Clin. Invest* 123: 958-965.
4. Boehm, T., and J. B. Swann. 2013. Thymus involution and regeneration: two sides of the same coin? *Nat Rev Immunol* 13.
5. Lynch, H. E., G. L. Goldberg, A. Chidgey, M. R. van den Brink, R. Boyd, and G. D. Sempowski. 2009. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol.* 30: 366-373.
6. Sempowski, G. D., L. P. Hale, J. S. Sundry, J. M. Massey, R. A. Koup, D. C. Douek, D. D. Patel, and B. F. Haynes. 2000. Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. *J. Immunol.* 164: 2180-2187.
7. Dixit, V. D. 2012. Impact of immune-metabolic interactions on age-related thymic demise and T cell senescence. *Semin. Immunol* 24: 321-330.
8. Ventevogel, M. S., and G. D. Sempowski. 2013. Thymic rejuvenation and aging. *Curr. Opin. Immunol.* 25: 516-522.
9. Gray, D. H., N. Seach, T. Ueno, M. K. Milton, A. Liston, A. M. Lew, C. C. Goodnow, and R. L. Boyd. 2006. Developmental kinetics, turnover and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* 108: 3777-3785.
10. Rode, I., and T. Boehm. 2012. Regenerative capacity of adult cortical thymic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109: 3463-3468.

11. Anderson, G., E. J. Jenkinson, and H. R. Rodewald. 2009. A roadmap for thymic epithelial cell development. *Eur. J Immunol* 39: 1694-1699.
12. Shakib, S., G. E. Desanti, W. E. Jenkinson, S. M. Parnell, E. J. Jenkinson, and G. Anderson. 2009. Checkpoints in the development of thymic cortical epithelial cells. *J. Immunol.* 182: 130-137.
13. Griffith, A. V., M. Fallahi, T. Venables, and H. T. Petrie. 2012. Persistent degenerative changes in thymic organ function revealed by an inducible model of organ regrowth. *Aging Cell* 11: 169-177.
14. Rossi, S. W., W. E. Jenkinson, G. Anderson, and E. J. Jenkinson. 2006. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature* 441: 988-991.
15. Bleul, C. C., T. Corbeaux, A. Reuter, P. Fisch, J. Schulte Mönting, and T. Boehm. 2006. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* 441: 992-996.
16. Van Keymeulen, A., A. S. Rocha, M. Ousset, B. Beck, G. Bouvencourt, J. Rock, N. Sharma, S. Dekoninck, and C. Blanpain. 2011. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* 479: 189-193.
17. Snippert, H. J., and H. Clevers. 2011. Tracking adult stem cells. *EMBO Rep.* 12: 113-122.
18. Tumber, T., G. Guasch, V. Greco, C. Blanpain, W. E. Lowry, M. Rendl, and E. Fuchs. 2004. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 303: 359-363.
19. Wilson, A., E. Laurenti, G. Oser, R. C. van der Wath, W. Blanco-Bose, M. Jaworski, S. Offner, C. F. Dunant, L. Eshkind, E. Bockamp, P. Lio, H. R. MacDonald, and A. Trumpp. 2008. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135: 1118-1129.
20. Foudi, A., K. Hochedlinger, B. D. Van, J. W. Schindler, R. Jaenisch, V. Carey, and H. Hock. 2009. Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol.* 27: 84-90.

21. Biteau, B., C. E. Hochmuth, and H. Jasper. 2011. Maintaining tissue homeostasis: dynamic control of somatic stem cell activity. *Cell Stem Cell* 9: 402-411.
22. Barker, N., O. A. van, and H. Clevers. 2012. Identifying the stem cell of the intestinal crypt: strategies and pitfalls. *Cell Stem Cell* 11: 452-460.
23. Doupe, D. P., M. P. Alcolea, A. Roshan, G. Zhang, A. M. Klein, B. D. Simons, and P. H. Jones. 2012. A single progenitor population switches behavior to maintain and repair esophageal epithelium. *Science* 337: 1091-1093.
24. Bowie, M. B., K. D. McKnight, D. G. Kent, L. McCaffrey, P. A. Hoodless, and C. J. Eaves. 2006. Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *J. Clin. Invest.* 116: 2808-2816.
25. Bowie, M. B., D. G. Kent, B. Dykstra, K. D. McKnight, L. McCaffrey, P. A. Hoodless, and C. J. Eaves. 2007. Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 5878-5882.
26. Beard, C., K. Hochedlinger, K. Plath, A. Wutz, and R. Jaenisch. 2006. Efficient method to generate single-copy transgenic mice by site-specific integration in embryonic stem cells. *Genesis*. 44: 23-28.
27. Centlivre, M., X. Zhou, S. M. Pouw, K. Weijer, W. Kleibeuker, A. T. Das, B. Blom, J. Seppen, B. Berkhout, and N. Legrand. 2010. Autoregulatory lentiviral vectors allow multiple cycles of doxycycline-inducible gene expression in human hematopoietic cells in vivo. *Gene Ther.* 17: 14-25.
28. Cawthorne, C., R. Swindell, I. J. Stratford, C. Dive, and A. Welman. 2007. Comparison of doxycycline delivery methods for Tet-inducible gene expression in a subcutaneous xenograft model. *J Biomol. Tech.* 18: 120-123.
29. St-Pierre, C., S. Brochu, J. R. Vanegas, M. Dumont-Lagace, S. Lemieux, and C. Perreault. 2013. Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Sci. Rep.* 3: 1860.

30. Louis, I., K. Heinonen, J. Chagraoui, S. Vainio, G. Sauvageau, and C. Perreault. 2008. The signaling protein Wnt4 enhances thymopoiesis and expands multipotent hematopoietic progenitors through β -catenin-independent signaling. *Immunity* 29: 57-67.
31. Baron, C., R. Somogyi, L. D. Greller, V. Rineau, P. Wilkinson, C. R. Cho, M. J. Cameron, D. J. Kelvin, P. Chagnon, D. C. Roy, L. Busque, R. P. Sékaly, and C. Perreault. 2007. Prediction of graft-versus-host disease in humans by donor gene expression profiling. *PLoS Med.* 4: e23.
32. Waghmare, S. K., R. Bansal, J. Lee, Y. V. Zhang, D. J. McDermitt, and T. Tumber. 2008. Quantitative proliferation dynamics and random chromosome segregation of hair follicle stem cells. *EMBO J* 27: 1309-1320.
33. Brennand, K., D. Huangfu, and D. Melton. 2007. All beta cells contribute equally to islet growth and maintenance. *PLoS Biol.* 5: e163.
34. Rigamonti, A., K. Brennand, F. Lau, and C. A. Cowan. 2011. Rapid cellular turnover in adipose tissue. *PLoS One* 6: e17637.
35. Chakkalakal, J. V., K. M. Jones, M. A. Basson, and A. S. Brack. 2012. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature* 490: 355-360.
36. Orford, K. W., and D. T. Scadden. 2008. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet.* 9: 115-128.
37. Rodier, F., and J. Campisi. 2011. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* 192: 547-556.
38. Gray, D., J. Abramson, C. Benoist, and D. Mathis. 2007. Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J. Exp. Med.* 204: 2521-2528.
39. Baker, D. J., T. Wijshake, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, B. G. Childs, B. van de Sluis, J. L. Kirkland, and J. M. van Deursen. 2011. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479: 232-236.

40. Kortlever, R. M., P. J. Higgins, and R. Bernards. 2006. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol.* 8: 877-884.
41. Kuilman, T., C. Michaloglou, W. J. Mooi, and D. S. Peeper. 2010. The essence of senescence. *Genes Dev.* 24: 2463-2479.
42. Balciunaite, G., M. P. Keller, E. Balciunaite, L. Piali, S. Zuklys, Y. D. Mathieu, J. Gill, R. Boyd, D. J. Sussman, and G. A. Hollander. 2002. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat. Immunol.* 3: 1102-1108.
43. Senoo, M., F. Pinto, C. P. Crum, and F. McKeon. 2007. p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell* 129: 523-536.
44. Chen, L., S. Xiao, and N. R. Manley. 2009. Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood* 113: 567-574.
45. Corbeaux, T., I. Hess, J. B. Swann, B. Kanzler, A. Haas-Assenbaum, and T. Boehm. 2010. Thymopoiesis in mice depends on a Foxn1-positive thymic epithelial cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107: 16613-16618.
46. Guo, Y., M. Miyazaki, M. Itoi, R. Satoh, A. Iwama, T. Amagai, H. Kawamoto, and M. Kanno. 2011. Polycomb group gene Bmi1 plays a role in the growth of thymic epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* 41: 1098-1107.
47. Heinonen, K. M., V. J. Ruiz, S. Brochu, J. Shan, S. J. Vainio, and C. Perreault. 2011. Wnt4 regulates thymic cellularity through the expansion of thymic epithelial cells and early thymic progenitors. *Blood* 118: 5163-5173.
48. Baik, S., E. J. Jenkinson, P. J. Lane, G. Anderson, and W. E. Jenkinson. 2013. Generation of both cortical and Aire(+) medullary thymic epithelial compartments from CD205(+) progenitors. *Eur. J Immunol.* 43: 589-594.
49. Ohigashi, I., S. Zuklys, M. Sakata, C. E. Mayer, S. Zhanybekova, S. Murata, K. Tanaka, G. A. Hollander, and Y. Takahama. 2013. Aire-expressing thymic medullary epithelial cells originate from beta5t-expressing progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 110: 9885-9890.

50. Mitchell, W. A., P. O. Lang, and R. Aspinall. 2010. Tracing thymic output in older individuals. *Clin. Exp Immunol* 161: 497-503.
51. Ackman, J. B., B. Kovacina, B. W. Carter, C. C. Wu, A. Sharma, J. A. Shepard, and E. F. Halpern. 2013. Sex difference in normal thymic appearance in adults 20-30 years of age. *Radiology* 268: 245-253.
52. Gui, J., L. M. Mustachio, D. M. Su, and R. W. Craig. 2012. Thymus size and age-related thymic involution: early programming, sexual dimorphism, progenitors and stroma. *Aging Dis.* 3: 280-290.
53. Yurkovetskiy, L., M. Burrows, A. A. Khan, L. Graham, P. Volchkov, L. Becker, D. Antonopoulos, Y. Umesaki, and A. V. Chervonsky. 2013. Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota. *Immunity* 39: 400-412.

4. Discussion

Nous avons utilisé un modèle de souris transgénique exprimant H2B-GFP sous le contrôle du promoteur inductible rtTA (74, 79) afin de déterminer si l'épithélium thymique contenait des cellules quiescentes chez les souris jeunes et adultes. Ces cellules représenteraient de potentielles cellules souches de l'épithélium thymique puisque les cellules souches chez l'adulte sont quiescentes dans plusieurs tissus. En comparant les thymus des souris jeunes et adultes, nous avons obtenu trois résultats importants : (1) les TECs prolifèrent beaucoup plus rapidement chez les souris jeunes que chez les adultes; (2) les mTECs et les cTECs ont un taux de prolifération similaire chez les jeunes souris alors que les mTECs se divisent plus rapidement que les cTECs chez les adultes (Table 1, p.28) et (3) le thymus adulte, mais pas le thymus néo-natal, contient des LRC (Figure 3-5, p.29-30 et 33). Celles-ci expriment des marqueurs spécifiques aux cTECs et n'expriment pas de marqueurs de sénescence. De plus, nous avons montré que chez l'adulte, les TECs prolifèrent environ deux fois plus rapidement chez les femelles que chez les mâles. Ces résultats montrent le grand dynamisme des populations épithéliales thymiques tout au long de la vie d'un individu et aident à comprendre les processus de croissance et de vieillissement du thymus.

Dans les prochaines sections, je discuterai des implications et des perspectives que ces découvertes amènent. Il est à noter que les figures mentionnées dans la discussion réfèrent aux figures de l'article.

4.1 La force de l'âge : ce qui diffère entre jeunes et adultes.

L'involution thymique qui se produit avec l'âge est un phénomène complexe, influencé par plusieurs facteurs (voir section 1.3.3. L'épithélium thymique : renouvellement et régénération, p. 8). La morphologie du thymus varie grandement tout au long de la vie d'un individu, avec l'accumulation progressive de cellules adipeuses et fibroblastiques dans le

stroma thymique et la diminution de la cellularité globale de l'organe (11). Afin de bien comprendre le vieillissement tissulaire, et plus particulièrement l'impact du vieillissement sur les cellules épithéliales thymiques, nous devons d'abord comprendre les mécanismes sous-jacents au développement thymique et ainsi qu'à sa dégénérescence progressive.

À la naissance, l'épithélium thymique est majoritairement composé de cTECs, mais rapidement les mTECs deviennent la population prédominante (Figure 1, p.25) (11). Étonnamment, le nombre de cTECs diminue entre la première et la troisième semaine après la naissance, et cette diminution ne peut être expliquée par une apoptose préférentielle ou une trop faible prolifération des cTECs (Figures 1 et 2, p.27 et 29). Où se retrouvent donc ces cellules «perdues» si elles ne sont pas mortes ? Une des explications possibles est la différenciation d'une sous-population des cTECs en un autre type cellulaire qui ne contribueraient donc plus à l'index du contenu en GFP de la population des cTECs. D'autre part, l'index du contenu en GFP des mTECs augmente de la naissance à une semaine d'âge, montrant un apport en nouvelles cellules dans la population des mTECs pendant cette période (Figure 2, p. 27). Ces résultats nous laissent penser qu'il pourrait y avoir différenciation des cTECs en mTECs pendant les premières semaines de vie. Cette hypothèse est soutenue par des travaux précédents montrant que les TECs dérivent toutes de progéniteurs exprimant des marqueurs spécifiques aux cTECs, soit $\beta 5t$ (aussi connu comme PSMB11), IL-7 ou encore CD205 (19, 41–44). De plus, l'index du contenu en GFP des cTECs diminue d'autant que celui des mTECs augmente et globalement, il n'y a pas de perte significative du contenu en GFP dans l'épithélium thymique pendant cette période (Figure 2D, p.27). Ce scénario expliquerait à la fois l'augmentation du contenu en GFP des mTECs et la diminution du nombre de cTECs. Il se pourrait également que certaines cTECs continuent de se différencier en mTECs pendant l'âge adulte, mais moins fréquemment. La mort cellulaire et la dégradation protéique normale de la protéine fluorescente (H2B-GFP) rendent cependant ce phénomène indétectable par notre technique. Toutefois, nous ne pouvons exclure l'hypothèse (certes moins probable) que des cellules n'étant pas catégorisées comme des TECs par notre méthode, i.e. EpCAM⁻, contribuent à l'augmentation du contenu en GFP de mTECs en se différenciant en TECs pendant la première semaine.

Il a été montré précédemment qu'il y avait une diminution du nombre de cellules en division (Ki67⁺) avec l'âge (11), résultats que nous avons reproduits avec un modèle expérimental différent (Table I, p.28). Cependant, nous avons démontré pour la première fois que les cTECs prolifèrent environ trois fois plus lentement que les mTECs chez les adultes, alors que les deux populations prolifèrent à la même vitesse dans le thymus néo-natal (Table I, p.28). Pourquoi une telle dichotomie entre jeunes et adultes ? Si le compartiment des cTECs fournit bel et bien des cellules au compartiment des mTECs pendant la première semaine de vie, il est probable que les cTECs prolifèrent activement afin de supporter la croissance du tissu, mais que dans le thymus adulte, ce phénomène serait grandement réduit, voire stoppé, puisque le tissu n'est plus en croissance. Cela expliquerait la diminution de la prolifération des TECs observée. Ces disparités entre jeunes et adultes montrent que le *turnover* des TECs néo-natales et adultes est différent et que l'âge des souris doit être pris en considération dans les études sur le thymus.

Un autre fait intéressant est que le thymus adulte contient des cellules quiescentes, alors que le thymus des jeunes souris n'en contient pas. Considérant que les cellules quiescentes de l'épithélium thymique représentent de potentielles cellules souches thymiques, une explication plausible pour cette divergence est que les progéniteurs de l'épithélium thymique se comporteraient comme les HSCs pendant le stade néo-natal. En effet, les HSCs passent d'un phénotype hautement prolifératif pendant le développement embryonnaire à un phénotype quiescent chez l'adulte, et ce, seulement à partir de 3 semaines d'âge (85, 86). Toutefois, notre modèle expérimental ne permet pas de déterminer directement si les LRC détectées dans le thymus adulte sont bel et bien des cellules souches. Il est donc primordial de caractériser davantage ces cellules.

4.2 Les LRC sont-elles des cellules souches ?

Les cTECs contiennent une population, qu'on appellera LRC, qui ne s'est pas divisée ou s'est divisée seulement une fois pendant une période *chase* de 16 semaines (Figure 3-4,

p.29-30). Afin de déterminer si ces LRC sont de potentielles cellules souches ou simplement des cellules post-mitotiques différenciées, nous avons voulu déterminer si elles sont quiescentes ou sénescents. Les LRC sont plus petites que les autres cTECs et sont aussi beaucoup plus petites que les mTEC^{hi}, qui sont des cellules dites matures (Figure 5A, p.33). Cela suggère que les LRC ne sont pas sénescents, puisque les cellules sénescents sont habituellement plus grosses que leurs équivalents non-sénescents (87). De plus, les LRC n'expriment pas de gènes associées à la sénescence (Figure 5B, p.33); ce qui suggère fortement qu'elles sont quiescentes. Il reste toutefois à démontrer que ces cellules sont encore aptes à proliférer. Pour ce faire, nous observerons la localisation des LRC dans le thymus. Si nous observons des doublets de LRC (deux cellules H2B-GFP⁺ qui sont collées l'une à l'autre), il y a de fortes chances que ces cellules soit capable de proliférer. De plus, nous voulons faire des essais de clonogénicité in vitro et in vivo, ce qui montrera sans équivoque leur capacité à proliférer. Enfin, nous avons montré que les LRC surexprimaient *Foxn1*, *Wnt4*, *Trp63* et *Bmi1*, gènes impliqués dans le développement et le renouvellement du thymus, dont l'absence induit une atrophie thymique (34, 37, 88–91), comparativement aux cTECs GFP⁻ (non-LRC) et aux mTECs (Figure 5C, p.33). Ce résultat suggère que les LRC pourraient bel et bien être les cellules progénitrices de l'épithélium thymique.

Comme l'identité des progéniteurs thymiques est encore incertaine, nous avons cherché à savoir si les LRC possèdent un phénotype proche de celui des cTECs ou un phénotype mixte i.e. exprimant à la fois des marqueurs de cTECs et de mTECs. De fait, les LRC n'expriment pas de marqueurs de mTECs et surexpriment même les marqueurs de cTECs comparé aux cTECs non-LRC (Figure 5D, p.33). Si les LRC s'avèrent être les cellules souches de l'épithélium thymique, ces observations supportent l'hypothèse selon laquelle les progéniteurs de TECs seraient des cTECs et non des cellules au phénotype mixte comme le proposaient les premiers modèles (voir section 1.3.2. Modèles actuels des voies de différenciation des TECs, p.5). De plus, les mTECs dérivant de cellules exprimant PSMB11, la forte expression de PSMB11 par les LRC renforce l'hypothèse selon laquelle les LRC seraient des cellules progénitrices.

Afin de confirmer que les LRC sont bien des cellules souches, nous planifions analyser le profil d'expression génique des LRC (cTECs GFP^{hi}) par séquençage d'ARN de nouvelle

génération et le comparer à celui des cTECs non-LRC (GFP⁻). Cela nous permettra d'évaluer l'expression de plusieurs gènes spécifiquement surexprimés ou sous-exprimés dans les cellules souches d'autres tissus (76). Nous pourrions également trouver des marqueurs spécifiques pour les LRC, ce qui faciliterait leur purification. Cependant, l'analyse de l'expression génique n'est pas suffisante pour prouver leur nature de cellules souches. C'est pourquoi nous ferons des essais de clonogénicité *in vivo* par culture d'organe thymique par réagrégation (RTOC, *reaggregate thymic organ culture*) et par culture *in vitro*. Nous pourrions également faire des essais de différenciation *in vitro* par stimulation au RANKL afin d'évaluer la capacité des LRC à se différencier en mTECs (45).

4.3 Dimorphisme sexuel des TECs

Le thymus est grandement influencé par les hormones sexuelles (voir section 1.3.3. L'épithélium thymique : renouvellement et régénération, p.8), et ce, même en conditions physiologiques. En effet, le déclin de la cellularité du thymus avec l'âge est plus rapide chez les mâles que les femelles (92). Pour ces raisons, nous avons analysé la cinétique de dilution de la H2B-GFP chez les souris adultes en comparant les mâles et les femelles. Nos résultats montrent que les TECs chez l'adulte prolifèrent environ deux fois plus rapidement chez les femelles que chez les mâles (Table I, Figures 3 et 4, p.28, 31 et 32).

Plusieurs facteurs pourraient causer ces disparités, par exemple les hormones sexuelles, le métabolisme, la présence ou l'absence du chromosome Y. Les hormones sexuelles influencent la prolifération cellulaire dans plusieurs tissus, et ce, de façon différente selon le type cellulaire, le sexe et l'âge de l'individu (93–97). Il a également été montré que les estrogènes augmentaient la capacité d'auto-renouvellement des HSCs (98). Il est donc plausible que les hormones affectent la prolifération des TECs. Cependant, l'effet des hormones sexuelles peut également être indirect. Ainsi, en conditions normales, les cellules en prolifération dans la glande mammaire ne sont pas celles qui expriment les récepteurs d'estrogène ou de progestérone, mais plutôt celles situées en proximité directe des cellules en

prolifération (99). Un phénomène similaire se produirait pendant le développement urogénital chez les mâles, où les hormones sexuelles mâles induiraient la sécrétion de facteurs de croissance par les cellules mésenchymateuses environnantes, qui à leur tour influenceraient les cellules épithéliales du tractus urogénital (100, 101). Enfin, les hormones affectent divers processus, comme le métabolisme (102) ou la flore intestinale (103), qui peuvent mener à la sécrétion de cytokines qui pourraient affecter à leur tour le thymus.

Ces observations mènent aux trois questions suivantes : (1) la prolifération des TECs est-elle directement affectées par les hormones sexuelles ? (2) À quel point les hormones sexuelles influencent-elles l'involution thymique ? (3) Les hormones sexuelles affectent-elles la fonction des TECs ? Pour répondre à ces questions, nous analyserons le transcriptome des TECs au cours de l'involution thymique, soit à l'âge de 6 mois, dans trois conditions différentes : chez des femelles, chez des mâles et chez des mâles castrés avant leur puberté et qui n'auront donc jamais été exposés à de grandes concentrations d'androgènes. Nous pourrions ainsi évaluer l'effet des androgènes en comparant les transcriptomes des souris mâles castrées et non castrées. Nous pourrions également évaluer l'effet du contenu chromosomique différent et de la présence d'estrogènes en comparant les femelles aux mâles. Ces analyses transcriptomiques nous renseigneront sur les voies de signalisation qui sont différentiellement activées selon les sexes. Nous évaluerons également la fonctionnalité des TECs dans les trois groupes expérimentaux en comparant l'expression de molécules connues pour être impliquées dans la maturation des thymocytes et l'attraction des cellules progénitrices des thymocytes (*early thymic progenitor*), ainsi que l'expression des antigènes tissus-spécifiques par les mTECs. Enfin, nous analyserons les profils phénotypiques, les nombres et proportions de cellules des différentes populations du thymus, soit les thymocytes, les cellules stromales mésenchymateuses et les cellules épithéliales, chez des souris mâles, femelles et mâles castrés. Enfin, nous analyserons l'impact des androgènes sur la prolifération cellulaire des TECs en effectuant une analyse de la dilution de H2B-GFP dans des souris castrées adultes. Ces analyses nous permettront de mieux comprendre l'impact des hormones et du sexe sur l'homéostasie du thymus à l'âge adulte.

5. Conclusion et perspectives

Le thymus est essentiel au développement d'un système immunitaire adaptatif fonctionnel et son déclin avec l'âge mène à une plus grande susceptibilité aux cancers et aux infections chez les personnes vieillissantes. Afin de mieux comprendre ce phénomène d'atrophie thymique liée à l'âge, nous avons cherché à identifier les cellules souches ou progénitrices de l'épithélium thymique chez l'adulte, cellules responsables du renouvellement et de la régénération du tissu. Pour ce faire, nous avons utilisé une souris transgénique permettant d'isoler les cellules quiescentes d'un tissu, ce qui nous a permis de découvrir pour la première fois de potentielles cellules souches de l'épithélium thymique chez l'adulte. Si ces cellules s'avèrent bel et bien être des cellules souches, il sera intéressant de développer une méthode permettant leur expansion *in vitro* afin d'éventuellement pouvoir reconstituer un thymus fonctionnel. Cette procédure rendrait possible l'établissement d'une tolérance centrale des lymphocytes T contre les antigènes du donneur chez le receveur d'une greffe par exemple, ou encore pourrait permettre la reconstitution du système immunitaire chez les patients infectés par le VIH. De plus, mieux comprendre le fonctionnement et les voies de régulation de la prolifération des cellules souches thymiques pourraient mener à d'éventuels traitements permettant la prévention ou le renversement de l'involution thymique.

Finalement, nous avons étudié les cinétiques de prolifération des TECs chez les souris post-natales et adultes afin de mieux comprendre les processus de développement et d'involution du thymus. Nos résultats démontrent l'importance de prendre en considération le sexe et l'âge des sujets dans les études sur le thymus, puisque le thymus est en continuel changement tout au long de la vie d'un individu et est influencé par de nombreux facteurs, tels que les infections, le stress, le métabolisme et les hormones sexuelles.

Bibliographie

1. Davis, M. M., M. Krogsgaard, M. Huse, J. Huppa, B. F. Lillemeier, and Q. Li. 2007. T Cells as a Self-Referential, Sensory Organ. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 681–695.
2. Gameiro, J., P. Nagib, and L. Verinaud. 2010. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. *Cell Adhes. Migr.* 4: 382–390.
3. Dzhagalov, I., and H. Phee. 2012. How to find your way through the thymus: a practical guide for aspiring T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 69: 663–682.
4. Takahama, Y. 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 127–135.
5. Steinmann, G. G., B. Klaus, and H. K. Müller-Hermelink. 1985. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand. J. Immunol.* 22: 563–575.
6. Dooley, J., and A. Liston. 2012. Molecular control over thymic involution: From cytokines and microRNA to aging and adipose tissue. *Eur. J. Immunol.* 42: 1073–1079.
7. Dorshkind, K., E. Montecino-Rodriguez, and R. A. J. Signer. 2009. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat. Rev. Immunol.* 9: 57–62.
8. McElhaney, J. E., and R. B. Effros. 2009. Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? *Curr. Opin. Immunol.* 21: 418–424.
9. Lynch, H. E., G. L. Goldberg, A. Chidgey, M. R. M. Van den Brink, R. Boyd, and G. D. Sempowski. 2009. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol.* 30: 366–373.
10. Montecino-Rodriguez, E., B. Berent-Maoz, and K. Dorshkind. 2013. Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *J. Clin. Invest.* 123: 958–965.
11. Gray, D. H. D., N. Seach, T. Ueno, M. K. Milton, A. Liston, A. M. Lew, C. C. Goodnow, and R. L. Boyd. 2006. Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* 108: 3777–3785.
12. Holländer, G. A., W. Krenger, and B. R. Blazar. 2010. Emerging strategies to boost thymic function. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10: 443–453.

13. Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2003. Positive and Negative Selection of T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 139–176.
14. Anderson, G., and E. J. Jenkinson. 2001. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 31–40.
15. Gäbler, J., J. Arnold, and B. Kyewski. 2007. Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* 37: 3363–3372.
16. Alves, N. L., Y. Takahama, I. Ohigashi, A. R. Ribeiro, S. Baik, G. Anderson, and W. E. Jenkinson. 2014. Serial progression of cortical and medullary thymic epithelial microenvironments. *Eur. J. Immunol.* 44: 16–22.
17. Gray, D. H. D., A. P. Chidgey, and R. L. Boyd. 2002. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 260: 15–28.
18. Gray, D., J. Abramson, C. Benoist, and D. Mathis. 2007. Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J. Exp. Med.* 204: 2521–2528.
19. Hamazaki, Y., H. Fujita, T. Kobayashi, Y. Choi, H. S. Scott, M. Matsumoto, and N. Minato. 2007. Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin. *Nat. Immunol.* 8: 304–311.
20. Metzger, T. C., I. S. Khan, J. M. Gardner, M. L. Mouchess, K. P. Johannes, A. K. Krawisz, K. M. Skrzypczynska, and M. S. Anderson. Lineage Tracing and Cell Ablation Identify a Post-Aire-Expressing Thymic Epithelial Cell Population. *Cell Rep.* .
21. Bennett, A. R., A. Farley, N. F. Blair, J. Gordon, L. Sharp, and C. C. Blackburn. 2002. Identification and Characterization of Thymic Epithelial Progenitor Cells. *Immunity* 16: 803–814.
22. Rossi, S. W., W. E. Jenkinson, G. Anderson, and E. J. Jenkinson. 2006. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature* 441: 988–991.
23. Gill, J., M. Malin, G. A. Holländer, and R. Boyd. 2002. Generation of a complete thymic microenvironment by MTS24+ thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* 3: 635–642.
24. Bleul, C. C., T. Corbeaux, A. Reuter, P. Fisch, J. S. Mönning, and T. Boehm. 2006. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* 441: 992–996.

25. Klug, D. B., C. Carter, E. Crouch, D. Roop, C. J. Conti, and E. R. Richie. 1998. Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 11822–11827.
26. Manley, N. R., and M. R. Capecchi. 1995. The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid. *Development* 121: 1989–2003.
27. Gordon, J., V. A. Wilson, N. F. Blair, J. Sheridan, A. Farley, L. Wilson, N. R. Manley, and C. C. Blackburn. 2004. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat. Immunol.* 5: 546–553.
28. Nowell, C. S., N. Bredenkamp, S. Tetelin, X. Jin, C. Tischner, H. Vaidya, J. M. Sheridan, F. H. Stenhouse, R. Heussen, A. J. H. Smith, and C. C. Blackburn. 2011. Foxn1 Regulates Lineage Progression in Cortical and Medullary Thymic Epithelial Cells But Is Dispensable for Medullary Sublineage Divergence. *PLoS Genet.* 7.
29. Nehls, M., B. Kyewski, M. Messerle, R. Waldschütz, K. Schüddekopf, A. J. Smith, and T. Boehm. 1996. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* 272: 886–889.
30. Gordon, J., and N. R. Manley. 2011. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development* 138: 3865–3878.
31. Rodewald, H.-R. 2008. Thymus Organogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 355–388.
32. Blackburn, C. C., C. L. Augustine, R. Li, R. P. Harvey, M. A. Malin, R. L. Boyd, J. F. Miller, and G. Morahan. 1996. The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 5742–5746.
33. Zook, E. C., P. A. Krishack, S. Zhang, N. J. Zeleznik-Le, A. B. Firulli, P. L. Witte, and P. T. Le. 2011. Overexpression of Foxn1 attenuates age-associated thymic involution and prevents the expansion of peripheral CD4 memory T cells. *Blood* 118: 5723–5731.
34. Chen, L., S. Xiao, and N. R. Manley. 2009. Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood* 113: 567–574.
35. Zhang, Z., P. Burnley, B. Coder, and D.-M. Su. 2012. Insights on Foxn1 Biological Significance and Usages of the “Nude” Mouse in Studies of T-Lymphopoiesis. *Int. J. Biol. Sci.* 8: 1156–1167.
36. Bredenkamp, N., C. S. Nowell, and C. C. Blackburn. 2014. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development* 141: 1627–1637.

37. Balciunaite, G., M. P. Keller, E. Balciunaite, L. Piali, S. Zuklys, Y. D. Mathieu, J. Gill, R. Boyd, D. J. Sussman, and G. A. Holländer. 2002. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat. Immunol.* 3: 1102–1108.
38. Bleul, C. C., and T. Boehm. 2005. BMP Signaling Is Required for Normal Thymus Development. *J. Immunol.* 175: 5213–5221.
39. Klug, D. B., C. Carter, I. B. Gimenez-Conti, and E. R. Richie. 2002. Cutting Edge: Thymocyte-Independent and Thymocyte-Dependent Phases of Epithelial Patterning in the Fetal Thymus. *J. Immunol.* 169: 2842–2845.
40. Rodewald, H.-R., S. Paul, C. Haller, H. Bluethmann, and C. Blum. 2001. Thymus medulla consisting of epithelial islets each derived from a single progenitor. *Nature* 414: 763–768.
41. Shakib, S., G. E. Desanti, W. E. Jenkinson, S. M. Parnell, E. J. Jenkinson, and G. Anderson. 2009. Checkpoints in the Development of Thymic Cortical Epithelial Cells. *J. Immunol.* 182: 130–137.
42. Ripen, A. M., T. Nitta, S. Murata, K. Tanaka, and Y. Takahama. 2011. Ontogeny of thymic cortical epithelial cells expressing the thymoproteasome subunit $\beta 5t$. *Eur. J. Immunol.* 41: 1278–1287.
43. Alves, N. L., N. D. Huntington, J.-J. Mention, O. R.-L. Goff, and J. P. D. Santo. 2010. Cutting Edge: A Thymocyte-Thymic Epithelial Cell Cross-Talk Dynamically Regulates Intrathymic IL-7 Expression In Vivo. *J. Immunol.* 184: 5949–5953.
44. Fiorini, E., I. Ferrero, E. Merck, S. Favre, M. Pierres, S. A. Luther, and H. R. MacDonald. 2008. Cutting Edge: Thymic Crosstalk Regulates Delta-Like 4 Expression on Cortical Epithelial Cells. *J. Immunol.* 181: 8199–8203.
45. Baik, S., E. J. Jenkinson, P. J. L. Lane, G. Anderson, and W. E. Jenkinson. 2013. Generation of both cortical and Aire⁺ medullary thymic epithelial compartments from CD205⁺ progenitors. *Eur. J. Immunol.* 43: 589–594.
46. Ohigashi, I., S. Zuklys, M. Sakata, C. E. Mayer, S. Zhanybekova, S. Murata, K. Tanaka, G. A. Hollander, and Y. Takahama. 2013. Aire-expressing thymic medullary epithelial cells originate from $\beta 5t$ -expressing progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 9885–9890.
47. Ribeiro, A. R., P. M. Rodrigues, C. Meireles, J. P. D. Santo, and N. L. Alves. 2013. Thymocyte Selection Regulates the Homeostasis of IL-7-Expressing Thymic Cortical Epithelial Cells In Vivo. *J. Immunol.* 191: 1200–1209.

48. Sempowski, G. D., L. P. Hale, J. S. Sundry, J. M. Massey, R. A. Koup, D. C. Douek, D. D. Patel, and B. F. Haynes. 2000. Leukemia Inhibitory Factor, Oncostatin M, IL-6, and Stem Cell Factor mRNA Expression in Human Thymus Increases with Age and Is Associated with Thymic Atrophy. *J. Immunol.* 164: 2180–2187.
49. Sutherland, J. S., G. L. Goldberg, M. V. Hammett, A. P. Uldrich, S. P. Berzins, T. S. Heng, B. R. Blazar, J. L. Millar, M. A. Malin, A. P. Chidgey, and R. L. Boyd. 2005. Activation of Thymic Regeneration in Mice and Humans following Androgen Blockade. *J. Immunol.* 175: 2741–2753.
50. Yang, H., Y.-H. Youm, Y. Sun, J.-S. Rim, C. J. Galban, B. Vandanmagsar, and V. D. Dixit. 2009. Axin expression in thymic stromal cells contributes to an age-related increase in thymic adiposity and is associated with reduced thymopoiesis independently of ghrelin signaling. *J. Leukoc. Biol.* 85: 928–938.
51. Olsen, N. J., G. Olson, S. M. Viselli, X. Gu, and W. J. Kovacs. 2001. Androgen Receptors in Thymic Epithelium Modulate Thymus Size and Thymocyte Development. *Endocrinology* 142: 1278–1283.
52. Griffith, A. V., M. Fallahi, T. Venables, and H. T. Petrie. 2012. Persistent degenerative changes in thymic organ function revealed by an inducible model of organ regrowth. *Aging Cell* 11: 169–177.
53. Rode, I., and T. Boehm. 2012. Regenerative capacity of adult cortical thymic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: 3463–3468.
54. Anz, D., R. Thaler, N. Stephan, Z. Waibler, M. J. Trauscheid, C. Scholz, U. Kalinke, W. Barchet, S. Endres, and C. Bourquin. 2009. Activation of Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Causes Rapid Involution of the Thymus. *J. Immunol.* 182: 6044–6050.
55. Schmidlin, H., W. Dontje, F. Groot, S. J. Ligthart, A. D. Colantonio, M. E. Oud, E. J. Schilder-Tol, M. Spaargaren, H. Spits, C. H. Uittenbogaart, and B. Blom. 2006. Stimulated plasmacytoid dendritic cells impair human T-cell development. *Blood* 108: 3792–3800.
56. Démoulin, T., A. Abdallah, N. Kettaf, M.-L. Baron, C. Gerarduzzi, D. Gauchat, S. Gratton, and R.-P. Sékaly. 2008. Reversible Blockade of Thymic Output: An Inherent Part of TLR Ligand-Mediated Immune Response. *J. Immunol.* 181: 6757–6769.
57. Badowski, M., C. L. Shultz, Y. Eason, N. Ahmad, and D. T. Harris. The influence of intrinsic and extrinsic factors on immune system aging. *Immunobiology* .

58. Hoffman-Goetz, L., and S. Zajchowski. 1999. In vitro apoptosis of lymphocytes after exposure to levels of corticosterone observed following submaximal exercise. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 39: 269–274.
59. Domínguez-Gerpe, L., and M. Rey-Méndez. 1997. Time-course of the murine lymphoid tissue involution during and following stressor exposure. *Life Sci.* 61: 1019–1027.
60. Zoller, A. L., F. J. Schnell, and G. J. Kersh. 2007. Murine pregnancy leads to reduced proliferation of maternal thymocytes and decreased thymic emigration. *Immunology* 121: 207–215.
61. Kendall, M. D., and A. G. Clarke. 2000. The thymus in the mouse changes its activity during pregnancy: a study of the microenvironment. *J. Anat.* 197: 393–411.
62. Tibbetts, T. A., F. DeMayo, S. Rich, O. M. Conneely, and B. W. O'Malley. 1999. Progesterone receptors in the thymus are required for thymic involution during pregnancy and for normal fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 12021–12026.
63. Yang, H., Y.-H. Youm, and V. D. Dixit. 2009. Inhibition of Thymic Adipogenesis by Caloric Restriction Is Coupled with Reduction in Age-Related Thymic Involution. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183: 3040–3052.
64. Tilg, H., and A. R. Moschen. 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 772–783.
65. Gainsford, T., T. A. Willson, D. Metcalf, E. Handman, C. McFarlane, A. Ng, N. A. Nicola, W. S. Alexander, and D. J. Hilton. 1996. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 14564–14568.
66. Howard, J. K., G. M. Lord, G. Matarese, S. Vendetti, M. A. Ghatei, M. A. Ritter, R. I. Lechler, and S. R. Bloom. 1999. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J. Clin. Invest.* 104: 1051–1059.
67. Shanley, D. P., D. Aw, N. R. Manley, and D. B. Palmer. 2009. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. *Trends Immunol.* 30: 374–381.
68. Dowling, M. R., and P. D. Hodgkin. 2009. Why does the thymus involute? A selection-based hypothesis. *Trends Immunol.* 30: 295–300.
69. Mimeault, M., and S. K. Batra. 2006. Concise Review: Recent Advances on the Significance of Stem Cells in Tissue Regeneration and Cancer Therapies. *STEM CELLS* 24: 2319–2345.

70. Rando, T. A. 2006. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 441: 1080–1086.
71. Takizawa, H., R. R. Regoes, C. S. Boddupalli, S. Bonhoeffer, and M. G. Manz. 2011. Dynamic variation in cycling of hematopoietic stem cells in steady state and inflammation. *J. Exp. Med.* 208: 273–284.
72. Arai, F., and T. Suda. 2007. Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells in the Osteoblastic Niche. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1106: 41–53.
73. Wilson, A., E. Laurenti, G. Oser, R. C. van der Wath, W. Blanco-Bose, M. Jaworski, S. Offner, C. F. Dunant, L. Eshkind, E. Bockamp, P. Lió, H. R. MacDonald, and A. Trumpp. 2008. Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. *Cell* 135: 1118–1129.
74. Foudi, A., K. Hochedlinger, D. Van Buren, J. W. Schindler, R. Jaenisch, V. Carey, and H. Hock. 2009. Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 27: 84–90.
75. Fuchs, E., and V. Horsley. 2011. Ferreting out stem cells from their niches. *Nat. Cell Biol.* 13: 513–518.
76. Cheung, T. H., and T. A. Rando. 2013. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14.
77. Brittan, M., and N. A. Wright. 2002. Gastrointestinal stem cells. *J. Pathol.* 197: 492–509.
78. Doupé, D. P., M. P. Alcolea, A. Roshan, G. Zhang, A. M. Klein, B. D. Simons, and P. H. Jones. 2012. A Single Progenitor Population Switches Behavior to Maintain and Repair Esophageal Epithelium. *Science* 337: 1091–1093.
79. Tumber, T., G. Guasch, V. Greco, C. Blanpain, W. E. Lowry, M. Rendl, and E. Fuchs. 2004. Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin. *Science* 303: 359–363.
80. Wang, Y., A. Sacchetti, M. R. van Dijk, M. van der Zee, P. H. van der Horst, R. Joosten, C. W. Burger, J. A. Grootegoed, L. J. Blok, and R. Fodde. 2012. Identification of Quiescent, Stem-Like Cells in the Distal Female Reproductive Tract. *PLoS ONE* 7: e40691.
81. Patterson, A. L., and J. K. Pru. 2013. Long-term label retaining cells localize to distinct regions within the female reproductive epithelium. *Cell Cycle* 12: 2888–2898.
82. Chakkalakal, J. V., K. M. Jones, M. A. Basson, and A. S. Brack. 2012. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature* 490: 355–360.

83. Oliver, J. A., O. Maarouf, F. H. Cheema, C. Liu, Q.-Y. Zhang, C. Kraus, M. Zeeshan Afzal, M. Firdous, A. Klinakis, A. Efstratiadis, and Q. Al-Awqati. 2012. SDF-1 activates papillary label-retaining cells during kidney repair from injury. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 302: F1362–F1373.
84. Rigamonti, A., K. Brennand, F. Lau, and C. A. Cowan. 2011. Rapid Cellular Turnover in Adipose Tissue. *PLoS ONE* 6.
85. Bowie, M. B., K. D. McKnight, D. G. Kent, L. McCaffrey, P. A. Hoodless, and C. J. Eaves. 2006. Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *J. Clin. Invest.* 116: 2808–2816.
86. Bowie, M. B., D. G. Kent, B. Dykstra, K. D. McKnight, L. McCaffrey, P. A. Hoodless, and C. J. Eaves. 2007. Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 5878–5882.
87. Rodier, F., and J. Campisi. 2011. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* 192: 547–556.
88. Guo, Y., M. Miyazaki, M. Itoi, R. Satoh, A. Iwama, T. Amagai, H. Kawamoto, and M. Kanno. 2011. Polycomb group gene Bmi1 plays a role in the growth of thymic epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* 41: 1098–1107.
89. Heinonen, K. M., J. R. Vanegas, S. Brochu, J. Shan, S. J. Vainio, and C. Perreault. 2011. Wnt4 regulates thymic cellularity through the expansion of thymic epithelial cells and early thymic progenitors. *Blood* 118: 5163–5173.
90. Senoo, M., F. Pinto, C. P. Crum, and F. McKeon. 2007. p63 Is Essential for the Proliferative Potential of Stem Cells in Stratified Epithelia. *Cell* 129: 523–536.
91. Corbeaux, T., I. Hess, J. B. Swann, B. Kanzler, A. Haas-Assenbaum, and T. Boehm. 2010. Thymopoiesis in mice depends on a Foxn1-positive thymic epithelial cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 16613–16618.
92. Gui, J., L. M. Mustachio, D.-M. Su, and R. W. Craig. 2012. Thymus Size and Age-related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma. *Aging Dis.* 3: 280–290.
93. Lewis-Wambi, J. S., and V. C. Jordan. 2009. Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit? *Breast Cancer Res.* 11: 206.

94. Dubey, R. K., D. G. Gillespie, Z. Mi, M. Rosselli, P. J. Keller, and E. K. Jackson. 2000. Estradiol Inhibits Smooth Muscle Cell Growth in Part by Activating the cAMP-Adenosine Pathway. *Hypertension* 35: 262–266.
95. Lin, I. C., A. E. Slemper, C. Hwang, M. Sena-Esteves, H.-D. Nah, and R. E. Kirschner. 2007. Dihydrotestosterone stimulates proliferation and differentiation of fetal calvarial osteoblasts and dural cells and induces cranial suture fusion. *Plast. Reconstr. Surg.* 120: 1137–1147.
96. Tutton, P. J., and D. H. Barkla. 1988. Steroid hormones as regulators of the proliferative activity of normal and neoplastic intestinal epithelial cells (review). *Anticancer Res.* 8: 451–456.
97. Allen, K. m., S. j. Fung, D. a. Rothmond, P. I. Noble, and C. Shannon Weickert. 2014. Gonadectomy increases neurogenesis in the male adolescent rhesus macaque hippocampus. *Hippocampus* 24: 225–238.
98. Nakada, D., H. Oguro, B. P. Levi, N. Ryan, A. Kitano, Y. Saitoh, M. Takeichi, G. R. Wendt, and S. J. Morrison. 2014. Oestrogen increases haematopoietic stem-cell self-renewal in females and during pregnancy. *Nature* 505: 555–558.
99. Clarke, R. B., A. Howell, C. S. Potten, and E. Anderson. 1997. Dissociation between Steroid Receptor Expression and Cell Proliferation in the Human Breast. *Cancer Res.* 57: 4987–4991.
100. Cunha, G. R. 1996. Growth factors as mediators of androgen action during male urogenital development. *Prostate. Suppl.* 6: 22–25.
101. Cunha, G. R., B. Foster, A. Thomson, Y. Sugimura, N. Tanji, M. Tsuji, N. Terada, P. W. Finch, and A. A. Donjacour. 1995. Growth factors as mediators of androgen action during the development of the male urogenital tract. *World J. Urol.* 13: 264–276.
102. Karastergiou, K., S. R. Smith, A. S. Greenberg, and S. K. Fried. 2012. Sex differences in human adipose tissues – the biology of pear shape. *Biol. Sex Differ.* 3: 13.
103. Yurkovetskiy, L., M. Burrows, A. A. Khan, L. Graham, P. Volchkov, L. Becker, D. Antonopoulos, Y. Umesaki, and A. V. Chervonsky. 2013. Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota. *Immunity* 39: 400–412.

Figures supplémentaires

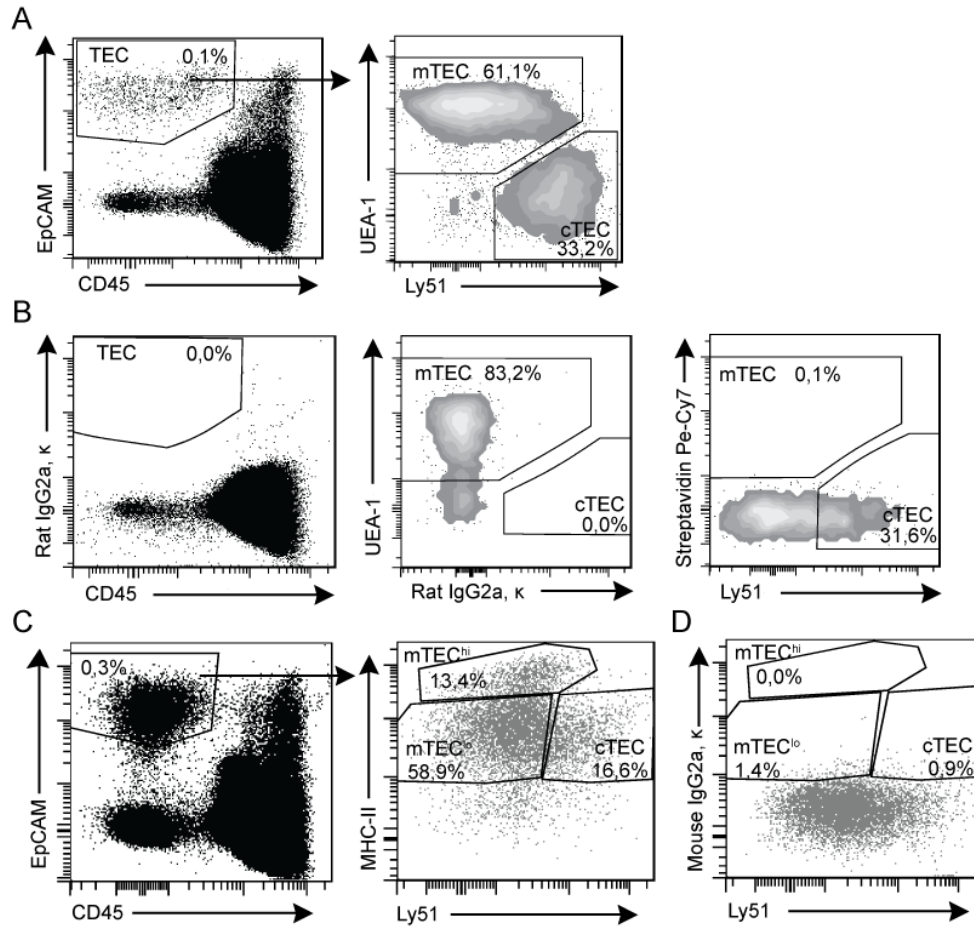


Figure S1 : Stratégies d'identification des TECs. (A) Identification des TECs (EpCAM⁺CD45⁻) et séparation en cTECs (Ly51⁺UEA1⁻) et mTECs (Ly51⁻UEA1⁺) par cytométrie de flux pour les jeunes souris. (B) Contrôles isotypiques pour les anticorps anti-EpCAM, anti-Ly51 et contrôle négatif pour UEA1. (C) Identification des TECs (EpCAM⁺CD45⁻) et séparation en cTECs (Ly51⁺ MHC-II⁺), mTEC^{lo} (Ly51⁻ MHC-II^{lo}) et mTEC^{hi} (Ly51⁻ MHC-II^{lo}) par cytométrie de flux pour les souris adultes. (D) Contrôles isotypiques pour l'anticorps anti-MHC-II (I-Ab).

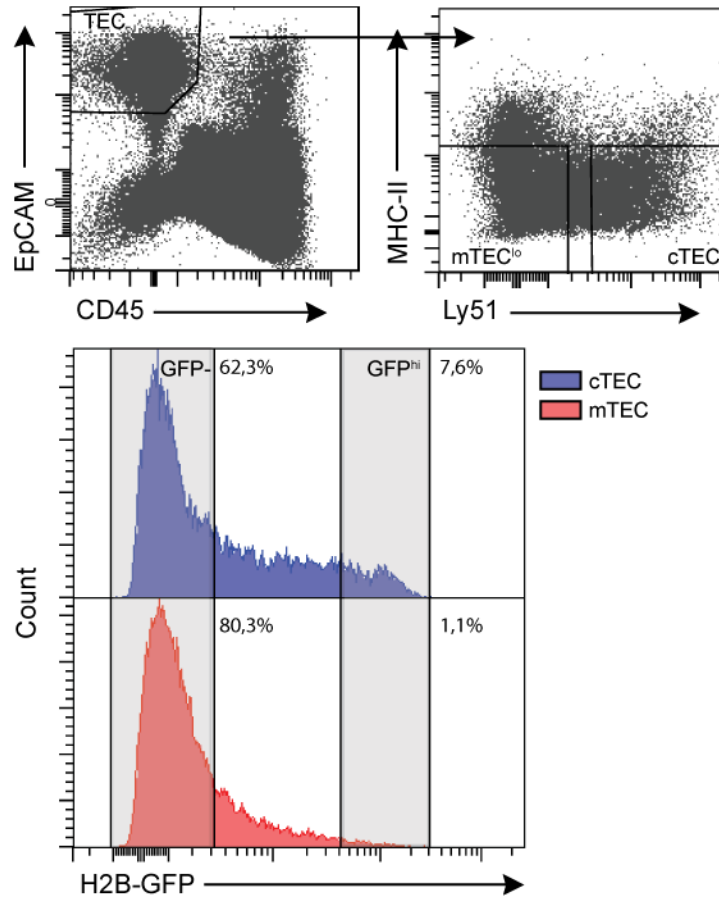


Figure S2 : Stratégies de tri des LRC. Les cellules stromales thymiques ont été triées selon leur marquage EpCAM⁺ CD45⁻ MHC-II^{lo} et séparées en cTECs (Ly51⁺) et mTECs (Ly51⁻). Chacune de ces populations ont ensuite été séparées selon l'intensité de fluorescence de H2B-GFP : les LRC sont GFP^{hi}, les non-LRC sont GFP⁻.

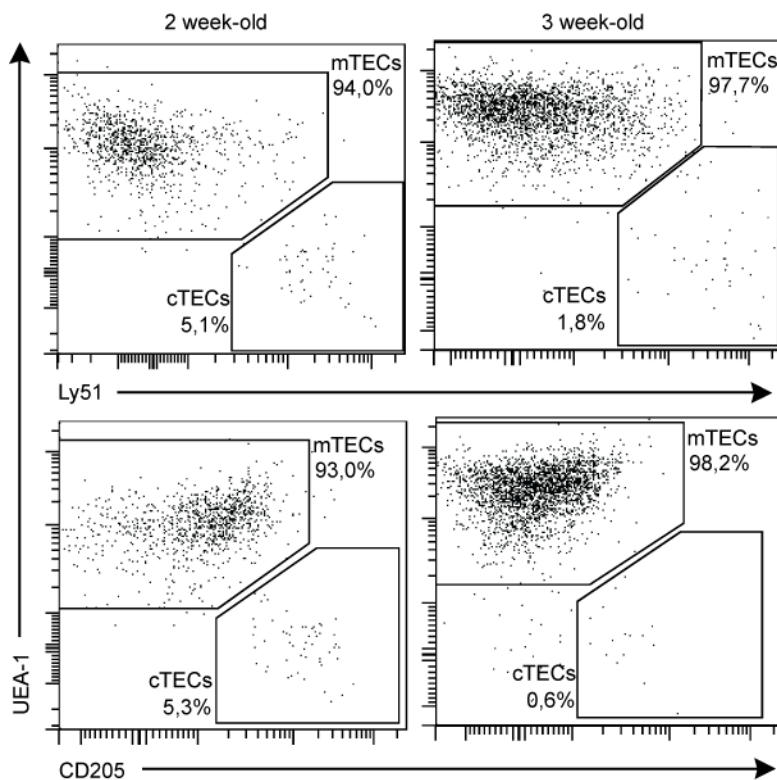


Figure S3 : Diminution des cTECs à deux et trois semaines d'âge. Le thymus contient très peu de cTECs à 2 et 3 semaines d'âge, qu'elles soient définies par leur expression de Ly51 ou de CD205.

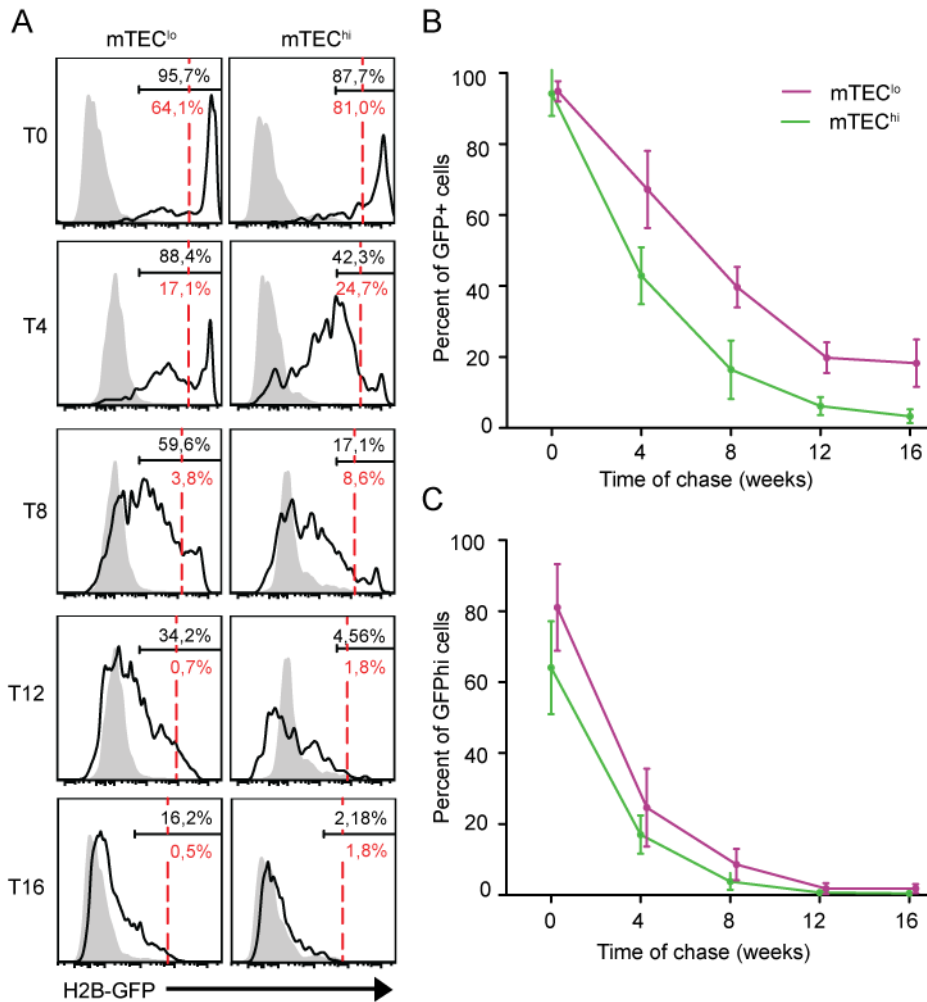


Figure S4 : Les mTECs matures (MHC-II^{hi}) prolifèrent plus rapidement que les mTECs immatures chez les souris femelles adultes. (A) Profils représentatifs de l'intensité de fluorescence en H2B-GFP des mTEC^{lo} et des mTEC^{hi} pendant une période de *chase* de 16 semaines. Les pourcentages moyens de cellules GFP⁺ (en noir) et de GFP^{hi} (en rouge) sont indiqués sur chaque graphique. Les lignes pointillées rouges délimitant les cellules GFP^{hi} ont été ajustées pour chaque temps afin de considérer la demie-vie de la protéine H2B-GFP de 24 jours. (B) Les pourcentages de cellules GFP⁺ dans les sous-ensembles de mTECs. (C) Les pourcentages de cellules GFP^{hi} dans les sous-ensembles de mTECs (0 ou 1 division seulement). Chaque point représente un individu, la ligne connecte les moyennes. Chaque groupe expérimental inclut 5 à 9 individus.