

Université de Montréal

**L'interleukine-21 : un nouveau joueur dans l'homéostasie des
lymphocytes T mémoires CD8⁺ et dans l'hématopoïèse**

par

Eve-Line Allard

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Septembre 2005

© Eve-Line Allard, 2005



W

4

US2

2006

7:21

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**L'interleukine-21 : un nouveau joueur dans l'homéostasie des
lymphocytes T mémoires CD8⁺ et dans l'hématopoïèse**

présenté par :
Eve-Line Allard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Idriss Djilali-Saiah
président-rapporteur

Nathalie Labrecque
Directeur de recherche

Jean-François Gauchat
Membre du jury

RÉSUMÉ

Les cytokines sont des molécules importantes dans le développement, la survie et l'activation des cellules composant le système immunitaire. Les cytokines de type I de la famille γ_c (interleukine-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et la récente IL-21) orchestrent le développement, la différenciation et la survie des lymphocytes T. Compte tenu que le récepteur à l'IL-21 (IL-21R) est exprimé de façon constitutive par les cellules T, que l'IL-21 est constitutivement produite dans les organes lymphoïdes et permet la survie des cellules T, nous croyons qu'elle participe activement dans l'homéostasie des lymphocytes T *in vivo*. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons créé un modèle de souris transgénique (Tg) surexprimant l'IL-21. De façon surprenante, les souris Tg ont une espérance de vie très limitée. En effet, 70% d'entre elles meurent au courant des trois semaines suivant la naissance (groupe 1) alors que les autres ont une survie maximale de 5 mois (groupe 2). Les souris IL-21 Tg appartenant au groupe 1 présentent un développement hématopoïétique altéré caractérisé par une surreprésentation de cellules myéloïdes larges et immatures au détriment des lignées lymphoïde et érythroïde. Nous avons déterminé que l'IL-21R était exprimé par les progéniteurs communs lymphoïdes, ce qui suggère que l'IL-21 changerait le programme de différenciation des précurseurs lymphoïdes vers celui des progéniteurs myéloïdes. Nous avons observé aussi le défaut hématologique chez les souris Tg du groupe 2, mais celles-ci affichent en plus une accumulation de lymphocytes T mémoires fonctionnels. Nous avons démontré que l'IL-21 induisait la survie des lymphocytes T CD8⁺ mémoires *in vitro*. En conclusion, ces résultats révèlent une fonction inattendue de l'IL-21 dans la régulation de l'hématopoïèse ainsi que dans la génération et/ou la survie des lymphocytes T mémoires.

Mots clés : interleukine-21, cytokine, récepteur de cytokine, lymphocyte T mémoire, homéostasie, survie, hématopoïèse, progéniteurs, lignée de différenciation

ABSTRACT

Cytokines are important molecules required in the development, survival and activation of cells that are part of the immune and hematopoietic system. γ_c cytokines (interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 and the newly discovered IL-21) belonging to the type I family orchestrate T lymphocyte development, differentiation and survival. Since the IL-21 receptor (IL-21R) is constitutively expressed by T cells, and that IL-21 is constitutively produced by lymphoid organs and induces T lymphocyte survival, we propose that IL-21 participates actively in T lymphocyte homeostasis *in vivo*. In order to verify this hypothesis, we created a transgenic (Tg) mouse model over-expressing IL-21. Surprisingly, Tg mice have a decreased survival. Indeed, 70% of them die over the three weeks following birth (group 1) while the others have a maximum life expectancy of 5 months (group 2). Group 1 IL-21 Tg mice show an altered hematopoietic development characterized by an over-representation of large and immature myeloid cells at the expense of the lymphoid and erythroid lineages. We demonstrated that IL-21R was expressed by common lymphoid progenitors, which suggests that IL-21 may change lymphoid precursor lineage commitment towards myeloid differentiation. We also see this hematological defect in group 2 Tg mice in addition to a functional memory T cell accumulation. We demonstrated that IL-21 could induce CD8⁺ memory T lymphocyte survival *in vitro*. Finally, these results uncover an unexpected function of IL-21 in hematopoiesis regulation as well as memory T cell generation and/or survival.

Keywords : interleukin-21, cytokine, cytokine receptor, memory T lymphocyte, homeostasis, survival, hematopoiesis, progenitors, differentiation lineage

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiii
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	1
1.1 INTRODUCTION	2
1.2 LES CYTOKINES	4
1.2.1 Cytokines de classe I et leur récepteur	5
1.2.1.1 Cytokines de la famille γ_c	5
1.2.2 Signalisation des cytokines γ_c	6
1.2.2.1 Voie de signalisation Jak/STAT	6
1.3 RÉPONSE DES LYMPHOCYTES T	8
1.3.1 Développement des lymphocytes T et de leur diversité	8
1.3.2 Reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T	9
1.3.3 Prolifération clonale des lymphocytes T	10
1.3.4 Contraction et formation de la mémoire immunologique	11
1.3.5 Caractéristiques des lymphocytes T mémoires	11
1.3.5.1 Auto-renouvellement et sensibilité à l'Ag	11
1.3.5.2 Phénotype des lymphocytes T mémoires	12
1.3.5.3 Sous-types de lymphocytes T mémoires	12
1.4 HOMÉOSTASIE DES LYMPHOCYTES T	13
1.4.1 Prolifération homéostatique	14
1.4.2 Rôle des cytokines γ_c dans l'homéostasie des lymphocytes T	15
1.4.2.1 Homéostasie des lymphocytes T naïfs	15
1.4.2.2 Génération et homéostasie des lymphocytes T effecteurs	17
1.4.2.3 Développement des lymphocytes T mémoires	18
1.4.2.4 Homéostasie des lymphocytes T mémoires	18

1.5 HÉMATOPOÏÈSE	19
1.5.1 Propriétés et identification des CSH et progéniteurs communs	20
1.5.2 Développement et identification des lymphocytes T et B	23
1.5.2.1 Développement des précurseurs T dans le thymus.....	24
1.5.2.2 Développement des progéniteurs B dans la MO	25
1.5.3 Développement de la lignée myéloïde et marqueurs	25
1.5.4 Régulation du choix de différenciation dans l'hématopoïèse	27
1.5.4.1 Rôle des cytokines dans le choix lymphoïde versus myéloïde.....	27
1.5.4.2 Rôle des facteurs de transcription dans le choix lymphoïde versus myéloïde	28
1.5.4.3 Rôle des cytokines dans le développement T et B	28
1.5.4.4 Rôle des facteurs de transcription dans le développement T et B.....	29
1.5.4.5 Rôle des cytokines dans le choix myéloérythroïde	30
1.5.4.6 Rôle des facteurs de transcription dans le choix myéloérythroïde	31
1.5.4.7 Rôle des cytokines dans le choix granulocytes/monocytes.....	32
1.5.4.8 Rôle des facteurs de transcription dans le choix granulocytes/monocytes	32
1.6 L'INTERLEUKINE-21 ET SON RÉCEPTEUR	33
1.6.1 Distribution tissulaire et cellulaire de l'IL-21/IL-21R	34
1.6.2 Effets biologiques de l'interleukine-21	35
1.6.2.1 Effets de l'IL-21 sur les lymphocytes T	35
1.6.2.2 Effets de l'IL-21 sur les lymphocytes B.....	37
1.6.2.3 Effets de l'IL-21 sur les cellules NK et DC	40
1.6.2.4 Signalisation par le duo IL-21/IL-21R	41
1.6.2.5 Effets de l'IL-21 dans des modèles de tumeur et d'autoimmunité.....	42
1.6.2.6 Résumé des fonctions de l'IL-21 dans le système immunitaire	44
PROBLÉMATIQUE	46
CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	48
2.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES	49
2.1.1 Essai de survie des lymphocytes T <i>in vitro</i> (article Ostiguy <i>et al.</i>, en préparation pour <i>Journal of Leukocyte Biology</i>)	49

2.1.2 Analyse du phénotype des souris IL-21 Tg (chapitre 4)	49
2.1.3 Reconstitution hématopoïétique à partir de la MO de souris IL-21 Tg	50
2.1.4 Détection de l'IL-21R sur les progéniteurs de la moelle osseuse.....	50
2.1.5 Détection de l'IL-21R sur les progéniteurs par RT-PCR	51
CHAPITRE 3. ARTICLE.....	53
AVANT-PROPOS	54
CHAPITRE 4. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES.....	82
4.1 PARTICIPATION À L'ARTICLE OSTIGUY <i>ET AL.</i> INTITULÉ « IL-21 PROMOTES T LYMPHOCYTE SURVIVAL » EN PRÉPARATION POUR <i>JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY</i>	83
4.1.1 L'IL-21 induit la survie des lymphocytes T <i>in vitro</i>	83
4.2 PERTURBATION DE L'HÉMATOPOÏÈSE CHEZ LA SOURIS IL-21 Tg	85
4.2.1 Accumulation de cellules de la lignée myéloïde chez la souris IL-21 Tg	85
4.2.2 Reconstitution hématopoïétique après la greffe de MO de souris IL-21 Tg	90
4.2.3 Détermination de l'expression de l'IL-21R par les progéniteurs hématopoïétiques	92
CHAPITRE 5. DISCUSSION.....	96
5.1 ACCUMULATION DE LYMPHOCYTES T PRÉSENTANT UN PHÉNOTYPE MÉMOIRE.....	98
5.1.1 Augmentation du nombre de cellules T _E spécifiques à l'Ag.....	99
5.1.2 Disponibilité accrue de cytokines permet à la niche des lymphocytes T mémoires de s'élargir	100
5.1.3 Diminution de la sensibilité des cellules T _E à l'AICD	101
5.1.4 Augmentation du taux d'auto-renouvellement des lymphocytes mémoires	102
5.1.5 Induction de l'expression Bcl-6 chez les lymphocytes T CD8 ⁺	103
5.1.6 Prolifération homéostatique chez la souris IL-21 Tg	106

5.1.7 Effet de l'IL-21 sur l'expression de récepteurs importants dans la survie des lymphocytes T naïfs et activés/mémoires	108
5.2 PHÉNOTYPE HÉMATOPOÏÉTIQUE CHEZ LA SOURIS IL-21 TG ..	110
5.2.1 Accumulation de cellules myéloïdes au détriment des lignées érythroïdes et lymphoïdes	112
5.2.2 Expression de l'IL-21R sur les progéniteurs hématopoïétiques.....	114
5.2.2.1 Effet de l'IL-21 sur l'expression de l'IL-7R chez les CLP et répercussion sur le développement des cellules B et T	114
5.2.2.2 Signalisation par l'IL-21R sur les CLP	115
5.2.2.3 Activation de facteurs de transcription et expression de récepteurs aberrants par les CLP.....	117
5.3 CONCLUSION	120
RÉFÉRENCES	122

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Exemples de cytokines de classe I.....	4
Tableau II : Jak/STAT activés par les cytokines γ_c	7
Tableau III : Marqueurs des cellules hématopoïétiques.....	21
Tableau IV : Marqueurs du développement thymique des lymphocytes.....	24
Tableau V : Signalisation Jak/STAT utilisée par l'IL-21.....	42
Tableau VI : Greffe de MO provenant de souris IL-21 Tg.....	91

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Orchestration de la réponse des lymphocytes T par les cytokines γ_c15
Figure 2 :	Hématopoïèse murine et marqueurs phénotypiques.....22
Figure 3 :	Développement de la lignée granulocytaire.....25
Figure 4 :	Régulation transcriptionnelle de l'engagement vers la lignée lymphoïde....30
Figure 5 :	Régulation transcriptionnelle de l'engagement vers la lignée myéloïde.....31
Figure 6 :	Résumé des fonctions de l'IL-21 dans le système immunitaire.....44
Figure 7 :	L'IL-21 induit la survie des lymphocytes T naïfs et des cellules T CD8 ⁺ activées/mémoires.....84
Figure 8 :	Histologie de la moelle osseuse et de la rate de souris IL-21 Tg colorée avec hématoxyline-éosine.....86
Figure 9 :	Accumulation de cellules myéloïdes dans la MO et la rate des souris IL-21 Tg.....87
Figure 10 :	Composition de la moelle osseuse et de la rate chez les deux groupes de souris IL-21 Tg.....88
Figure 11 :	Profil des progéniteurs myéloïdes dans la MO de souris IL-21 Tg.....90
Figure 12 :	La reconstitution hématopoïétique suite à une greffe de MO de souris IL-21 Tg recrée le phénotype des souris IL-21 Tg chez la souris receveuse.....92
Figure 13 :	Expression du récepteur à l'IL-21 par les cellules myéloïdes matures et les précurseurs de la MO.....93
Figure 14 :	Expression du récepteur à l'IL-21 par les précurseurs hématopoïétiques par RT-PCR.....95
Figure 15 :	Modèles proposés afin d'expliquer l'accumulation de lymphocytes T ayant un phénotype mémoire dans la souris IL-21 Tg.....105
Figure 16 :	Modèle hypothétique proposé sur l'effet de l'IL-21 chez les CLP dans la souris IL-21 Tg.....118

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a. :	acide aminé
Ac :	anticorps
Ag :	antigène
AICD :	mort cellulaire induite par l'activation
B6 :	souris C57BL/6
CLP :	progéniteurs lymphoïdes communs
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CMP :	progéniteurs myéloïdes communs
CPA :	cellule présentatrice d'antigène
CSH :	cellule souche hématopoïétique
CTL :	lymphocyte T cytotoxique
DC :	cellule dendritique
EAE :	encéphalomyélite autoimmunitaire expérimentale
FT :	facteur de transcription
GMP :	précurseurs granulocytes/monocytes
IFN :	interféron
Ig :	immunoglobuline
IL :	interleukine
Lin :	« lineage »
LPS :	lipopolysaccharide
LT-CSH :	long-terme CSH
MEP:	précurseurs mégakaryocytes/érythrocytes
Mk:	mégakaryocytes
MO:	moelle osseuse
mrIL-21:	IL-21 recombinante murine
NK :	« natural killer »
OVA :	ovalbumine
PBMC :	cellules du sang périphérique

RCB :	récepteur des cellules B
RCT :	récepteur des cellules T
SCF :	facteur des cellules souches
ST-CSH :	court-terme CSH
T _E :	cellules T effectrice
T _g :	transgénique
T _H :	cellule T helper
T _M :	cellule T mémoire
T _{MC} :	cellule T mémoire centrale
T _{ME} :	cellule T mémoire effectrice

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier ma directrice de recherche, Nathalie Labrecque, pour m'avoir épaulée et conseillée durant la réalisation de ce projet plus que stimulant. J'ai beaucoup apprécié ta disponibilité, tes connaissances ainsi que tes encouragements constants. Tu as su trouver les bons mots afin que je donne le meilleur de moi-même durant ces deux années.

Un merci immense à mes collègues du laboratoire qui ont fait que je me suis sentie rapidement chez moi : Marie-Pierre Hardy, Julie Rooney, Miriam Marquis, Julie Leignadier et Julie Leboeuf. Votre énergie et votre bonne humeur m'ont permis de compléter ce projet avec succès. Un merci spécial à Marie-Pierre et Julie R. qui ont participé de bon cœur à mon projet lors de journées plus difficiles : je vous en dois une!

Je tiens aussi à remercier les membres du jury qui évalueront ce mémoire.

Finalement, merci à ma famille et à mes amis qui m'ont toujours soutenue dans mon parcours malgré les chemins tortueux que j'ai pris. Vous avez cru en moi et en mes capacités de mener à bien ce projet. Grâce à vos encouragements sous toutes formes, vous m'avez permis de focaliser mes énergies sur mes études tout en me distrayant par des activités qui m'ont redonné énergie et sourire.

CHAPITRE 1.
INTRODUCTION

1.1 INTRODUCTION

Le système immunitaire permet à un organisme vertébré de se défendre contre des pathogènes de différentes natures (virus, bactéries, parasites, champignons) par deux types de réponse : la réponse innée et la réponse acquise. Ces deux sortes d'immunité sont dépendantes de plusieurs types cellulaires et de molécules sécrétées par ceux-ci, les cytokines. La réponse innée est la première ligne de défense qui entre en jeu lors d'une infection, grâce à l'action des macrophages/monocytes, des cellules « natural killer » (NK) et des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles) qui n'ont pas de spécificité propre au type d'organisme infectieux. Cette immunité naturelle requière la présence de cytokines importantes dans le recrutement et l'activation d'autres cellules immunitaires possédant les récepteurs correspondants. Ces dernières, dont les interleukines (IL)-1, IL-6, IL-12, TNF- α et les interférons (IFN)- α et - β sont produites selon le type d'organisme à combattre. Dans le cas où cette réponse n'est pas suffisante pour éliminer le pathogène, il y aura recrutement et activation des cellules de l'immunité acquise. Cette réponse dépend des lymphocytes T et B, et seuls certains lymphocytes, qui reconnaîtront le pathogène de façon unique, seront amenés à proliférer et à se différencier afin de répondre à l'envahisseur. Une fois de plus, une panoplie de cytokines permet la prolifération, l'activation et la différenciation des lymphocytes T et B. Les lymphocytes T CD4⁺ de type T helper (T_H)1 (inflammatoires) ainsi que les CD8⁺ cytotoxiques (CTL) permettront l'élimination de l'agent infectieux de façon plus directe. Les premières activeront les macrophages à fusionner leurs lysosomes avec leurs phagosomes, via la signalisation par l'IFN- γ , alors que les deuxièmes provoqueront la cytolysse des cellules infectées (pathogènes intracellulaires). Les lymphocytes CD4⁺ T_H2 (auxiliaires) entraîneront l'activation des lymphocytes B (par la sécrétion d'IL-4). Ces derniers seront alors à même de sécréter des anticorps (ou immunoglobulines (Ig)) de différentes catégories permettant d'effectuer une réponse humorale efficace, i.e. enrayer les pathogènes présents dans le sérum (extracellulaires), suite à l'activation de la cascade du complément.

La beauté du système immunitaire réside dans le développement de différentes lignées immunes ayant chacune leurs fonctions spécifiques. Cependant, ces cellules sont toutes issues de processus de différenciation ayant permis à des cellules plus immatures de donner vie à la diversité des cellules présentes dans le sang. Ces cellules progénitrices sont retrouvées dans la moelle osseuse (MO) chez les mammifères et permettent, via différents stades de différenciation, de produire des cellules de plus en plus engagées dans une lignée spécifique. Cet engagement requière la présence de récepteurs spécifiques à certaines cytokines qui activeront une cascade intracellulaire. Celle-ci induira l'activation de facteurs de transcription nécessaires à la différenciation suivant une lignée spécifique. Cette suite d'événements réduit par le fait même leur potentiel de donner naissance à des précurseurs appartenant à une autre lignée cellulaire. Ce processus est l'hématopoïèse, qui permettra la naissance des progéniteurs de la lignée lymphoïde (lymphocytes B et T) ainsi que ceux des granulocytes, macrophages, mégakaryocytes (Mk) et érythrocytes. Toutes les étapes de développement de ces derniers ainsi que des lymphocytes B s'effectuent dans la MO alors que les précurseurs T émigreront vers le thymus où ils poursuivront leur maturation.

Le mémoire présenté ici permettra une revue de la réponse immunitaire effectuée par les lymphocytes T ainsi que de l'hématopoïèse comme processus permettant le développement de toutes les cellules du sang. Il y sera question de l'importance des cytokines dans l'homéostasie et les fonctions des lymphocytes T, en plus de leur rôle dans la différenciation des précurseurs hématopoïétiques. De plus, une place primordiale sera accordée à l'interleukine-21 et à son récepteur, sujets principaux de cette étude.

1.2 LES CYTOKINES

Les cytokines sont des molécules solubles ayant divers effets sur plusieurs types de cellules et tissus. Leurs rôles sont aussi variés, que ce soit la régulation des activités fonctionnelles ou la communication entre les cellules, la promotion de la survie, de la mort cellulaire ou la chimotaxie (chémokines). L'activité des cytokines s'effectue par la liaison à leur récepteur, présent à la surface cellulaire d'un nombre restreint ou répandu de cellules, puis à la transmission de signaux intracellulaires générant une réponse. La nomenclature des cytokines change selon que ces dernières soient classées par les cellules les produisant (interleukines (IL), lymphokines, monokines, interférons) ou par leur structure secondaire et tertiaire (cytokines à chaîne longue ou courte). En général, les cytokines sont classées en deux familles, soient les cytokines de classe I (famille de l'hématopoïétine) et de classe II (famille IFN/IL-10). Les cytokines de classe I se divisent en familles selon leur utilisation d'une chaîne commune présente dans leurs récepteurs respectifs (Tableau I). Cette classe de cytokines sera l'objet principal de ce mémoire, plus spécifiquement la famille γ_c , dont les membres sont d'une importance particulière dans l'orchestration de la réponse immunitaire par les lymphocytes T ainsi que dans la régulation de leur homéostasie.

TABLEAU I. EXEMPLES DE CYTOKINES DE CLASSE I

Famille IL-2R γ (famille γ_c ¹)	Famille IL-3R	Famille IL-6R	Famille à chaîne unique
IL-2 IL-4 IL-7 IL-9 IL-13 IL-15 IL-21 TSLP ¹	IL-3 IL-5 GM-CSF ¹ G-CSF	IL-6 IL-11 IL-12A IL-12B IL-23 Oncostatin M LIF ¹ Leptine	Érythropoïétine Hormone de croissance Prolactine

¹ γ_c : chaîne commune gamma; TSLP : lymphopoïétine stromale thymique; GM-CSF : facteur de stimulation de colonies de granulocytes-macrophages; LIF : facteur inhibiteur de leucémie

1.2.1 Cytokines de classe I et leur récepteur

Les récepteurs de cytokines peuvent être catégorisés en deux classes selon des motifs structuraux conservés présents dans leur domaine extracellulaire, plus particulièrement le nombre et la distance séparant des résidus cystéine et proline ^{1,2}. Les récepteurs appartenant à la classe I possèdent 4 résidus cystéines dans la portion N-terminale, un motif WSxWS (selon la nomenclature en acides aminés (a.a.)) en C-terminal ^{3,4} et sept feuillets β ⁵. De plus, leurs ligands partagent une structure tridimensionnelle semblable comprenant quatre hélices α ainsi qu'une topologie haut-haut-bas-bas ⁶. Comme mentionné précédemment, les cytokines/récepteurs de classe I sont à nouveau divisés en familles selon la chaîne commune utilisée par le récepteur (Tableau I). L'accent sera mis sur les cytokines de la famille γ_c qui sont d'une importance particulière dans le développement, l'homéostasie et les réponses immunitaires engendrés par les lymphocytes T ^{7,8}.

1.2.1.1 Cytokines de la famille γ_c

La chaîne γ commune (γ_c) est partagée par les récepteurs pour les cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-21 et TSLP (Tableau I) ^{9,10}. De plus, les récepteurs à l'IL-2 et l'IL-15 ont aussi en commun la chaîne IL-2R β qui permet la transmission de signaux ¹¹. La preuve de l'importance des cytokines γ_c réside dans le phénotype observé chez des patients atteints d'une mutation dans le gène γ_c résultant en une immunodéficiência combinée sévère reliée au chromosome X (XSCID) ¹². Les patients présentant cette maladie ont un développement très diminué des lymphocytes T et les NK, des cellules appartenant à l'immunité innée, sont absentes. Le nombre de cellules B est normal, quoique ceux-ci ne soient pas fonctionnels, provoquant une hypogammaglobulinémie ¹³⁻¹⁶. Le phénotype observé résulte soit de l'absence de liaison entre les cytokines de la famille γ_c et leur récepteur ou par une déficiéncia dans la transmission des signaux via le récepteur s'il y a liaison. La panoplie d'effets résultant du manque de la chaîne γ_c démontre que chacune des cytokines a un rôle important dans le développement, la fonctionnalité et l'homéostasie des cellules

immunitaires, particulièrement au niveau des lymphocytes T¹⁷. De plus, la correction du phénotype des patients SCID par transfert de moelle osseuse révèle à quel point la signalisation intracellulaire via la chaîne γ_c chez les récepteurs de cytokines utilisant cette chaîne est importante dans le développement d'un système immunitaire compétent.

1.2.2 Signalisation des cytokines γ_c

Lors de la liaison d'une cytokine de la famille γ_c à son récepteur, il y a transduction de signaux intracellulaires via la queue cytoplasmique de ce dernier. En effet, des motifs conservés comme box1 et box 2 présents dans la queue sont impliqués dans la transduction de signaux¹⁸. Lors de l'oligomérisation du récepteur, il y a activation de la cascade Jak/STAT (Janus tyrosine kinase/signal de transduction et d'activation de la transcription)¹⁹. Cette voie permet la survie, le développement, la prolifération et la différenciation des cellules cibles. Cette signalisation est donc décrite en détails dans la section qui suit.

1.2.2.1 Voie de signalisation Jak/STAT

La voie de Jak/STAT est impliquée dans la transduction de signaux provenant des récepteurs de cytokines de la famille γ_c ²⁰. Contrairement aux récepteurs d'hormone de croissance, les récepteurs des cytokines n'ont pas d'activité catalytique intrinsèque (tyrosine ou sérine/thréonine kinase). Afin de pallier à ce manque, ces derniers sont associés avec une classe de kinases : les Jak. Ceux-ci sont au nombre de quatre : Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2. Les Jak1, Jak2 et Tyk2 sont exprimés de façon ubiquitaire alors que Jak3 est présent seulement chez les cellules hématopoïétiques^{21,22}. Lorsqu'une cytokine se lie à son récepteur, l'oligomérisation de ce dernier active par auto- ou trans-phosphorylation la tyrosine kinase Jak qui lui est associée²⁰. Cependant, différentes cytokines vont activer différents Jak (Tableau II). Par exemple, les cytokines appartenant à la famille γ_c vont activer principalement Jak3, associé à la chaîne γ_c , ainsi que Jak1, présent sur la chaîne spécifique du récepteur

^{23,24}. Il est intéressant de noter que des patients $Jak3^{-/-}$ présentent un phénotype SCID clinique semblable à celui observé chez ceux ayant une mutation dans le gène de la chaîne γ_c ²⁵. Les Jak activés vont alors phosphoryler certains résidus tyrosine du récepteur, résidus étant reconnu par les domaines SH2 contenus dans plusieurs types de molécules de signalisation. En effet, ces sites d'ancrage permettent l'entrée en jeu des STAT ^{20,26}.

TABLEAU II. JAK/STAT ACTIVÉS PAR LES CYTOKINES γ_c

Cytokine γ_c	Jak	STAT
IL-2	Jak1, Jak2, Jak3	STAT5a, STAT5b, STAT3
IL-4	Jak1, Jak3	STAT6
IL-7	Jak1, Jak3	STAT5a, STAT5b, STAT3
IL-15	Jak1, Jak3	STAT5a, STAT5b, STAT3

Adapté à partir de ²⁰.

La famille STAT contient des facteurs de transcription et compte sept membres : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6 ^{26,27}. Suite à leur ancrage par leur domaine SH2 à la queue cytoplasmique du récepteur sur le résidu tyrosine phosphorylé, les STAT deviennent eux-mêmes activés par phosphorylation. Ils se détachent alors du récepteur, vont former un dimère avec un autre STAT et peuvent transloquer au noyau afin d'activer la transcription de leurs gènes cibles. Les cytokines de la famille γ_c sont reconnues pour recruter principalement STAT5a/b et STAT3, sauf l'IL-4 qui active STAT6 (Tableau II).

Cette cascade a été décrite ici pour les cytokines γ_c , mais ne s'y limite pas car d'autres types de cytokines de type I utilisent aussi cette voie : le récepteur du GM-CSF utilise Jak2 et STAT5a/b, ceux de l'érythropoïétine et des hormones de croissance recrutent Jak2, STAT5a/b et STAT3 (hormone de croissance seulement) ²⁷. La signalisation via la voie Jak/STAT permet donc aux cytokines d'induire la survie, la prolifération ou le développement de leurs cellules cibles, processus importants dans les réponses immunitaires.

1.3 RÉPONSE DES LYMPHOCYTES T

La réponse des cellules T inclut la reconnaissance d'un antigène (Ag) perçu comme étant étranger au soi. Ce processus induit la prolifération et la différenciation en cellules T effectrices (T_E) qui possèdent un arsenal de fonctions leur permettant d'éliminer le pathogène. Suite à cela, la très grande majorité des lymphocytes T effecteurs mourront par apoptose ²⁸, alors que le restant de la population se différenciera en lymphocytes T mémoires (T_M) ²⁹. Les cellules T_M ont la capacité de survivre à long terme et surtout, advenant une seconde infection par le même pathogène, de répondre de façon beaucoup plus rapide et efficace ³⁰. Ces différentes étapes seront détaillées afin de bien comprendre les conséquences possibles advenant un défaut dans la génération, la survie, l'activation ou la différenciation des lymphocytes T.

1.3.1 Développement des lymphocytes T et de leur diversité

Le développement des lymphocytes T s'effectue dans le thymus où les progéniteurs T provenant de la MO passeront divers stades de maturation et de sélection. Suite à ce processus, les lymphocytes T matures présentant un répertoire de récepteurs varié seront moins enclins à réagir contre des Ag du soi, i.e. à causer de l'auto-immunité. Ces cellules T matures pourront ensuite émigrer en périphérie afin de surveiller l'organisme en attente d'une rencontre avec un Ag pour lequel elles sont spécifiques.

Le thymus est l'organe où les lymphocytes T se développent et acquièrent la possibilité d'exprimer un récepteur des cellules T (RCT). Celui-ci est composé de deux chaînes, α et β , qui contiennent chacune des régions constantes et variables. Les loci des chaînes α et β sont multigéniques et contiennent une grande diversité de segments correspondants aux régions variables (V, D et J pour la chaîne β , V et J pour la chaîne α) ainsi qu'un ou plusieurs segments géniques codant pour la région constante C. Le réarrangement de chacune de ces chaînes est possible grâce à l'action

de deux recombinaisons, RAG1 et RAG2, qui permettent la mise bout à bout d'une copie de chacun des segments V, (D), J de façon aléatoire. De plus, l'action d'autres enzymes provoque l'ajout au hasard de nucléotides aux extrémités à joindre avant l'assemblage des segments entre eux. Ceci augmente d'autant plus la diversité des chaînes α et β qui, lors de leur réunion, permettront d'augmenter le nombre de RCT de spécificité différente à 10^{18} ³¹.

Le RCT est une protéine membranaire, mais ne possède pas de queue cytoplasmique suffisamment longue pour initier une signalisation lors d'une stimulation RCT-dépendante. Il est donc associé à un complexe, le CD3, composé de quatre chaînes (γ , ζ , δ , η) permettant une signalisation intracellulaire. Celles-ci sont groupées en trois dimères dont les longues queues cytoplasmiques contiennent un motif commun ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Cette séquence, présente en trois copies sur les chaînes ζ et en une copie sur les autres chaînes, devient phosphorylée lors de l'activation du lymphocyte T par son RCT, induisant une signalisation intracellulaire ³².

1.3.2 Reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T

Un lymphocyte T naïf est une cellule qui n'a jamais rencontré un Ag pour lequel son RCT est spécifique. Il patrouille l'organisme dans l'attente d'une rencontre avec un pathogène dans les divers organes lymphoïdes. Ce processus est possible grâce à l'expression de la L-sélectine CD62L et du récepteur de chémokine CCR7 sur les lymphocytes T naïfs, laissez-passer pour l'entrée dans les organes lymphoïdes ^{33,34}. La reconnaissance antigénique s'effectue dans ces sites où les cellules dendritiques (DC), des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA) provenant de la périphérie, se trouvent. Les DC ayant migré de foyers où se trouve l'infection présentent des fragments peptidiques d'Ag. Ces derniers seront couplés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du soi, de classe I ou II. Le lymphocyte T naïf spécifique reconnaît grâce à son RCT le complexe CMH du soi chargé d'un peptide antigénique. Le CMH de classe I, présent sur la presque

totalité des cellules de l'organisme, présentera un peptide dérivé de protéines cytosoliques endogènes, qu'elles soient de nature étrangère ou du soi. Au contraire, le CMH de classe II, exprimé par les CPA comme les lymphocytes B, les macrophages ou les DC, sera couplé à un peptide provenant de vésicules intracellulaires (Ag externe). Tout dépendant de la nature du lymphocyte T en question ($CD4^+$ ou $CD8^+$), le contact RCT-complexe peptide/CMH s'accomplira via le CMH de classe I, pour les cellules T $CD8^+$, ou par le CMH de classe II, pour les lymphocytes T $CD4^+$ ^{35,36}.

1.3.3 Prolifération clonale des lymphocytes T

Suite à la reconnaissance d'un Ag par un lymphocytes T naïf, ce dernier sera amené à proliférer afin d'augmenter le nombre de cellules T spécifiques à l'Ag et à se différencier en lymphocytes T effecteurs (T_E). Cependant, un signal d'activation via le RCT n'est pas suffisant afin d'initier ces deux processus. Un second signal, un co-stimulateur, est requis de la part des CPA afin d'activer les lymphocytes T naïfs et provient des molécules CD80 et CD86 (B7.1 et B7.2) qui lient le CD28 présent sur la cellule T³⁷. La présence des deux signaux, l'un par le RCT, le second via le CD28, induit l'activation des lymphocytes T et leur prolifération, augmentant de 1000 fois le nombre de cellules T spécifiques à l'Ag^{38,39}. Dépendamment de l'environnement dans lequel la reconnaissance antigénique s'effectue (en termes de cytokines), les cellules T $CD4^+$ présenteront un phénotype T_H1 (inflammatoire) ou T_H2 (auxiliaire) selon qu'il y a abondance d'IL-12 ou d'IL-4, respectivement⁴⁰. Les lymphocytes T $CD8^+$ deviendront cytotoxiques, fonctions comprenant la sécrétion de perforine, de granzyme ou la ligation du récepteur de mort cellulaire Fas⁴¹. Ces différents types de lymphocytes T effecteurs permettent donc l'élimination de l'agent infectieux. Dans le cas où la maturation d'une CPA n'est pas complète, celle-ci sera dans l'incapacité de fournir le second signal de co-stimulation aux lymphocytes T naïfs. L'absence de ce signal résulte en l'anergie du lymphocyte T.

1.3.4 Contraction et formation de la mémoire immunologique

Deux modèles expliquant la formation de la mémoire immunologique ont été élaborés. Le premier propose que les lymphocytes T naïfs, après leur activation, vont s'engager dans deux voies distinctes de différenciation. La première voie amène la production de lymphocytes T_E alors que la deuxième induit la formation de lymphocytes T mémoires (T_M)^{42,43}. Le second modèle suggère une différenciation linéaire, où les lymphocytes T naïfs activés deviennent T_E, puis une partie d'entre eux deviennent T_M⁴⁴⁻⁴⁹. Ce modèle démontre les évidences les plus convaincantes et nous adhérons à ce dernier pour expliquer la formation de la mémoire immunologique.

Suite à l'élimination du pathogène, la majeure partie (90%) des lymphocytes T_E ayant passé par la phase d'expansion meurt par apoptose induite par la liaison de leur récepteur Fas^{39,50}. Cette phase de contraction est importante puisque l'organisme ne requière plus la présence d'un aussi grand nombre de cellules T_E. De plus, celles-ci pourraient s'avérer néfastes puisqu'elles produisent des cytokines inflammatoires. De même, elles sont des compétitrices pour les autres lymphocytes T en ce qui a trait aux ressources disponibles (cytokines, espace). La population restante (10%) se différenciera en lymphocytes T_M afin d'assurer une protection à long terme contre une éventuelle réinfection par le même pathogène.

1.3.5 Caractéristiques des lymphocytes T mémoires

1.3.5.1 Auto-renouvellement et sensibilité à l'Ag

Les cellules T_M confèrent une immunité protectrice dans le cas où un même pathogène infecterait l'organisme. Elles répondent beaucoup plus rapidement à l'Ag et présentent donc une expansion en quelques heures seulement^{51,52}. De plus, elles réagissent à des concentrations moins élevées d'Ag que leurs consœurs naïves, impliquant qu'elles sont plus sensibles⁵³. Le nombre de cellules T_M spécifiques à un Ag donné est aussi plus élevé que chez les naïves^{39,54,55}. Contrairement aux

lymphocytes T naïfs, les cellules T_M ont un taux basal d'auto-renouvellement plus rapide, augmentant leur longévité, qui ne requière pas la présence d'Ag⁵⁶⁻⁵⁸. Les lymphocytes T mémoires peuvent donc survivre pendant plusieurs années.

1.3.5.2 Phénotype des lymphocytes T mémoires

Plusieurs marqueurs permettent de différencier les cellules T naïves des mémoires. D'abord, les cellules T_M expriment fortement le CD44 (que nous appellerons CD44^{hi}), alors que les lymphocytes T naïfs sont négatifs pour cette molécule (CD44^{lo}). Les différents isoformes de CD45R (A, B et O chez l'humain, B chez la souris) identifient les cellules T naïves ou mémoires selon leur expression différentielle sur ces groupes^{59,60}. En effet, les cellules CD4⁺ T_M de la souris diminuent l'expression de CD45RB alors que celle-ci est très intense sur les lymphocytes T naïfs⁶¹.

Enfin, les lymphocytes T CD8⁺ mémoires sont identifiables grâce à deux marqueurs stables : le Ly6C et l'IL-2R β (CD122). Les rôles *in vivo* de Ly6C ne sont pas connus, quoique des résultats *in vitro* démontrent que ce dernier semble être un accessoire dans la fonction cytolytique des cellules T CD8⁺⁶². De plus, l'expression de Ly6C est en corrélation avec la production d'IFN- γ par les CD8⁺ T_M ⁶³. L'IL-2R β est une composante qui est partagée entre les récepteurs pour l'IL-2 et l'IL-15⁶⁴. Compte tenu que l'IL-15 est connue pour induire la survie des lymphocytes CD8⁺ T_M , ce marqueur doit avoir une signification importante.

1.3.5.3 Sous-types de lymphocytes T mémoires

Les cellules T mémoires peuvent être divisées en deux sous-groupes selon leur localisation et les cytokines qu'elles produisent. En effet, l'expression de certaines molécules de surface permet à l'un des sous-groupes de patrouiller les tissus non-lymphoïdes et les muqueuses, donc de se présenter au site même d'une infection. Ceci permet l'initiation d'une réponse immunitaire rapide précédant l'émigration des

DC vers les organes lymphoïdes secondaires afin d'activer des lymphocytes T naïfs. Les sous-groupes se distinguent par l'expression de CCR7, un récepteur pour les chémokines CCL19 et CCL21, et par le CD62L. Les cellules T_M centrales (T_{MC}) expriment le CCR7 ainsi que le CD62L et se localisent principalement dans les ganglions lymphatiques. Elles produisent peu d'IFN- γ et d'IL-4 et ne contiennent pas de perforine. Leur présence dans les ganglions leur permet de se diviser rapidement et de migrer aux sites d'infection advenant l'entrée d'un pathogène. Les lymphocytes T_M effecteurs (T_{ME}) quant à eux sont négatifs pour CCR7 et CD62L, sont retrouvés dans les sites tertiaires (tissus périphériques) et contiennent de l'IFN- γ et de la perforine⁶⁵⁻⁶⁷. Ces cellules sont prêtes à réagir sur le champ lors d'une ré-infection. Ces deux types de cellules T mémoires sont donc des gardiens de notre système immunitaire et constamment sur le qui-vive afin de répondre rapidement à une invasion par l'ennemi.

1.4 HOMÉOSTASIE DES LYMPHOCYTES T

L'homéostasie est définie comme étant les différents types de réponses utilisées par les lymphocytes T afin de restaurer l'équilibre entre leurs diverses populations, celles-ci occupant chacune une niche spécifique⁶⁸. L'homéostasie des lymphocytes T met en jeu une balance entre le nombre de cellules T naïves, effectrices (si une réponse immunitaire a été générée) et mémoires. De plus, les mécanismes homéostatiques doivent tenir compte de l'export de nouveaux lymphocytes T provenant du thymus, tout ceci dans un espace où les ressources sont limitées. Dans un organisme à l'état stable, l'homéostasie des lymphocytes T implique la co-existence de cellules T naïves et mémoires, qui sont régulées de façon indépendante puisqu'appartenant à deux niches différentes⁶⁹. L'homéostasie des lymphocytes T nécessite donc un équilibre adéquat entre leur développement, leur mort et leur prolifération⁷⁰, mécanisme très complexe régulé par une panoplie de molécules, dont les cytokines.

1.4.1 Prolifération homéostatique

L'un des mécanismes homéostatiques le plus drastique dans l'occupation de l'espace alloué aux lymphocytes T est sans contredit la prolifération homéostatique. Ce processus est observé lorsque le nombre de cellules T est réduit sous un certain seuil, provoquant la prolifération des lymphocytes T résiduels aussi bien naïfs que mémoires. En effet, le transfert de lymphocytes T naïfs ou mémoires dans un hôte irradié, donc lymphopénique, amène ces derniers à proliférer même si l'Ag pour lequel leur RCT est spécifique est absent^{71,72}. Ceci est possible car l'expansion est régie par les complexes peptide du soi : CMH du soi ayant servi à la maturation des cellules T lors de leur développement dans le thymus. De plus, les cytokines IL-7 et IL-15 participent à ce processus chez les lymphocytes T CD8⁺^{73,74}; leurs consocuteurs CD4⁺ requièrent l'IL-7^{75,76}. Il semblerait que les cellules T CD8⁺ prolifèrent plus rapidement que les CD4⁺ et puissent participer à cette expansion en dehors des organes lymphoïdes secondaires^{72,77,78}. Les lymphocytes T CD8⁺, contrairement aux CD4⁺, n'ont pas besoin de CPA professionnelles pour leur prolifération homéostatique⁷⁹. D'un autre côté, ce ne sont pas toutes les cellules T qui répondent à une lymphopénie par la prolifération. Certaines d'entre elles sont réfractaires à l'expansion.

De façon intéressante, la prolifération homéostatique est accompagnée d'un changement dans le phénotype des cellules T naïves, celles-ci arborant alors les molécules caractéristiques des lymphocytes T_M. Plusieurs groupes ont démontré que la prolifération homéostatique des lymphocytes T naïfs résulte en une augmentation de l'expression de CD44 et de l'IL-2R β (surtout chez les cellules T CD8⁺) ainsi que la diminution de l'expression de CD45RB (chez les CD4⁺). Cependant, les marqueurs d'activation retrouvés chez la population effectrice sont absents des lymphocytes T ayant participé à une prolifération homéostatique^{72,80-84}. Ces cellules T ayant un phénotype mémoire en possèdent aussi les fonctions effectrices dont la production d'IFN- γ et la cytolyse⁸⁰⁻⁸⁵. La prolifération homéostatique est donc un événement générant des lymphocytes T mémoires stables, mais qui ne remplit pas la niche

occupée par les cellules T naïves puisque ces dernières deviennent mémoires. Cependant, les nouveaux émigrants thymiques parviendront à combler l'espace réservé aux lymphocytes T naïfs. S'ensuivront alors les mécanismes homéostatiques normaux qui seront décrits dans la section suivante. Les cytokines de la famille γ_c (IL-2, IL-7 et IL-15 surtout) sont d'importance particulière dans ces processus.

1.4.2 Rôle des cytokines γ_c dans l'homéostasie des lymphocytes T

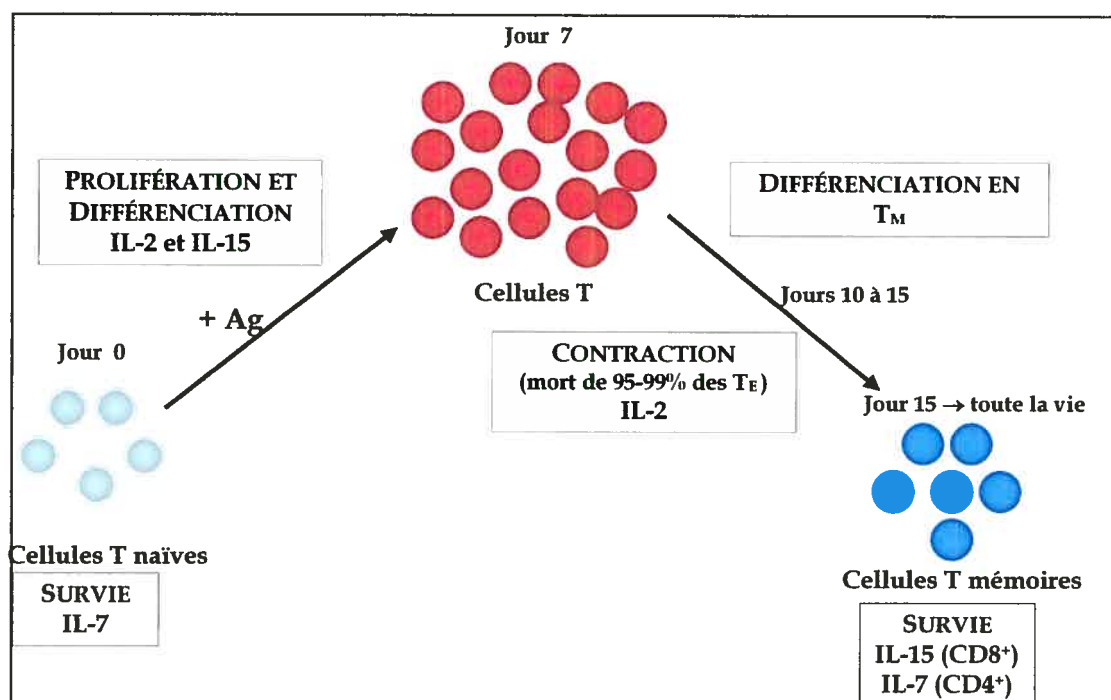


Figure 1. Orchestration de la réponse des lymphocytes T par les cytokines γ_c .

Importance des cytokines γ_c , particulièrement l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15, dans la réponse immunitaire générée par les lymphocytes T. L'IL-7 est cruciale pour la survie des cellules T naïves. Lors d'une réponse antigénique, l'IL-2 et l'IL-15 permettront la prolifération des lymphocytes T spécifiques à l'Ag et leur différenciation en T_E. Lors de l'élimination du pathogène, les T_E mourront par apoptose et l'IL-7 induira la différenciation des cellules restantes en T_M. La survie de celles-ci est dépendante de l'IL-7 pour les CD4⁺ et de l'IL-15 pour les CD8⁺.

1.4.2.1 Homéostasie des lymphocytes T naïfs

Les émigrants thymiques ainsi que les cellules T naïves sont d'importance capitale dans la génération d'un répertoire clonal varié. En effet, cette diversité des RCT assure la capacité du système immunitaire à faire face à de nouvelles infections.

Cependant, afin de laisser place aux émigrants thymiques récents (10^6)⁸⁶, une proportion (5%) des cellules T naïves (20×10^6) doit mourir chaque jour⁸⁷. Les lymphocytes T naïfs sont métaboliquement quiescents (moins de 20% d'entre eux se divisent sur une période de 5 semaines)⁵⁶ et ont une durée de vie prolongée (demi-vie entre 116 et 365 jours dans le sang chez l'humain)^{88,89}.

Cependant, les lymphocytes T naïfs requièrent des signaux de survie afin d'être maintenus dans le réservoir de cellules en re-circulation. Le premier est l'interaction de leur RCT avec des peptides du soi couplés au CMH présentés par des APC^{72,90-97}. Ce phénomène a été démontré autant chez les cellules T naïves $CD4^+$ que $CD8^+$. En effet, le transfert de celles-ci dans un hôte déficient en CMH de classe I ou II, selon que l'étude porte sur les cellules T $CD8^+$ ou $CD4^+$, cause leur perte graduelle (demi-vie de 3 à 4 semaines). Selon Seddon et al., la survie des cellules T naïves induite par son RCT serait dépendante d'une signalisation nécessitant l'action de kinases de la famille Src, comme lck et fyn⁹⁸.

Le second signal de survie pour les lymphocytes T naïfs est transmis par l'IL-7 (Figure 1). Celle-ci permet le maintien de la taille cellulaire des lymphocytes T ainsi que de leurs fonctions métaboliques, i.e. le métabolisme du glucose^{75,99}. En effet, des cellules T naïves transférées dans un hôte déficient en IL-7 mourront de façon très rapide^{74,75,100}. De plus, l'IL-7 et l'IL-15 ont été démontrées comme induisant la survie des lymphocytes T naïfs $CD8^+$ *in vitro* par la régulation de l'expression de membres de la famille Bcl-2, molécules anti- et pro-apoptotique¹⁰¹⁻¹⁰³. L'IL-4, l'IL-6 et l'IL-21 permettent aussi la survie des lymphocytes T naïfs *in vitro*¹⁰⁴⁻¹⁰⁷, mais seule l'IL-7 a été identifiée comme étant essentielle *in vivo*^{74,100,108}. L'importance de l'IL-7 et de l'IL-15 est aussi observée lors de la prolifération homéostatique afin de remplir le réservoir périphérique en lymphocytes T (voir section 1.4.1).

1.4.2.2 Génération et homéostasie des lymphocytes T effecteurs

Afin d'être en mesure de répondre à tout antigène étranger, le système immunitaire doit être doté d'une très grande population de lymphocytes T présentant un répertoire de RCT diversifié. Par conséquent, très peu de clones de cellules T sont spécifiques à un envahisseur particulier (environ 1000). Cependant, par exemple lors d'une infection virale, ceux-ci vont proliférer de façon massive. En conséquence, c'est parfois 50% des cellules T CD8⁺ qui seront spécifiques à l'Ag, cette population représentant un nombre de lymphocytes T huit fois supérieurs à celui retrouvé chez un hôte non-infecté¹⁰⁹. Ces cellules T spécifiques vont ensuite se différencier en lymphocytes T_E qui ont les capacités nécessaires afin d'enrayer l'infection. À ce jour, seules l'IL-2 et l'IL-15 sont connues pour induire la prolifération et la différenciation des cellules T naïves *in vitro*^{45,110,111} (Figure 1). En effet, les lymphocytes T provenant d'une souris déficiente en IL-2 prolifère de façon moindre que ceux provenant d'une souris contrôle après stimulation optimale du RCT¹¹². De plus, la différenciation des cellules T CD8⁺ en CTL est favorisée par l'IL-2⁴³. *In vivo*, l'absence d'IL-2, d'IL-15, de leur récepteur respectif (IL-2R α , IL-15R α) ou de leur chaîne partagée (IL-2R β) ne modifie pas la réponse proliférative des cellules T suite à la rencontre avec un virus¹¹³⁻¹¹⁶. Il est donc probable que d'autres cytokines puissent jouer un rôle dans la prolifération des lymphocytes T. De plus, l'IL-2 est produite seulement par les lymphocytes T activés, alors que les sources d'IL-15 sont nombreuses, incluant les monocytes/macrophages, cellules dendritiques (DC), kératinocytes et les cellules épithéliales¹¹⁷⁻¹²⁰. Cependant, l'absence d'IL-2 ou de son récepteur conduit à une lymphadénopathie et une splénomégalie (donc élargissement des organes lymphoïdes secondaires, suite à une accumulation de lymphocytes T) conjointement avec le développement d'autoimmunité^{112,114,121}. Ce fait amène une caractéristique importante de la réponse immunitaire des cellules T_E suite à l'élimination du pathogène. En effet, l'IL-2, malgré son effet positif sur la prolifération, a aussi comme effet négatif d'induire la mort cellulaire induite par l'activation (AICD)¹²²⁻¹²⁴. Il est connu que l'IL-2 diminue l'expression de la chaîne γ_c , cette dernière étant importante dans la transduction des signaux de survie par les

cytokines appartenant à cette famille comme mentionné plus haut ¹²⁵. Suite à l'élimination du pathogène, la très grande majorité des T_E vont mourir par apoptose afin de rétablir l'homéostasie lymphocytaire ²⁸ et éliminer les dégâts que pourrait causer cette population devenue inutile après la disparition du pathogène. Ce retour à l'équilibre est aussi dépendant de la diminution des interactions RCT-CMH ¹²⁶, de cytokines inhibitrices ^{127,128} et de facteurs pro- et anti-apoptotiques ¹²⁹.

1.4.2.3 Développement des lymphocytes T mémoires

Suite à l'élimination de la très grande majorité des cellules T_E, la population lymphocytaire restante se différenciera en lymphocytes T_M ^{29,45,130}. Il est clair que la fréquence des cellules T mémoires spécifiques pour un Ag corrèle avec le niveau de prolifération clonale atteint lors de la réponse immunitaire ⁵⁴. Les cytokines γ_c trouvent encore leur importance dans la génération des cellules T_M. Par exemple, un niveau plus élevé d'IL-4, IL-7 ou IL-15 (par injection ou dans un modèle transgénique) peut augmenter les nombres de lymphocytes T_M spécifiques à un Ag ¹³¹⁻¹³³. La formation des cellules T mémoires CD8⁺ et CD4⁺ est induite par l'IL-7 ^{74,134-136}, mais leur survie dépend de différents facteurs.

1.4.2.4 Homéostasie des lymphocytes T mémoires

Contrairement aux cellules T naïves, les lymphocytes T_M ne requièrent pas d'interaction avec le CMH pour survivre ^{48,137}. Le réservoir des cellules T mémoires se maintient grâce à l'auto-renouvellement de ces dernières, mais certaines d'entre elles peuvent être remplacées par des cellules T_M d'une autre spécificité antigénique ¹³⁸. Comme mentionné précédemment, la conservation des cellules T_M est essentielle afin de protéger l'organisme contre les ré-infections en générant une réponse plus rapide et efficace. La survie des cellules T_M est dépendante de deux cytokines primordiales : l'IL-7 et l'IL-15 (Figure 1). Les lymphocytes T_M CD8⁺ requièrent l'IL-15 et, à un moindre niveau, l'IL-7 ^{73,74,101,115,139-141}. En effet, en temps normal, des souris déficientes en IL-15 ou IL-15R α ont un nombre très réduit de cellules T_M

CD8⁺ ^{110,142}, alors qu'une surexpression d'IL-7 malgré l'absence d'IL-15 permet leur survie ¹⁴³. L'IL-15 semble être une cytokine unique dû au fait qu'elle peut être présentée en « trans » par la chaîne IL-15R α . Cette théorie propose que des cellules exprimant l'IL-15R α présenteraient l'IL-15 à d'autres types cellulaires, comme les lymphocytes T CD8⁺, porteurs du complexe IL-2R β / γ_c ¹⁴⁴. La chaîne α ne serait donc pas requise chez les cellules à qui serait présentée l'IL-15 ^{145,146}. Enfin, les T_M CD4⁺ sont plutôt dépendants de l'IL-7 pour leur conservation ^{135,147} et de récentes évidences démontrent un rôle du RCT dans leur auto-renouvellement ¹⁴⁷. Ce résultat explique pourquoi aucune cytokine n'a jamais été reconnue comme étant essentielle au renouvellement des lymphocytes CD4⁺ T_M ¹⁴¹.

1.5 HÉMATOPOÏÈSE

Tout comme l'homéostasie des lymphocytes T, l'hématopoïèse est régulée par les cytokines. Ce deuxième processus requière en effet l'action de cytokines afin de réguler le développement et la survie des cellules au niveau de la moelle osseuse (MO). Celle-ci est en effet le site où se produit l'hématopoïèse, un processus permettant la génération de toutes les lignées présentes dans le sang à partir d'une population autorenouvelable et très immature, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) ¹⁴⁸. Ces dernières doivent remplacer environ 2.4×10^8 érythrocytes et 4×10^6 cellules périphériques non lymphoïdes du sang à tous les jours chez une souris adulte ¹⁴⁹. Des anomalies présentes lors du développement normal des cellules du sang peuvent conduire à des désordres hématologiques comme les différents types de leucémie. Des mécanismes fortement régulés induisant la génération des lignées myéloïdes (donnant naissance aux monocytes/macrophages, granulocytes, érythrocytes et Mk) et lymphoïdes (développant les lymphocytes B, T, NK et les DC) sont sous l'action de cytokines, de signaux extracellulaires et de facteurs de transcription sur les progéniteurs, induisant le développement d'une lignée aux dépens d'une autre ¹⁵⁰. Dans ce mémoire, l'hématopoïèse sera racontée sous la forme des principales étapes du développement des lignées de la MO, à partir des CSH jusqu'aux cellules B, monocytes, granulocytes et érythrocytes. Il y sera fait mention

de l'action des cytokines résultant en l'activation de facteurs de transcription importants dans la différenciation et le développement des lignées hématopoïétiques. De plus, les marqueurs identifiant les différents progéniteurs seront décrits.

1.5.1 Propriétés et identification des CSH et progéniteurs communs

Les CSH possèdent trois propriétés qui les caractérisent : elles ne forment que 0.05% des cellules de la MO, elles ont une capacité d'auto-renouvellement qui permet de maintenir le réservoir de CSH et elles donnent naissance à toutes les lignées du sang (pluripotentes)¹⁵¹⁻¹⁵³. Ces cellules se divisent de façon asynchrone, i.e. que la plupart (75%) d'entre elles ne sont pas en cycle cellulaire à chaque instant. Cependant, 99% des CSH se diviseront au moins une fois sur une période de 57 jours¹⁵⁴. L'identification de gènes permettant aux CSH de se maintenir ou de s'expandre *ex vivo* ou *in vitro* est un des objectifs premiers en hématologie ou oncologie. En effet, la pluripotence de ces cellules en fait des cibles parfaites pour reconstituer la MO d'un patient souffrant d'immunodéficience ou de leucémie. De plus, les mécanismes intracellulaires permettant leur auto-renouvellement indéfini peuvent nous aider à comprendre et identifier les molécules responsables de l'expansion de tumeurs dont les cellules se divisent éternellement.

Les CSH peuvent être séparées en trois groupes suivant un ordre caractérisé par une perte progressive de la capacité de s'auto-renouveler. Un sous-groupe est capable de s'auto-renouveler indéfiniment (long-terme (LT)-CSH)), le sous-groupe court-terme (ST-CSH) se maintient pour huit semaines, alors que les progéniteurs multipotents (MPP) ne peuvent se régénérer^{155,156}. Ces derniers sont alors responsables de la première « décision » concernant la restriction du choix de différenciation vers la lignée myéloïde versus lymphoïde. Les MPP donnent naissance soit aux progéniteurs lymphoïdes communs (CLP)¹⁵⁷ ou aux progéniteurs myéloïdes communs (CMP)¹⁵⁸. Les CMP se développent ensuite en précurseurs granulocytes/monocytes (GMP) ou en précurseurs mégakaryocytes/érythrocytes (MEP)¹⁵⁸. L'identification de ces différents progéniteurs selon certains marqueurs est

d'une importance capitale dans l'étude de la différenciation hématopoïétique. Les cellules matures expriment des marqueurs caractéristiques à leur lignée (ou « lineage »), i.e. CD3 pour les lymphocytes T, CD11b pour les cellules myéloïdes, B220 pour les lymphocytes B et Ter119 pour les érythrocytes. L'ensemble de ces marqueurs est appelé « lineage », terme désignant les cellules hématopoïétiques matures. Les CSH n'exprimant pas ce marqueur sont Lin^- . Cette caractéristique nous permet donc de les isoler parmi toutes les cellules composant la MO ¹⁵⁹. Les autres marqueurs utilisés sont c-Kit, Sca-1, CD34, Flk2, IL-7R et CD32/CD16 ($\text{Fc}_\gamma\text{RII/III}$) (Tableau III) ^{157,158}. Par exemple, en plus d'être Lin^- , les CSH présentent un phénotype $\text{Thy}^{\text{lo}}\text{Sca-1}^+\text{c-Kit}^+\text{IL-7R}^-$ ou $\text{Lin}^-\text{CD34}^+\text{Thy}^+$ chez la souris et l'humain respectivement ^{152,154,160}.

TABLEAU III. MARQUEURS DES CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES

Marqueurs	Fonctions
Lin	Cocktail d'Ac spécifiques pour des marqueurs présents sur les cellules hématopoïétiques matures. Les CSH sont négatives.
c-Kit	Récepteur tyrosine kinase pour SCF^1 exprimé sur les progéniteurs très immatures.
Sca-1 (Ly-6A/E)	Protéine ancrée au phosphatidylinositol exprimée par les CSH et les cellules T.
CD34	Glycoprotéine exprimée par certaines cellules hématopoïétiques, adhésion cellulaire. Les CSH peuvent être CD34^+ ou CD34^- .
Flk2	Récepteur tyrosine kinase exprimé par les MPP, lymphocytes B primitifs et progéniteurs myélomonocytiques ¹⁶¹ .
IL-7R	Récepteur à l'IL-7 exprimé par les CLP et nécessaire au développement des lymphocytes T et B ^{157,162,163} .
CD32/CD16	Récepteurs pour la portion Fc des IgG, servent dans l'identification des progéniteurs CMP, GMP et MEP ¹⁵⁸ .

¹ SCF : facteur des cellules souches. Adapté de Orkin, 2000.

Lors de l'identification des CLP, Kondo et al. ont utilisé la présence de l'IL-7R sur les lymphocytes matures, non sur les cellules myéloïdes, afin d'isoler cette

population caractérisée par les marqueurs $IL-7R^+Lin^-c-Kit^{lo}Sca-1^{lo}$ (Figure 2). Les CLP, qui composent 0.02% de la MO, possèdent une capacité de reconstitution de la MO *in vivo* qui est restreinte aux lymphocytes T, B et NK^{157,164}. En effet, aucun granulocyte ou monocyte ne s'est développé à partir de ces progéniteurs¹⁵⁷. De plus, malgré la culture de ces précurseurs dans un milieu de méthylcellulose conditionné pour la croissance de colonies myéloïdes, aucune colonie de cette nature n'a été observée. De façon intéressante, les récepteurs au GM-CSF et au M-CSF, ces cytokines étant importantes dans le développement de la lignée myéloïde, sont présents sur les CSH, mais absents chez les CLP, ce qui suggère que la diminution de l'expression de ces récepteurs est l'un des événements initiaux induisant la différenciation vers la lignée lymphoïde¹⁶⁵.

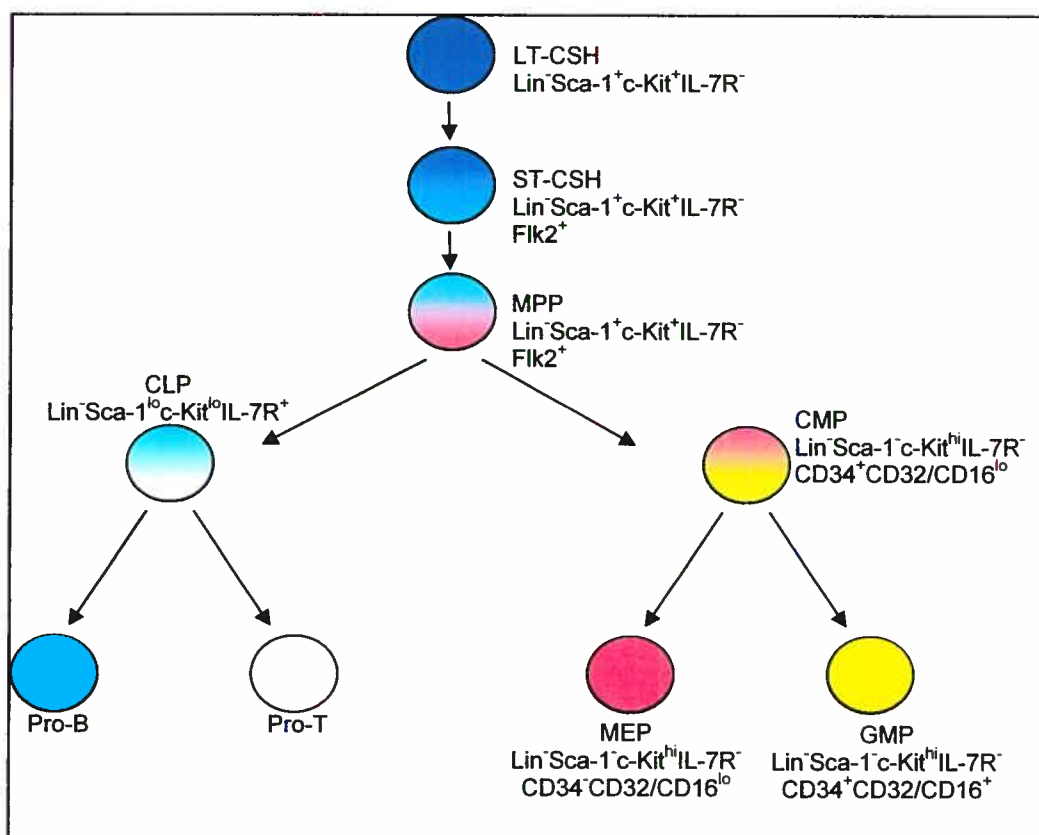


Figure 2. Hématopoïèse murine et marqueurs phénotypiques. Les trois stades CSH (LT-CSH, ST-CSH et MPP) sont caractérisés par une perte graduelle du potentiel d'auto-renouvellement. Les MPP se divisent ensuite en CLP ou CMP, ces derniers donnant naissance aux GMP et MEP. Les marqueurs utilisés pour différencier ces progéniteurs sont indiqués. Adapté de Kondo *et al.*, 2003.

Les CLP ayant été isolés, il devait bien exister un progéniteur équivalent pour la lignée myéloïde^{166,167}. Les CMP ont été identifiés en étudiant la portion IL-7R⁻ des précurseurs Lin⁻. Des études préliminaires avaient démontré la formation de colonies myéloérythroïdes *in vitro* dans la fraction Lin⁻IL-7R⁻c-Kit⁺. Compte tenu que les CSH sont Lin⁻IL-7R⁻c-Kit⁺Sca-1⁺, celles-ci ont été éliminées en excluant la portion Sca-1⁺. La population restante, Lin⁻IL-7R⁻c-Kit⁺Sca-1⁻, a été divisée en trois populations selon l'expression de CD34 et CD32/CD16 (Fc_γRII/III), ce dernier étant un marqueur des cellules myélomonocytiques¹⁶⁸ : 1° CD34⁺Fc_γRII/III^{lo}, 2° CD34⁻Fc_γRII/III^{lo} and 3° CD34⁺Fc_γRII/III⁺¹⁵⁸. Leur potentiel de différenciation a été analysé *in vitro* sur méthylcellulose et *in vivo* lors de transfert de MO. Les CMP (CD34⁺Fc_γRII/III^{lo}), qui composent 0.2% de la MO, donnent naissance à des monocytes, granulocytes, érythrocytes et mégakaryocytes (Mks), alors que les GMP (CD34⁺Fc_γRII/III⁺) et les MEP (CD34⁻Fc_γRII/III^{lo}) produisent des granulocytes/monocytes et Mks/érythrocytes respectivement (Figure 2)¹⁵⁸. L'isolation de tous ces progéniteurs de stade de différenciation plus ou moins avancé permet d'étudier de façon précise l'effet de cytokines exogènes, l'expression différentielle de gènes régulateurs importants et de récepteurs exprimés de façon ectopiques sur la différenciation de ces progéniteurs.

1.5.2 Développement et identification des lymphocytes T et B

Le développement des lymphocytes B s'effectue dans la MO, contrairement à celui des cellules T qui se poursuivra dans le thymus. Les signaux entraînant une CLP à s'engager dans la voie des lymphocytes T ou B sont encore obscurs et seront discutés dans la section des cytokines et facteurs de transcription dans l'hématopoïèse (sections 1.5.4.3 et 1.5.4.4). Les étapes générales du développement des lymphocytes T et B ainsi que les marqueurs permettant d'identifier chaque stade de maturation sont décrits ci-dessous.

1.5.2.1 Développement des précurseurs T dans le thymus

Les progéniteurs thymiques les plus immatures en provenance de la MO ont été désignés comme étant $CD4^{lo}CD3^{-}CD8^{-}CD44^{+}CD25^{-}CD117^{+}$. Ces cellules appartiennent à la lignée lymphoïde, mais ne génèrent pas uniquement des lymphocytes T (le potentiel s'étend aux DC et cellules B) ^{169,170}. Lorsqu'elles colonisent le thymus, ces cellules sont appelées « double-négatives » (DN), car elles n'expriment pas le CD4 ou le CD8. Le stade DN est séparé en quatre populations selon l'expression de CD44, CD25 et c-Kit ¹⁷¹⁻¹⁷⁴ (Tableau IV). Les DN1 sont $CD44^{+}25^{-}c\text{-Kit}^{+}$, les DN2 $CD44^{+}25^{+}c\text{-Kit}^{+}$, les DN3 $CD44^{-}25^{+}c\text{-Kit}^{lo}$ et les DN4 deviennent $CD44^{-}25^{-}c\text{-Kit}^{-}$. C'est durant les stades DN3 et DN4 que les thymocytes ayant correctement réarrangé la chaîne β de leur RCT (voir section 1.3.1) vont exprimer pour la première fois un pre-RCT. Ils pourront ensuite devenir « double-positifs » (DP), i.e. qu'ils commenceront à exprimer les co-récepteurs CD4 et CD8. Durant ce stade, la chaîne α du RCT va se réarranger, formant un récepteur complet. Le choix des thymocytes DP de devenir « simple-positif » (SP) CD4 ou CD8 dépend ensuite du type de CMH avec lequel le RCT peut entrer en interaction : les lymphocytes T $CD8^{+}$ interagissent avec le CMH de classe I alors que les $CD4^{+}$ utilisent le CMH de classe II. Les lymphocytes T seront alors prêts à émigrer en périphérie.

TABLEAU IV. MARQUEURS DU DÉVELOPPEMENT THYMIQUE DES LYMPHOCYTES

Marqueurs	DN1	DN2	DN3	DN4	DP	SP4	SP8
CD44	+	+	-	-	-	-	-
CD25	-	+	+	-	-	-	-
c-Kit	+	+	faible	-	-	-	-
CD4	-	-	-	-	+	+	-
CD8	-	-	-	-	+	-	+

1.5.2.2 Développement des progéniteurs B dans la MO

Les différents stades de maturation des lymphocytes B sont identifiés en fractions de A à C selon la notation de Hardy ¹⁷⁵. L'engagement dans la lignée B peut être observé par l'expression de B220 et l'absence de CD19 (fraction A) ¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. La molécule CD19 sera ensuite induite, stade appelé pro-B-tôt (ou fraction B) ^{175,176,179}. Suite au réarrangement de la chaîne lourde du récepteur des cellules B (RCB) au stade pro-B-tardif (fraction C), la protéine Ig μ sera exprimée en surface. Ce pré-RCB est un point de contrôle essentiel lors de la transition du stade pro-B à pre-B. En effet, la signalisation provenant du pré-RCB induit l'expansion cellulaire et la différenciation en pre-B, étape où le réarrangement de la chaîne légère du RCB s'effectuera ¹⁸⁰. Si ce dernier est productif, des cellules B immatures IgM⁺ émigreront dans les organes lymphoïdes secondaires.

1.5.3 Développement de la lignée myéloïde et marqueurs

Les granulocytes et monocytes proviennent du même progéniteur (GMP), alors que les érythrocytes sont générés à partir des MEP. Le développement de la lignée myéloïde s'effectue dans la MO. La maturation des neutrophiles débute au stade myéloblaste puis promyélocyte, où les granules primaires sont visibles, pour continuer au stade myélocyte où les granules secondaires se forment, finissant par les métamyélocytes, bands et neutrophiles matures contenant les granules tertiaires (Figure 3). Les monocytes se développent à partir de monoblaste → promonocyte → monocyte. Les marqueurs importants utilisés pour les monocytes et granulocytes sont

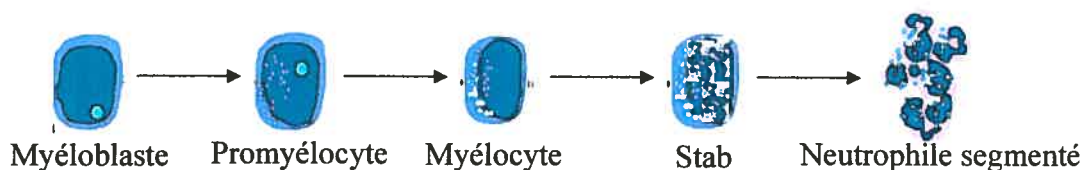


Figure 3. Développement de la lignée granulocytaire. Les neutrophiles, basophiles et éosinophiles ont les mêmes étapes de maturation. Les granules primaires apparaissent lors du stade promyélocyte, les secondaires se présentent à l'étape myélocyte alors que les tertiaires sont visibles dans le neutrophile segmenté.

CD11b, CD11c et Gr-1. Le CD11b est plus fortement exprimé sur les monocytes et les granulocytes, malgré sa présence sur d'autres cellules non myéloïdes. Chez les granulocytes, il commence à être exprimé au stade myélocyte et accroît en intensité avec la maturation¹⁸¹⁻¹⁸³. Le CD11c est exprimé tôt dans la différenciation des monocytes, avant l'apparition de CD11b, alors qu'il est exprimé au stade myélocyte chez les granulocytes^{183,184}. Finalement, l'expression de Gr-1 chez ces derniers augmente avec la maturation, alors que la présence de Gr-1 est transitoire chez les monocytes. Les cellules CD11b⁺Gr-1^{hi} sont des neutrophiles en différenciation terminale alors que les CD11b⁺Gr-1^{lo} contiennent des cellules myéloïdes immatures et des myélocytes¹⁸⁵.

Les marqueurs pour les cellules érythroïdes sont peu nombreux et comprennent les molécules CD71 et Ter-119^{186,187}. Le CD71 est un récepteur de transferrine non-spécifique aux cellules érythroïdes dont l'expression diminue avec la maturation des érythrocytes et qui est donc absent des érythrocytes matures¹⁸⁸. Le Ter-119 est une molécule de surface spécifiquement détectée sur les érythroblastes, stade plus précoce dans l'érythropoïèse¹⁸⁹. Le choix alternatif à l'érythropoïèse est le développement de mégakaryocytes (Mks), cellules donnant naissance aux plaquettes sanguines. Les Mks immatures et matures expriment le CD41^{190,191} aussi connu sous le nom de glycoprotéine IIb, une intégrine. Chez l'humain, les Mks expriment fortement le CD41 et le CD9¹⁹².

L'utilisation des marqueurs mentionnés précédemment pour les différentes lignées et les nombreux stades de maturation nous permet d'étudier les populations présentes dans la MO de souris afin de détecter toute anomalie du développement. De plus, il nous est alors possible d'étudier l'effet de cytokines sur chaque population ainsi que d'identifier les molécules intracellulaires activées (facteurs de transcription) entraînant les cellules hématopoïétiques vers une lignée de différenciation aux dépens d'une autre.

1.5.4 Régulation du choix de différenciation dans l'hématopoïèse

Les cytokines ont une panoplie d'effets sur l'homéostasie des différentes populations T, mais il ne faut pas négliger leur apport au développement des différentes populations présentes dans la MO. Ces cytokines vont se lier à des récepteurs permettant la survie et/ou la différenciation des divers progéniteurs. De plus, des facteurs de transcription (FT) exprimés de façon différentielle vont permettre à une cellule de déterminer son choix de destinée (« cell fate determination »).

1.5.4.1 Rôle des cytokines dans le choix lymphoïde versus myéloïde

L'action des cytokines dans la différenciation des CSH vers les CLP ou les CMP n'est pas définie ^{193,194}. Il est connu que les cytokines peuvent jouer des rôles importants dans le maintien du réservoir de CSH ^{195,196}. Un concept expliquant le dilemme des CSH dans leur maintien versus leur différenciation en précurseurs moins immatures a émergé. Le maintien du nombre de CSH serait dépendant d'un niveau élevé de cytokines. La diminution de la concentration en cytokines augmenterait les chances que la CSH entre en différenciation ¹⁹⁶. Par exemple, la culture de CSH humaines ayant un fort potentiel d'auto-renouvellement (LT-CSH) avec une grande quantité de cytokines (Flt3-L, SCF et megakaryocyte growth and development factor (MGDF) à 250 ng/mL) leur permet de proliférer. Par contre, la concentration de ces cytokines requise afin d'amplifier ces LT-CSH donnant naissance aux progéniteurs moins immatures est beaucoup moindre (50 ng/mL) ¹⁹⁷. Cependant, malgré l'effet dose-dépendant de certaines cytokines sur le potentiel de différenciation des CSH, il semblerait que l'engagement dans la lignée myéloïde ou lymphoïde soit de nature stochastique, donc indépendant de cytokines. Le rôle des facteurs de transcription (FT) dans le choix de développement lymphoïde versus myéloïde sera donc initié ici. Évidemment, il se pourrait que de nouvelles études permettent la formation d'un lien entre la signalisation des cytokines via leur récepteur et l'activation de ces FT chez les CSH, identifiant les facteurs responsables du choix de différenciation.

1.5.4.2 Rôle des facteurs de transcription dans le choix lymphoïde versus myéloïde

Le facteur primordial dans le choix de l'engagement vers la lignée lymphoïde ou myéloïde est le FT PU.1 (Spi-1) (Figures 4 et 5). *PU.1* est exprimé dans les CSH, MPP et toutes les cellules en différenciation sauf les érythroblastes, Mks et lymphocytes T^{158,198,199}. L'effet de PU.1 dans le choix de différenciation vers la lignée lymphoïde versus myéloïde semble être dose-dépendant puisqu'une reconstitution rétrovirale conduisant à une expression moindre de PU.1 induit le développement B chez les progéniteurs *PU.1*^{-/-}, alors qu'une expression importante de PU.1 amène une différenciation en macrophages en culture *in vitro*²⁰⁰. Ceci explique pourquoi les souris déficientes en PU.1, mourant à la naissance, ne présentent aucune cellule lymphoïde ou myéloïde, alors que les érythrocytes et Mks se développent de façon normale dans le foie fœtal²⁰¹⁻²⁰³. Par ailleurs, PU.1 n'est pas essentiel à la génération de précurseurs granulocytiques, mais est requis pour leur différenciation²⁰⁴. De façon très intéressante, les progéniteurs *PU.1*^{-/-} ne répondent pas *in vitro* aux cytokines de la lignée myéloïde M-CSF, GM-CSF et G-CSF ainsi qu'à la cytokine lymphoïde IL-7 en raison de l'absence ou de l'expression réduite de leurs récepteurs correspondants. En effet, PU.1 a été démontré comme régulant directement la transcription de l'IL-7R α et plusieurs sites de liaison pour PU.1 ont été identifiés dans les promoteurs des gènes de récepteurs myéloïdes^{204,205}. Ces résultats confirment donc le rôle dose-dépendant de PU.1, une faible expression de ce dernier induisant l'expression de l'IL-7R α , alors qu'une forte expression induit celle des récepteurs myéloïdes.

1.5.4.3 Rôle des cytokines dans le développement T et B

Remarquablement, le nombre de CLP est normal chez une souris déficiente en chaîne γ_c ²⁰⁶. Ceci implique que les cytokines appartenant à la famille γ_c ne sont pas essentielles à la survie des CLP. Cependant, lorsque le choix de différenciation est effectué vers les lymphocytes T ou B, il apparaît que l'IL-7 et son récepteur sont critiques dans la suite des étapes de maturation.

Au niveau des progéniteurs T ayant colonisé le thymus, il a été démontré que ces thymocytes, s'ils sont déficients en IL-7R α ou IL-7, présentent une altération dans leur capacité de prolifération^{162,163}. De plus, la survie des DN1, DN2 et DN3 est sévèrement affectée en l'absence d'IL-7²⁰⁷. Ceci résulte en une cellularité thymique diminuée de 20 fois chez les souris déficientes en IL-7. Le phénotype est encore plus sévère chez les mutants IL-7R α ^{-/-}, causé par le partage de l'IL-7R α avec le récepteur d'une autre cytokine importante (thymic stromal lymphopoietin) dans le développement d'un second type de lymphocytes T^{162,208,209}. L'IL-7 est aussi cruciale dans le développement des lymphocytes B. En effet, les CLP déficients en IL-7R α ont une capacité très réduite de se différencier vers le stade le plus immature du développement B (pro-B-tôt)^{206,210}. D'autres exemples font mention de l'action de cytokines dans le choix de lignée de différenciation. Deux groupes ont démontré que l'expression ectopique de l'IL-2R β ou GM-CSFR humain sur les CLP induit ces derniers à se différencier en cellules myéloïdes lors d'une stimulation avec l'IL-2 ou le GM-CSF humain, respectivement^{165,211}. Compte tenu que le GM-CSFR est exprimé sur les CSH et non sur les CLP, et que les progéniteurs myéloïdes l'expriment (voir section 1.5.4.5), ceci suggère que la diminution de l'expression de GM-CSFR est l'un des premiers événements dictant l'engagement dans la voie lymphoïde¹⁶⁵.

1.5.4.4 Rôle des facteurs de transcription dans le développement T et B

Les molécules Notch sont des récepteurs exprimés par tous les précurseurs hématopoïétiques dont les ligands sont présents sur le stroma des organes lymphoïdes primaires ainsi que sur d'autres cellules hématopoïétiques²¹². Les Notch semblent des candidats importants dans les choix de différenciation proposés aux CLP, particulièrement Notch1. En effet, Notch1 induit les CLP à se différencier en thymocytes en plus de son rôle dans la maturation des thymocytes vers les lymphocytes T (Figure 4). De plus, la signalisation via Notch1 inhibe la production de cellules B dans le thymus^{213,214}. D'un autre côté, la présence d'une forme constitutivement active de Notch1 dans la MO bloque le développement B à un

niveau très immature et induit la génération de cellules T immatures²¹⁴. Chez les lymphocytes B, l'IL-7, en plus d'être un facteur de survie et d'expansion pour les cellules pro-B, induit la différenciation des lymphocytes B à partir des CLP. En effet, la signalisation par l'IL-7 module l'expression de *EBF*, un FT spécifiquement présent durant le développement B (Figure 4)^{162,163,206,215-219}. Le FT PU.1 est aussi reconnu pour activer la transcription de *EBF*²²⁰.

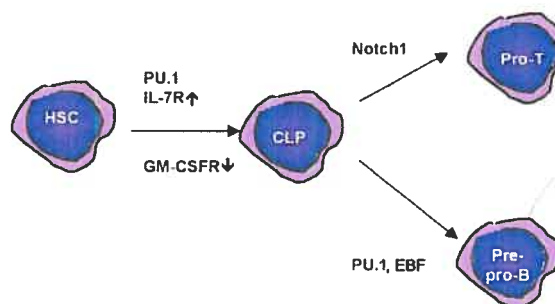


Figure 4. Régulation transcriptionnelle de l'engagement vers la lignée lymphoïde. L'importance du facteur de transcription PU.1 ainsi que l'expression de l'IL-7R et la diminution du GM-CSFR sont démontrées dans le choix de la lignée lymphoïde. Adapté de Zhu et Emerson, 2002.

1.5.4.5 Rôle des cytokines dans le choix myéloérythroïde

Le facteur de croissance myéloïde GM-CSF stimule la survie, la prolifération et la différenciation des GMP et des progéniteurs granulocytiques et monocytiques²²¹. De plus, malgré le rôle certain du G-CSF chez les granulocytes, il semblerait que l'absence de G-CSFR sur les CMP cause la diminution des progéniteurs autant GMP que MEP²²². Ceci démontre que l'action du G-CSF n'est pas limitée aux progéniteurs granulocytiques. Dans un autre ordre d'idées, la cytokine la plus importante dans la régulation de l'érythropoïèse est l'érythropoïétine et son récepteur, exprimé par les progéniteurs érythroïdes, est essentiel dans le développement et la maturation des érythrocytes²²³.

1.5.4.6 Rôle des facteurs de transcription dans le choix myéloérythroïde

Comme mentionné précédemment, l'engagement dans la voie myéloïde s'effectue par l'expression forte de PU.1. Une dualité existe dans l'engagement vers les différentes lignées myéloïdes (Figure 5). En effet, les FT PU.1 et GATA-1 sont requis dans le choix myéloïde, mais ces deux molécules sont des antagonistes : l'une inhibe l'expression de l'autre ^{224,225}. GATA-1 est requis pour la différenciation en MEP (et induit l'expression du récepteur à l'érythropoïétine ²²⁶) alors que PU.1 génère les GMP. Leur expression diminue lors de la maturation de la lignée granulocytaire/monocytaire ou mégakaryocytaire/érythrocytaire respectivement. En effet, l'expression ectopique de PU.1 dans la lignée K562, cellules leucémiques érythroïdes/mégakaryocytaires, redirige la différenciation en granulocytes/monocytes plutôt que Mks. Au contraire, la sur-expression de GATA-1 dans les progéniteurs granulocytaires 32D change le programme de développement vers la mégakaryopoïèse ²²⁷. Ces données indiquent donc que le ratio GATA-1/PU.1 dans les CMP dirige le choix de différenciation vers les MEP ou les GMP ^{224,225,228}.

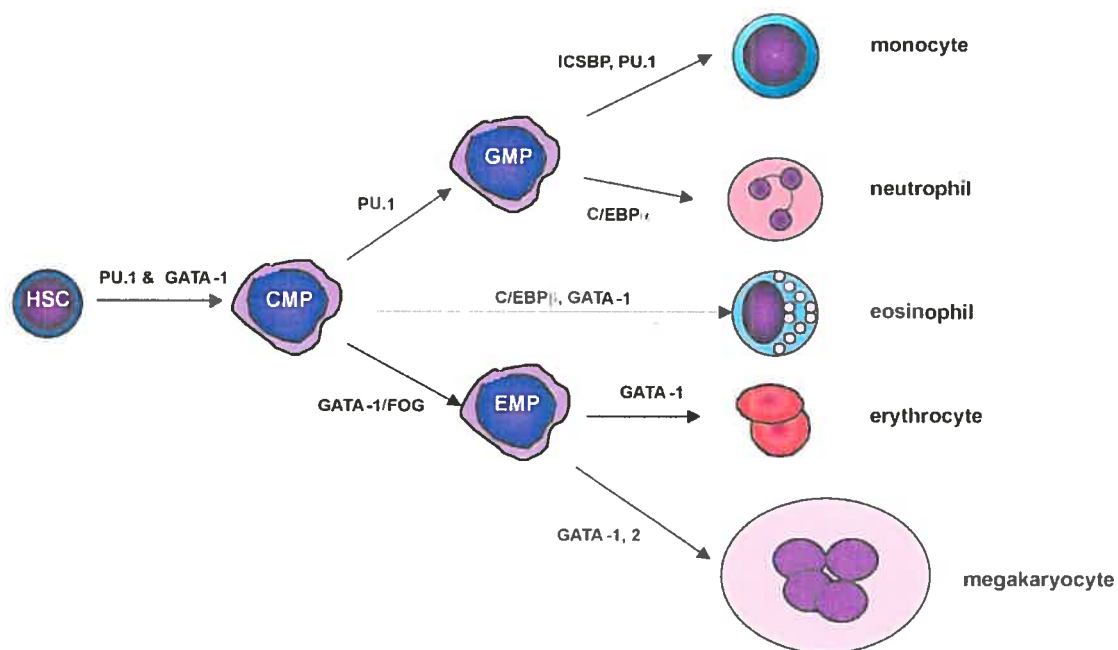


Figure 5. Régulation transcriptionnelle de l'engagement vers la lignée myéloïde. Les CMP se différencient soit en GMP ou en MEP. L'expression simultanée de PU.1 et GATA-1 induit la différenciation des CSH vers les CMP, où l'expression dominante de PU.1 amènera le stade GMP, alors qu'un ratio en faveur de GATA-1 engagera la lignée érythroïde. Tiré de Zhu et Emerson, 2002.

1.5.4.7 Rôle des cytokines dans le choix granulocytes/monocytes

Lorsque les précurseurs sont au stade GMP, de nouveaux facteurs s'ajoutent à ceux déjà présentés (Figure 5). Le maintien de l'expression des récepteurs de cytokines myéloïdes pour ce choix de lignée ne semble pas essentiel, puisque le nombre de colonies granulocytes/macrophages développées *in vitro* à partir de MO de souris G-CSF^{-/-} ou G-CSFR^{-/-} est modestement réduit. Ceci suggère que des signaux par le G-CSFR ne sont pas requis pour l'engagement dans la lignée myéloïde^{229,230}. Cependant, ces souris souffrent de neutropénie, causée par l'absence de signalisation par le G-CSF. Par contre, il semblerait que l'IL-6 et le GM-CSF pourraient compenser pour la perte de signal via le G-CSFR, permettant la neutropoïèse^{231,232}. Il va sans dire que le G-CSF stimule la survie, la prolifération et la maturation des progéniteurs granulocytiques²³³. De plus, celui-ci semble induire l'engagement des GMP dans la voie des granulocytes aux dépens des monocytes grâce à l'induction de C/EBP α ²³⁴.

Au niveau des monocytes, le M-CSF stimule la survie, la prolifération et la maturation des précurseurs monocytaires via son récepteur (M-CSFR)²³⁵.

1.5.4.8 Rôle des facteurs de transcription dans le choix granulocytes/monocytes

L'expression préférentielle de C/EBP α ainsi que sa nécessité dans la lignée granulocytaire semblent influencer le choix de différenciation des GMP en faveur des granulocytes, cette lignée étant absente chez les souris déficientes en C/EBP α contrairement aux monocytes^{236,237}. En combinaison avec PU.1, ces deux facteurs permettent la différenciation terminale des granulocytes (Figure 5)^{238,239}.

Concernant la différenciation en monocytes, il est acquis que celle-ci dépend de l'expression de PU.1, puisque ce dernier régule l'expression spécifique du M-CSFR sur les monocytes²⁴⁰. De plus, la lignée monocyttaire est absente chez les souris PU.1^{-/-}²⁰². Le FT ICSBP est essentiel au développement monocyttaire (Figure

5). Ce facteur induit l'expression de M-CSFR tout en inhibant celle de C/EBP α et G-CSFR et n'affecte pas PU.1 ni le GM-CSFR²⁴¹. Pour les progéniteurs myéloïdes, il est surprenant de constater que l'addition *in vitro* d'IL-7 accroît de façon synergique la formation de colonies myéloïdes à partir de progéniteurs Lin⁻Sca-1⁺ lorsque combinée avec le GM-CSF ou le M-CSF²⁴². Le même phénomène se produit lorsque l'IL-4 est ajoutée à l'IL-6²⁴³. De plus, *in vivo*, l'administration d'IL-7 recombinante augmente le nombre de cellules immatures de la lignée myéloïde²⁴⁴. Ceci suggère que certaines cytokines de la famille γ_c pourraient dicter le choix de différenciation en combinaison avec d'autres facteurs de croissance ou cytokines.

1.6 L'INTERLEUKINE-21 ET SON RÉCEPTEUR

L'interleukine-21 et son récepteur sont parmi les membres les plus récemment découverts appartenant à la classe des cytokines de type I^{245,246}. L'IL-21R humain a été cloné grâce à son homologie de structure avec les autres cytokines appartenant à cette classe. En effet, l'IL-21R contient une séquence signal putative, un domaine transmembranaire, deux paires de résidus cystéine conservés et un motif WSxWS, classiques chez les membres de la classe des cytokines de type I^{5,246,247}. De plus, le domaine intracellulaire contient les motifs box 1 et box 2, nécessaires à la transduction de signaux^{245,248}. Les plus proches homologues de l'IL-21R au niveau de la séquence en a.a. sont l'IL-2R β et l'IL-4R α ^{245,246}. L'IL-21R possède un homologue murin et tous deux sont identiques à 72% au niveau de la séquence nucléique et à 62% au niveau des a.a.²⁴⁶. Finalement, l'IL-21R fait partie de la famille des cytokines γ_c , puisqu'il est composé d'une chaîne α et de la chaîne commune γ et que cette dernière est essentielle à la transduction de signaux suivant la liaison de son ligand^{249,250}.

Son ligand, l'IL-21, une protéine de 15 kDa, a été identifié par clonage fonctionnel. Les homologues humains et murins partagent 57% d'identité. L'IL-21 possède 131 a.a., un domaine de quatre hélices α , typique chez les cytokines de type I, et présente une séquence en a.a très homologue à celle des cytokines IL-2, IL-4 et

IL-15. Les cytokines IL-21 et IL-15 sont pourvues de deux paires de résidus cystéine en positions identiques, faisant de l'IL-15 son plus proche parent au niveau de leur structure ²⁴⁵.

1.6.1 Distribution tissulaire et cellulaire de l'IL-21/IL-21R

Au niveau des tissus, la présence du messager de l'IL-21R a été détectée chez l'humain et chez la souris dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les ganglions ainsi que dans le thymus, les amygdales, poumons et intestins ^{245,246,251}. Cependant, l'expression est élevée au niveau des organes lymphoïdes. L'IL-21R a été détecté en premier sur les lymphocytes B et les cellules NK ²⁴⁵ ainsi que sur les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) activés, les thymocytes et les lymphocytes T activés ^{245,246}. Par la suite, notre laboratoire et d'autres ont démontré l'expression de l'IL-21R sur les lymphocytes T naïfs ^{107,252,253} et les DC ^{254,255}. Il est à noter que l'expression de l'IL-21R augmente chez les PBMC et les lymphocytes B et T suivant une activation phytohemagglutinine-L- ou RCT-dépendante, respectivement ^{107,245,246,256}. Dans la MO, tous les stades de développement des lymphocytes B sauf les pro-B manifestent la présence de l'IL-21R à la surface cellulaire ^{107,253}. Cependant, aucune étude n'a été effectuée sur les autres types de précurseurs (granulocytes, monocytes, érythrocytes, Mks). Le messager de l'IL-21R a aussi été détecté chez des lignées cellulaires B, T, NK activées et chez les HL-60 (promyéloblastique; lignée de leucémie myéloïde aiguë) ^{245,246,257}.

Contrairement à son récepteur dont l'expression est très fréquente dans les compartiments lymphocytaires, la production du messager de l'IL-21 est restreinte aux cellules T CD4⁺ activées et aux cellules stromales des organes lymphoïdes ^{107,245}. En effet, le messager de l'IL-21 était présent dans les ganglions de souris *Rag*^{-/-} qui sont dépourvues de tout lymphocyte T. De plus, l'expression de l'IL-21 était plus forte dans la fraction des ganglions enrichie en cellules stromales (*gp38*⁺) ¹⁰⁷. Le sous-type de cellules T CD4⁺ produisant l'IL-21 (T_H1 ou T_H2) est encore controversé. Une équipe a démontré l'expression de l'IL-21 chez les cellules T T_H1 humaines ²⁵⁸

alors qu'une autre la détecte chez les lymphocytes T_{H2} murines^{259,260}. L'équipe de Mehta et al. a établi que ce phénomène était régulé par deux facteurs de transcription: T-bet et NFATc2²⁶⁰. En effet, NFATc2 induit la transcription de l'IL-21 chez les cellules CD4⁺ T_{H2} alors que T-bet inhibe la capacité de NFATc2 de se lier au promoteur de l'IL-21 chez les T_{H1}²⁶⁰. Le spectre d'expression de l'IL-21R s'étend donc sur les lymphocytes B, T, NK et DC, alors que la production d'IL-21 est limitée aux cellules CD4⁺ T_{H2} et cellules stromales des organes lymphoïdes.

1.6.2 Effets biologiques de l'interleukine-21

Compte tenu de la variété de cellules exprimant le récepteur à l'IL-21, les effets biologiques de l'IL-21 ont été étudiés pour chacun des types cellulaires. La diversité des effets de l'IL-21 ne dépend pas seulement du type cellulaire, mais aussi de l'étape de différenciation ou du statut d'activation de chacun²⁶¹. Chez un modèle murin déficient en IL-21R, tous les compartiments immunitaires étaient présents et plus ou moins normaux¹⁰⁸. Cependant, le taux des IgG était très diminué alors que les IgE étaient fortement augmentées dans le sérum, donnant un aperçu du rôle de l'IL-21 dans la production d'Ig. La régulation du système immunitaire par l'IL-21 semble donc subtile et complexe.

1.6.2.1 Effets de l'IL-21 sur les lymphocytes T

La découverte d'une nouvelle cytokine requière des essais *in vitro* afin d'étudier ses rôles biologiques. L'IL-21 a été démontrée comme augmentant la prolifération de thymocytes et lymphocytes T matures CD4⁺ et CD8⁺ humains et murins via une stimulation du RCT (par un anticorps (Ac) anti-CD3)^{108,245}. De plus, l'expansion *in vitro* de lymphocytes CD8⁺ T_E spécifiques au virus CMV est stimulée par l'addition d'IL-21, suggérant un rôle important dans un contexte d'infection²⁶². Cependant, l'IL-21 endogène n'est pas essentiel à une prolifération RCT-dépendante puisque les cellules T provenant d'une souris IL-21R^{-/-} prolifèrent normalement¹⁰⁸. Par contre, le pourcentage de cellules T spécifiques à un Ag donné, le pourcentage de

leurs CTLs capables de produire de l'IFN- γ et leur activité cytolytique sont diminués comparativement à ceux provenant d'une souris contrôle ¹⁰⁶. Notre laboratoire a aussi démontré que l'IL-21 entraînait la survie des cellules T naïves CD4⁺ et, plus particulièrement, des CD8⁺ naïves ^{106,107}. Cet effet de survie est initié grâce au maintien du niveau de Bcl-2 et à l'activation de la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) ¹⁰⁷, deux facteurs importants dans la survie cellulaire ²⁶³. En absence de stimulation anti-CD3 et contrairement à d'autres membres de la famille γ_c comme l'IL-2, l'IL-7 ou l'IL-15 humaines, l'IL-21 ne peut induire la prolifération des lymphocytes T ^{245,252}. Néanmoins, L'IL-21 agit en synergie avec celles-ci pour améliorer l'expansion cellulaire ^{106,245}.

Concernant les cellules T_M, deux groupes ont obtenu des résultats opposés. Selon Kasaian et al., l'IL-21 bloquerait l'expansion de la population activée/mémoire CD44^{hi}CD8⁺ induite par l'IL-15, en plus de diminuer l'expression de l'IL-2R α (CD25) et celle de l'IL-2R β (CD122) ¹⁰⁸. L'IL-21 inhiberait donc l'expansion de la population CD8⁺ mémoire indépendante du RCT. Au contraire, l'IL-21 augmenterait le nombre de cellules T CD44^{hi}CD8⁺ en combinaison avec l'IL-15 ¹⁰⁶. Alves et al. ont confirmé que l'IL-21 promouvait l'expansion des PBMC CD8⁺ humains ainsi que celle des cellules T CD8⁺ naïves humaines induites par l'IL-15 ²⁵². Compte tenu que l'équipe de Kasaian et al. a utilisé des cellules transfectées produisant l'IL-21, il est difficile de comparer leurs résultats avec ceux de Zeng et al., qui ont testé l'IL-21 à 100 ng/mL.

Les fonctions effectrices des CTLs et des cellules T CD4⁺ « helper » sont importantes afin d'enrayer l'infection. La cytolysse et la production d'IFN- γ par les CD8⁺ cytotoxiques et les CD4⁺ T_{H1} permettent d'activer les cellules de la réponse innée (phagocytose par exemple) et de détruire les cellules infectées afin d'éliminer le pathogène. L'IL-21 a été décrit comme induisant la production d'IFN- γ et les fonctions effectrices des CTLs ^{108,262,264,265}. Au niveau des cellules T CD4⁺, l'IL-21 n'affecte pas la production d'IFN- γ par des T_{H1} préalablement formés *in vitro* ²⁵⁹. Cependant, l'ajout d'IL-21 durant la formation des T_{H1} amène une production

diminuée d'IFN- γ par les CD4⁺ T_H1. L'IL-21 a donc un rôle important à jouer dans l'activation des fonctions effectrices des lymphocytes T.

En résumé, l'IL-21 contribue à la survie des lymphocytes T naïfs. De plus, elle augmente la prolifération de ces derniers lors d'une stimulation dépendante du RCT. L'IL-21 induit l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ naïfs ou activés en combinaison avec l'IL-15 ou l'IL-7 *in vitro*. L'alliance de l'IL-21 et de l'IL-15 augmente aussi les fonctions cytolytiques ainsi que la proportion de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à l'Ag présent lors des réponses immunitaires. Finalement, pour les cellules T CD4⁺, l'addition d'IL-21 durant le développement de cellules T_H1 diminue la capacité de celles-ci à produire de l'IFN- γ .

1.6.2.2 Effets de l'IL-21 sur les lymphocytes B

Lors des premières analyses des effets de l'IL-21 sur les cellules B, il a été démontré que l'IL-21 les stimulait de façon différentielle dépendamment de l'agent utilisé pour leur activation. En effet, l'IL-21 inhibe la prolifération des cellules B humaines et murines soutenue par un anti-IgM et l'IL-4^{245,266}. Elle co-stimule l'expansion induite par un anti-CD40 chez les lymphocytes B humains²⁴⁵. **Au contraire**, cet effet est absent chez les lymphocytes B murins²⁶⁶. L'IL-21 semble donc inhiber les effets de l'IL-4 lors de l'activation des cellules B.

La fonction effectrice principale des lymphocytes B est la production d'Ac ou immunoglobulines (Ig) de différents isotypes. La souris déficiente en IL-21R possède un compartiment B qui semble normal. Cependant, elle présente une augmentation de la concentration en IgE (3X) et une réduction de la quantité d'IgG1 (3X) et d'IgG2 (2X) dans le sérum comparativement aux souris contrôles^{108,267}. Le potentiel rôle de l'IL-21 sur la commutation isotypique des cellules B, absent chez la souris IL-21R^{-/-}, a été vérifié grâce à des protocoles d'immunisation avec ovalbumine ou *Toxoplasma gondii*. Ces types d'infection génèrent une réponse qui implique une augmentation dans la production d'IgG et ne requière pas d'IgE (pour *T. gondii*). Lors de

l'immunisation des souris IL-21R^{-/-}, les niveaux d'IgG1 totaux et d'IgG2b et IgG3 spécifiques à l'Ag étaient beaucoup moindres que chez la souris sauvage. De plus, l'absence de réponse IgE contre *T. gondii* chez la souris normale était contrebalancée par un niveau vingt à vingt-cinq fois plus élevé d'IgE chez la souris IL-21R^{-/-} ²⁶⁷. La surreprésentation d'IgE a été expliquée par l'action de l'IL-4, puisqu'une souris doublement déficiente pour l'IL-4 et l'IL-21R montrait une absence d'IgE, tout en ayant un niveau très bas d'IgG1. Ceci implique donc que l'IL-21 et l'IL-4 régularaient la commutation isotypique chez les lymphocytes B. Ceci est important compte tenu que les différents types d'Ig sont utiles contre certains pathogènes de natures différentes. L'absence d'un type d'Ig peut empêcher la réponse immunitaire de s'effectuer correctement.

In vitro, l'IL-21 en combinaison avec l'IL-4 et un Ac anti-CD40 augmentent la production d'IgG1 murin ²⁶⁷, d'IgG1, d'IgG3 et d'IgG4 humains ²⁶⁸. Ceci est expliqué par l'action inhibitrice de l'IL-21 sur la transcription du gène C ϵ induite par l'IL-4 qui permet la production d'IgE par les lymphocytes B ²⁶⁹. Un défaut de signalisation dans ces deux cytokines (comme noté chez la souris IL-4^{-/-}IL-21R^{-/-} où tous les isotypes Ig sont diminués sauf les IgM) pourrait conduire à l'anomalie des cellules B observée dans le syndrome XSCID ²⁶⁷. Une souris surexprimant l'IL-21 de façon ubiquitaire contient des niveaux d'IgG, particulièrement d'IgG1, beaucoup plus élevés dans le sérum, confirmant le rôle de l'IL-21 dans la production d'IgG1 ²⁷⁰.

En plus d'influencer la commutation isotypique, l'IL-21 peut provoquer l'apoptose des cellules B naïves et activées murines *in vitro* ^{253,266}. Cet effet est causé par une diminution de l'expression des facteurs anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2, tant au niveau transcriptionnel que traductionnel. Chez les cellules B activées, l'IL-21 induit leur apoptose tout en augmentant leur entrée dans le cycle cellulaire, permettant au nombre de cellules B de rester constant. Les lymphocytes B prolifèrent donc grâce à l'IL-21 tout en entrant en apoptose, expliquant pourquoi il était pensé que l'IL-21 n'avait pas d'effet sur les cellules B de souris stimulées avec un Ac anti-CD40 ²⁶⁶. Afin d'expliquer la pertinence de ce double rôle de l'IL-21 chez les

lymphocytes B, une pré-culture de ces derniers avec un anti-CD40 pour une courte période (6h) a été effectuée avant l'ajout de l'IL-21. Cette expérience a démontré que la pré-culture avec l'anti-CD40 protégeait les cellules B de l'apoptose induite par l'IL-21 en augmentant l'expression de Bcl-xL. Cette suite d'événements rappelle sans doute une réponse immunitaire *in vivo* où le lymphocyte CD4⁺ T_H2 liera le CD40 présent sur la cellule B afin de s'activer mutuellement, permettant alors à la cellule T CD4⁺ de produire de l'IL-21 et à la cellule B protégée de l'apoptose de produire des Ig²⁶¹. Ces résultats sont contraires aux effets de l'IL-21 observés chez les lymphocytes T. En effet, l'IL-21 induit la survie des cellules T naïves tout en augmentant leur prolifération si une stimulation dépendante du RCT est présente.

D'un autre côté, l'IL-21 semble avoir des effets sur le développement des lymphocytes B *in vivo*. Un modèle murin de surexpression de l'IL-21 humain où celui-ci est transcrit de façon ubiquitaire (promoteur de CMH de classe I) démontre un maintien du nombre de cellules B matures et une forte augmentation de la population immature ainsi que des cellules plasmatiques²⁷⁰. Le rôle de l'IL-21 dans la différenciation terminale des lymphocytes B est consolidé par le fait qu'il induit l'expression de Blimp-1 et Bcl-6, des facteurs de transcription importants dans la différenciation des cellules plasmatiques et dans la formation des centres germinatifs, respectivement²⁷⁰.

Finalement, l'IL-21 possède un rôle important dans la commutation isotypique des lymphocytes B pour la production d'IgG. De plus, l'IL-21 induit l'apoptose des cellules B naïves et, plus particulièrement, celle des cellules activées via un anti-IgM ou le LPS. Au contraire, le contact de cellules B avec un anti-CD40 protège celles-ci de l'apoptose, confirmant que l'IL-21 induit la perte de lymphocytes B activés sans un signal de la part des cellules T.

1.6.2.3 Effets de l'IL-21 sur les cellules NK et DC

L'effet de l'IL-15 sur les fonctions et la viabilité des cellules NK est essentiel à la présence de celles-ci. Lors de la découverte de l'IL-21 et de sa forte homologie avec l'IL-15, les cellules NK furent les premières cibles cellulaires à être étudiées. Leur développement dans la MO a été d'abord étudié. Des cellules souches hématopoïétiques humaines ont été cultivées en présence d'IL-15, Flt3 ligand et IL-21, ce qui a permis le développement de cellules NK matures²⁴⁵. À ce moment, on croyait donc que l'IL-21 était un facteur important dans la génération de cellules NK matures de la MO. Pourtant, la souris IL-21R^{-/-} possède un développement normal des cellules NK, renversant cette hypothèse.

Le modèle murin déficient en IL-21R a aussi démontré que les cellules NK matures sont présentes en nombre normal et possèdent des fonctions cytolytiques efficaces. De plus, elles répondent très bien à des signaux activateurs (poly I:C ou IL-15)¹⁰⁸. Cependant, les effets de l'IL-21 varient selon l'espèce étudiée. Chez les NK humains matures, l'IL-21 favorise la production d'IFN- γ en synergie avec l'IL-15 et l'IL-18 et augmente leur activité cytolytique de la même façon que pour les lymphocytes T CTL^{245,271}. Toutefois, l'IL-21 inhibe la prolifération des cellules NK naïves murines induite par l'IL-15 ou l'IL-2. De plus, elle ne favorise les fonctions effectrices en combinaison avec l'IL-12 ou l'IL-15 que lorsque les NK ont été pré-activés *in vitro* ou *in vivo*¹⁰⁸. Il faut savoir que l'IL-15 est un facteur essentiel dans le développement, la survie et les fonctions effectrices des cellules NK²⁷². L'IL-21 semble donc induire la maturation terminale des cellules NK afin de stimuler leurs fonctions effectrices²⁷³. De façon intéressante, la stimulation des fonctions effectrices chez les cellules NK activées vient de pair avec une diminution de leur survie induite par l'IL-15, phénomène expliqué par Kasaian et al. comme un mécanisme ayant pour but de diminuer la participation du système inné lorsque le système adaptatif est implanté¹⁰⁸. L'IL-21 agit donc, chez les cellules NK, comme un antagoniste des effets induits par l'IL-15 dans un contexte murin.

Le rôle de l'IL-21 dans le développement et les fonctions des DC, les cellules présentatrices d'Ag par excellence, a été étudié. La génération de ces dernières *in vitro* en combinaison avec l'IL-21 a démontré une inhibition de la maturation des DC. Ceci a été observé par la diminution de l'expression du CMH de classe II ainsi que l'inhibition de l'expression de CCR7 (permettant la migration des DC matures aux ganglions). De plus, les DC développées avec l'IL-21 présentaient une augmentation de l'endocytose. Tous ces phénotypes sont caractéristiques de DC immatures²⁵⁴. Des essais de prolifération des lymphocytes T en présence de DC développées en présence d'IL-21 et chargées avec le peptide de l'ovalbumine ont démontré une capacité moindre de ces DC à induire la prolifération des cellules T. De plus, la présence d'IL-21 lors de la stimulation de DC matures par le lipopolysaccharide (LPS) inhibe l'activation de celles-ci et leur production de cytokines pro-inflammatoires²⁵⁴. Ce phénomène pourrait permettre l'anergie de lymphocytes T puisque les signaux de co-stimulation sont absents ou alors générer des lymphocytes T régulateurs²⁶¹. Cependant, dans un contexte réel, la génération de DC s'effectue dans la MO, où l'expression de l'IL-21 n'a pas été démontrée. Les DC devraient donc se développer normalement puis se localiser à l'extérieur des organes lymphoïdes secondaires dans l'attente d'Ag. Ce n'est que lors d'une rencontre avec un Ag étranger que la DC migrera aux ganglions ou à la rate, et ce processus implique la maturation de la DC. Puisque l'IL-21 est surtout produite par les lymphocytes T CD4⁺ activés, la DC ne devrait entrer en contact avec l'IL-21 qu'au moment d'entrer dans les organes lymphoïdes secondaires, moment où elle présente déjà un phénotype mature.

1.6.2.4 Signalisation par le duo IL-21/IL-21R

Les sections précédentes ont décrit les effets de l'IL-21 sur différents types cellulaires. Cependant, les rôles présentés sont le résultat d'une transduction de signaux intracellulaires par l'IL-21R et la chaîne γ_c via le système Jak/STAT mentionné dans la section 1.2.2.1 (Tableau V). Les Jak1 et Jak3 sont utilisés dans tous les types cellulaires étudiés.

TABLEAU V. SIGNALISATION JAK/STAT UTILISÉE PAR L'IL-21

Type de cellules	Jak	STAT
Leucémie de lymphocytes T (lignée humaine)	Jak1 ^{246,249} , Jak3 ²⁴⁹	STAT1, STAT5, STAT3 ²⁴⁹
Lymphocytes T CD4 ⁺ primaires (humains)	N.D. ¹	STAT1, STAT3 ²⁷⁴
Cellules B primaires (murines)	Jak1, Jak3 ²⁵⁰	STAT5 ²⁵⁰
Cellules NK (humaine)	N.D.	STAT1, STAT3, STAT4 ²⁷¹

¹ non disponible

STAT1 et STAT3 sont aussi recrutés chez les lymphocytes T et les cellules NK. Cependant, les lymphocytes B semblent préférer STAT5.

1.6.2.5 Effets de l'IL-21 dans des modèles de tumeur et d'autoimmunité

Finalement, l'augmentation des fonctions effectrices et cytolytiques des lymphocytes T_E CD8⁺ et NK par l'IL-21 trouve son utilité dans le traitement de tumeurs. Par exemple, des cellules de carcinome de côlon transfectées avec le gène d'*IL-21* murin sont rejetées lorsqu'injectées dans un hôte syngénique. De plus, ces souris développent une immunité protectrice contre cette tumeur lors d'injections ultérieures²⁷⁵. Dans un second modèle où les souris sont injectées avec un plasmide codant pour l'IL-21 et/ou l'IL-15 puis des cellules de lymphomes, il a été démontré que le mélange des deux cytokines permet la régression complète des foyers métastatiques dans le foie chez 80% des souris inoculées. Chez les souris ayant la tumeur métastatique établie, le rejet du lymphome métastatique survient chez 40% des souris injectées avec les plasmides codant pour l'IL-21 et l'IL-15²⁷⁶. Ce genre de réponse immunitaire induit par l'IL-21 a aussi été étudié dans un modèle d'adénocarcinome mammaire²⁶⁴, de thymome²⁷⁷ et de mélanome ou fibrosarcome²⁶⁵. Dans chacun des cas analysés, une population spécifique de CTL s'est développée, cellules dont les propriétés effectrices (cytolyse, production d'IFN- γ , perforine) sont augmentées. Ces résultats démontrent que l'IL-21 pourrait être un agent anti-tumeur à potentiel thérapeutique.

L'IL-21 a aussi été démontré comme ayant un effet dans le développement de cellules autoimmunitaires. Une étude dans la souris NOD, modèle de diabète de type I, a révélé qu'un pourcentage plus important de cellules T exprimait l'IL-21R comparativement à un contrôle congénique NOD contenant une région protectrice provenant d'une souris C57BL/6 (B6) (Idd3)²⁷⁸. Cependant, nous avons démontré que l'IL-21R était exprimé de façon constitutive par les lymphocytes T naïfs et activés¹⁰⁷. Ceci suggère soit que les lymphocytes T de la souris NOD n'expriment pas tous l'IL-21R, soit que la méthode de détection de l'IL-21R par ce groupe n'est pas très efficace. Il est connu que l'IL-21R est exprimé plus fortement sur les lymphocytes T activés que sur les naïves. Il serait donc possible que l'IL-21R détecté chez la souris congénique contrôle provienne des lymphocytes T activés. L'accumulation de cellules T exprimant l'IL-21R chez la souris NOD serait donc le résultat d'une augmentation de la proportion de lymphocytes T activés. Ceci serait logique compte tenu que la souris NOD est un modèle d'autoimmunité causée par les lymphocytes T activés. Ceci expliquerait pourquoi ce ne sont pas tous les lymphocytes T qui expriment l'IL-21R dans le modèle NOD si la méthode de détection n'est pas assez sensible. De plus, les auteurs mentionnent que les niveaux d'IL-21 produits par l'ensemble des lymphocytes T retrouvés dans les souris NOD sont beaucoup plus élevés. Cependant, compte tenu que l'IL-21 est connu pour être produit par les cellules T CD4⁺ activées ainsi que les cellules stromales des organes lymphoïdes, il serait logique que l'augmentation d'IL-21 provienne du fait que la majorité des CD4⁺ de la souris NOD sont activés. La comparaison entre le niveau d'IL-21 dans la souris NOD et la souris congénique devrait donc se faire sur la base des CD4⁺CD44^{hi} seulement.

Une autre étude a analysé l'effet de l'administration d'IL-21 à une souris avant l'induction de l'encéphalomyélite autoimmunitaire expérimentale (EAE). Dans ce modèle, une protéine du système nerveux central (SNC) est injectée et crée une réponse immunitaire qui conduit les lymphocytes T spécifiques à pénétrer dans le SNC, induisant la maladie²⁷⁹. Les données démontrent que l'administration d'IL-21 avant l'induction de l'EAE augmente la sévérité des symptômes. Cet effet n'est pas

observé lorsque l'IL-21 est injecté après le développement de l'EAE. Ces résultats confirment l'effet de l'IL-21 sur le développement d'une immunité dont les fonctions effectrices sont plus efficaces^{108,262,264,265}. En effet, la réponse contre l'Ag dans ce modèle est induite par les lymphocytes T activés ainsi que par les cellules NK. La production d'IFN- γ par les lymphocytes T et les cellules NK est augmentée chez les souris traitées à l'IL-21 avant l'induction de la EAE. De plus, le retrait des cellules NK avant l'injection d'IL-21 annihile les effets de cette dernière, puisque les souris déficientes en NK montrent une sévérité d'EAE égale à celle des souris contrôles²⁷⁹.

1.6.2.6 Résumé des fonctions de l'IL-21 dans le système immunitaire

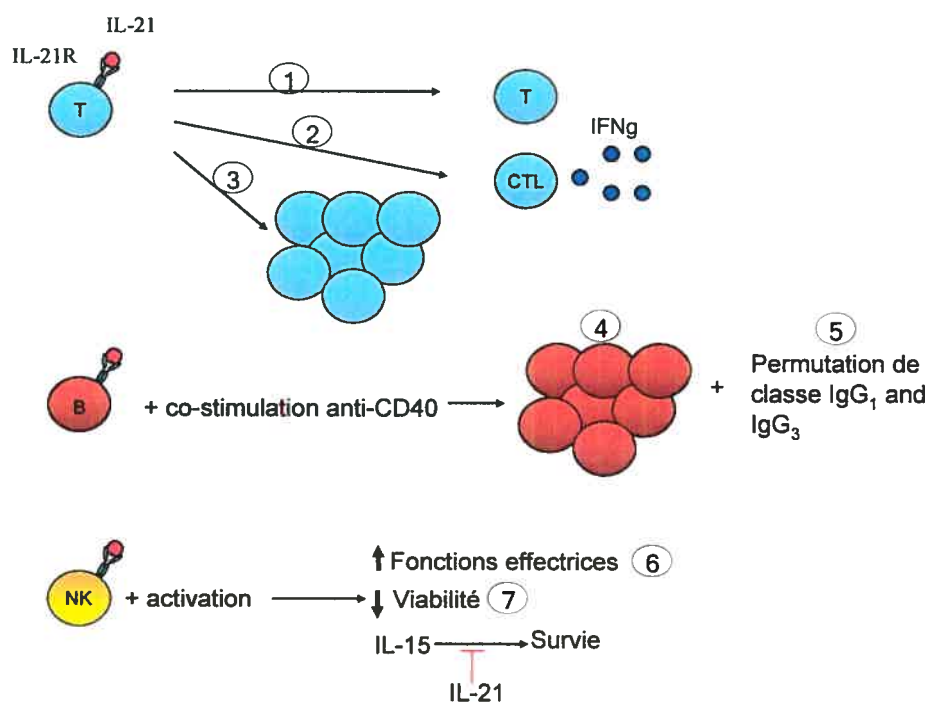


Figure 6. Résumé des fonctions de l'IL-21 dans le système immunitaire. L'IL-21 est connue pour entraîner la survie des lymphocytes T naïfs (1), stimuler les fonctions effectrices des cellules CD8⁺ cytotoxiques (2) et augmenter la prolifération induite par un signal RCT-dépendant (3). Chez les lymphocytes B, l'IL-21 stimule la prolifération (4) et active la commutation isotypique vers la production d'IgG (5). Finalement, les cellules NK activées vont présenter des fonctions effectrices augmentées (6) tout en voyant leur survie diminuée par l'IL-21 (7). En effet, l'IL-21 inhibe l'effet de survie de l'IL-15 sur les cellules NK.

L'IL-21 présente plusieurs fonctions dans le système immunitaire qui varient selon le type cellulaire répondant à l'IL-21 ainsi que le statut d'activation de la cellule. Sur les lymphocytes T naïfs, l'IL-21 induit la survie et augmente la prolifération suite à une stimulation dépendante du RCT. De plus, l'IL-21 stimule les fonctions effectrices des cellules CTL dont la production d'IFN- γ et la cytolyse. Les lymphocytes B vont proliférer suite à leur activation via un anti-CD40 en combinaison avec l'IL-21. Chez les souris, cette prolifération est accompagnée d'une entrée en apoptose des cellules B. L'IL-21 assure la commutation isotypique vers la production d'IgG₁ et IgG₃. Finalement, chez les cellules NK, l'IL-21 augmente les fonctions effectrices de celles-ci tout en diminuant l'effet de survie induit par l'IL-15 sur cette population.

PROBLÉMATIQUE

Les cytokines de classe I de la famille γ_c jouent des rôles très importants dans le développement des lymphocytes T, la régulation de leur homéostasie et de leur réponse. L'IL-7 est essentielle à la survie des lymphocytes T naïfs *in vitro* et *in vivo*. L'IL-2 et l'IL-15 induisent la prolifération et la différenciation des cellules T naïves en effecteurs. Lors de l'élimination du pathogène, l'IL-2 agit comme un antagoniste à la survie de la majorité des T_E en favorisant leur apoptose afin de retrouver un équilibre dans le pool de cellules T en périphérie. La génération des cellules T_M CD4⁺ et CD8⁺ s'effectue grâce à la présence de l'IL-7 qui induit la survie et la différenciation des lymphocytes T_E restants. La population T_M CD8⁺ est dépendante de l'IL-15 pour son auto-renouvellement alors que les cellules T CD4⁺ requièrent l'IL-7. Au moment où cette étude a été entreprise, aucune cytokine n'était connue pour la génération et la survie des lymphocytes T CD4⁺ mémoires. La découverte de l'IL-21 et de son récepteur, un nouveau duo appartenant à la famille γ_c , était donc très excitante du point de vue de l'homéostasie des lymphocytes T et, peut-être, d'un rôle chez les T_M CD4⁺. L'IL-21 partage beaucoup d'homologie avec l'IL-15, l'IL-4 et l'IL-2, alors que son récepteur est semblable à l'IL-2R β et à l'IL-4R α . De plus, il a été démontré que l'IL-21 co-stimule la prolifération des cellules T RCT-dépendante et favorise la survie des lymphocytes T naïfs en culture^{107,108,245}. Compte tenu que nous avons démontré précédemment que l'IL-21 était produite de façon constitutive par les cellules stromales des organes lymphoïdes et que son récepteur était aussi exprimé de façon constitutive, nous avons postulé que l'IL-21 est un facteur de survie des lymphocytes T naïfs et jouerait donc un rôle dans leur homéostasie *in vivo*. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons créé un modèle murin surexprimant l'IL-21 murin de façon ubiquitaire. En effet, l'ADNc de l'IL-21 murin a été placé sous le contrôle du promoteur de CMH de classe I, exprimé dans toutes les cellules, et de la séquence amplificatrice Ig. Ce promoteur est connu comme étant un promoteur fort dans les cellules T, B et NK, permettant une expression du transgène dans tous les compartiments lymphoïdes²⁸⁰. De plus, plusieurs équipes ont utilisé ce promoteur afin d'étudier les effets d'une cytokine de façon générale dans l'organisme^{270,281}.

L'objectif principal de cette étude était de caractériser les effets de la surexpression de l'IL-21 dans le modèle de souris IL-21 transgénique (Tg). Des objectifs secondaires se sont ensuite ajoutés :

- analyser l'effet de l'IL-21 sur l'homéostasie des lymphocytes T
- étudier le rôle de l'IL-21 dans l'hématopoïèse

En effet, un groupe de souris IL-21 Tg présente une accumulation de cellules T présentant un phénotype mémoire. De plus, un deuxième groupe meurt de façon précoce de ce qui semble être un défaut dans l'hématopoïèse caractérisé dans la moelle osseuse par l'accumulation de cellules myéloïdes aux dépens des lignées érythroïdes et lymphoïdes. Nous avons donc investigué l'effet inattendu de l'IL-21 dans l'hématopoïèse. Nous avons étudié l'expression de l'IL-21R par les différentes populations de progéniteurs de la moelle osseuse. De plus, nous avons tenté de déterminer si le phénotype de la MO IL-21 Tg était transmissible dans une souris receveuse irradiée.

CHAPITRE 2.
MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel et les méthodes utilisés dans la majeure partie de l'étude présentée dans ce mémoire sont décrits dans l'article qui suit cette section (Chapitre 3). Cependant, la méthodologie utilisée concernant des travaux additionnels qui ne font pas partie de l'article présenté ici, mais détaillés à la suite de ce dernier, sera décrite.

2.1.1 Essai de survie des lymphocytes T *in vitro* (article Ostiguy *et al.*, en préparation pour *Journal of Leukocyte Biology*)

2 X 10⁶ cellules de ganglions ont été cultivées sans stimulation dans du RPMI 1640 complet (supplémenté avec 10% sérum de bovin foetal, 1mM sodium pyruvate, 0.1 mM acides aminés non-essentiels, 10 mM Hepes, 10 µM β-mercaptoéthanol et de la pénicilline-streptomycine) durant 72 heures en présence d'IL-21 recombinante murine (mrIL-21) (25 ng/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN), de rIL-7 murine (10 ng/mL) (Medicorp, Montreal, Qc, Canada) ou sans cytokine. Suite à l'incubation, les cellules ont été récupérées et marquées à l'aide d'Ac anti-CD4, anti-CD8 et anti-CD44. Le 7-Amino-actinomycin D (7-AAD) (BD Pharmingen, Mississauga, ON, Canada), un composé s'intercalant dans les acides nucléiques des cellules apoptotiques ou nécrotiques, a été utilisé afin de mesurer la viabilité des lymphocytes par cytométrie en flux. Dans certaines expériences, différentes populations de lymphocytes ont été triées pour l'expression de la molécule CD44 (CD4⁺CD44^{low}, CD4⁺CD44^{hi}, CD8⁺CD44^{low} ou CD8⁺CD44^{hi}). Ces sous-populations cellulaires ont ensuite été cultivées dans les conditions et marquées avec les Ac et le 7-AAD décrites ci-dessus.

2.1.2 Analyse du phénotype des souris IL-21 Tg (chapitre 4)

Les Ac suivants ont été utilisés : anti-CD11b (M1/70.15, Cedarlane, Hornby, ON, Canada), anti-Gr1 (RB6-8C5, Caltag, Burlingame, CA), anti-Ter119 (Ter119, Cedarlane), anti-B220 (RA3-6B2, Caltag) et anti-IgM (Caltag). Les Ac CD11b et Gr-

1 détectent les monocytes et granulocytes, l'Ac Gr-1 étant plus spécifique aux granulocytes, mais exprimé de façon transitoire chez les monocytes en différenciation. L'Ac anti-Ter119 détecte les cellules érythroïdes alors que les Ac anti-B220 et -IgM identifient les lymphocytes B. Les cellules ont été analysées sur un FACSCalibur en utilisant le logiciel CellQuest (Becton Dickinson) ou WinMDI (Scripps Clinic, La Jolla, CA).

2.1.3 Reconstitution hématopoïétique à partir de la MO de souris IL-21 Tg

La MO d'une souris IL-21 Tg ou contrôle (née de la même portée et de même sexe) a été prélevée et ses lymphocytes T ont été lysés à l'aide de l'Ac anti-Thy1 et du complément de lapin (Cedarlane). La suspension cellulaire a ensuite été ajustée à 4×10^6 cellules/mL afin d'injecter par voie intraveineuse un volume de 500 μ L (2×10^6 cellules) dans une souris receveuse syngénique B6C3F1 irradiée à 1200 rad. Les souris transférées avec la MO Tg ou contrôle ont ensuite été injectées une fois par jour pendant 5 jours avec une solution RPMI : eau stérile (1 :1) afin d'éviter la déshydratation. De plus, un traitement aux antibiotiques, Aposulfatrim (2.1% v/v), a été administré durant 3 semaines dans l'eau. Les souris ayant reçu une greffe de MO ont été analysées lorsqu'elles ont montré des signes de faiblesse, d'apathie ou d'inconfort (position recroquevillée). La MO, la rate et les ganglions ont été prélevés et marqués avec les Ac mentionnés dans la section 2.1.2 ainsi que dans l'article.

2.1.4 Détection de l'IL-21R sur les progéniteurs de la moelle osseuse

La MO de quatre ou cinq souris B6 a été prélevée dans du RPMI 1640 ou du PBS 1X/2% sérum de bovin/2 mM EDTA (lorsqu'il y avait déplétion des cellules matures). Le marquage de surface comprenait : anti-Lin-bio (BD Pharmingen) (anti-CD3, -CD11b, -Gr-1, -Ter119 et -B220), anti-IL-7R α -PE (pour les CLP) ou -bio (pour les cellules myéloïdes) (A7R34, eBioscience), anti-c-Kit-APC (2B8, BD Pharmingen), anti-Sca-1-PE-Cy5 (D7, eBiosciences). La streptavidine-APC-Cy7 a été utilisée afin de détecter les Ac biotinylés. Les progéniteurs lymphoïdes (CLP) ont

été identifiés selon leur phénotype $\text{Lin}^{-}\text{IL-7R}^{+}\text{c-Kit}^{\text{lo}}\text{Sca-1}^{\text{lo}}$ alors que les précurseurs myéloïdes (CMP, GMP et MEP) sont présents dans la population $\text{Lin}^{-}\text{IL-7R}^{\text{c-}}\text{Kit}^{\text{hi}}\text{Sca-1}^{-}$. Dans certaines expériences, la suspension cellulaire de MO a été enrichie en progéniteurs grâce à une trousse EasySep® en suivant les instructions du manufacturier (Stemcell Technologies, Vancouver, CB, Canada). Brièvement, la suspension cellulaire (1×10^8 cellules/mL) a été incubée avec un mélange d'Ac (anti-Lin) couplés à la biotine. Le mélange anti-Lin comprend des Ac dirigés contre CD5 (identifie les lymphocytes T et un sous-type de cellules B, les B-1), CD11b, Gr-1, 7-4 (détecte les neutrophiles), Ter119, B220, et permet de marquer les cellules matures. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS 1X/2% sérum de bovin/2 mM EDTA, puis marquées avec un complexe tétramérique d'Ac qui reconnaît la biotine et le dextran fourni dans la trousse. Les microbilles magnétiques en dextran sont alors ajoutées et la sélection magnétique permet de récupérer la suspension enrichie en progéniteurs. L'IL-21R a été détecté sur ces différents progéniteurs suite à un marquage avec la protéine de fusion IL-21Fc ou IgG humain (contrôle négatif). L'IL-21Fc contient l'ADNc de l'IL-21 murine suivie de la portion Fc de l'IgG humaine¹⁰⁷. La détection de l'IL-21Fc s'effectue à l'aide d'un Ac anti-IgG (Fc spécifique) humain couplé à l'Alexa Fluor488 (détecté en FL1) (Caltag).

2.1.5 Détection de l'IL-21R sur les progéniteurs par RT-PCR

La MO de souris B6 a préalablement été enrichie ou non en progéniteurs grâce au kit EasySep® tel que décrit dans la section 2.1.4. Les Ac biotinylés (anti-Lin) ont été révélés avec la streptavidine-APC-Cy7. Vingt milles progéniteurs lymphoïdes (CLP) ou myéloïdes (CMP, GMP et MEP) ont été triés directement dans 1 mL de TRIzol en utilisant le FACSVantage SE. L'ARN a été extrait selon les instructions du manufacturier (Invitrogen). L'ADNc a été synthétisé par transcription inverse en utilisant des oligonucléotides synthétiques oligo(dT) (Invitrogen) et la transcriptase inverse Superscript (Invitrogen). La réaction de PCR a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques pour l'IL-21R murin (amorce 5' : 5'-GCC TTA CTC CTG CTG ATT C-3' et amorce 3' : 5'-CTG AGT CCC AGG AGA TAT C-3')

ou pour le contrôle interne HPRT (amorce 5' : 5'-GTA ATG ATC AGT CAA CGG GGG AC-3' et amorce 3' : 5'-CCA GCA AGC TTG CAA CCT TAA CCA-3'). L'amplification par PCR a été effectuée dans du tampon Taq 1X, 1.5 mM MgCl₂, 0.075 mM dNTPs, 10 pmole de chaque amorce et 0.5 U d'ADN polymérase Taq. Le produit PCR a été obtenu suite à 35 répétitions du cycle : 94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; et 72°C, 30sec.

CHAPITRE 3.
ARTICLE

AVANT-PROPOS

Quatre personnes ont participé aux travaux présentés dans l'article faisant l'objet de ce chapitre. La forte majorité des travaux, analyses et la totalité des figures ont été effectuées par l'auteur de ce mémoire, soit Eve-Line Allard. Dario Lehoux a créé le transgène utilisé dans la génération des souris IL-21 Tg et exécuté les phénotypages sur les premières souris. Julie Rooney, en sa qualité d'assistante de recherche du laboratoire, a contribué à la réalisation de certaines expériences sur la totalité des souris IL-21 Tg. En tant que chercheur principal du laboratoire, le Dr Nathalie Labrecque a élaboré le projet de recherche présenté dans ce mémoire et a grandement participé à la planification des expériences avec le premier auteur de l'article.

OVEREXPRESSION OF INTERLEUKIN(IL)-21 PROMOTES MASSIVE CD8⁺ MEMORY T CELL ACCUMULATION

Eve-Line Allard,^{1,2} Julie Rooney,¹ Dario Lehoux,¹ and Nathalie Labrecque^{1,3}

¹Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, ²Department of Microbiology and Immunology and ³Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada, H1T 2M4

Running title: IL-21 regulates CD8⁺ memory T cell homeostasis

**Abbreviations used in this paper:* γ_c , common gamma chain; B6, C57BL/6; SPF, specific pathogen free; CFSE, carboxylfluorescein succinyl ester; Tg, transgenic; O/N, overnight; LN, lymph node; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.

Address correspondence to: Nathalie Labrecque

Guy-Bernier Research Center,
Maisonneuve-Rosemont Hospital,
5415 boul. de l'Assomption,
Montreal, QC, Canada H1T 2M4
Phone:(514) 252-3552
Fax: (514) 252-3569
E-mail address: XXXXXXXXXX

Abstract

We previously demonstrated that IL-21 could mediate the survival of naïve T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺) as well as CD8⁺ memory T cells *in vitro* which led us to investigate the biological activity of IL-21 *in vivo*. Interestingly, our results have shown that overexpression of IL-21 in transgenic mice drives the accumulation of both CD4⁺ and, more conspicuously, CD8⁺ memory-like T cells. This accumulation of memory phenotype T cells was accompanied by a simultaneous reduction in naïve T cell numbers. The memory T cells found in IL-21 Tg mice possessed the functional characteristics of conventional memory T cells. They were functional given their ability to rapidly produce IFN- γ upon phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-ionomycin stimulation and to proliferate following stimulation via their TCR. In an attempt to understand why only memory T lymphocytes accumulate in IL-21 Tg mice, we have evaluated the possible influences of IL-21 on cytokine receptor expression. We have shown that IL-21 inhibits IL-7R expression on naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells *in vitro*. This might explain why naïve T cell numbers declined in IL-21 Tg mice due to a lack of IL-7 survival signals. On the other hand, IL-7R expression was not affected by IL-21 in CD4⁺ memory T cells, allowing IL-7 dependent survival of CD4⁺ memory T cells in IL-21 Tg mice. Although IL-21 also decreased IL-7R expression in CD8⁺ memory T cells, this had no impact in their survival since they are not dependant on IL-7 for their maintenance in the T cell pool. Moreover, CD8⁺ memory T cell are receptive to IL-21 survival signals thus allowing their accumulation in IL-21 Tg mice. This study identifies IL-21 as an unexpected player in T cell homeostasis and in the regulation of T cell responses to γ_c cytokines.

INTRODUCTION

The co-existence of naïve, effector and memory T lymphocytes in an immune system made of a fixed number of cells with different roles and finite life spans requires independent homeostatic regulation of the different T cell pools (1-4). This is necessary to keep an optimal immune system all life long; an individual should be able to respond to new pathogens and to recurrent infectious agents at any time. Members of the common gamma chain (γ_c) cytokine family and TCR signals play

important and distinct roles in the homeostasis of the different T cell pools. The maintenance of the naïve CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte pool is mainly regulated through TCR interaction with self-MHC molecules (5-12) and IL-7 signals (5, 13-15). Unlike naïve T lymphocytes, memory CD4⁺ and CD8⁺ T cell survival is independent of TCR-MHC interactions (16-18) but requires cytokine signals. The survival of CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells is regulated by different cytokines. It has been shown that CD8⁺ memory T cells require IL-15 for their long-term maintenance (19-23) while memory CD4⁺ T lymphocytes are dependent on IL-7 for their survival in the T cell pool (24, 25). Although naïve and memory T lymphocytes occupy independent homeostatic niches (3, 26), it is intriguing that CD4⁺ memory T cells need IL-7 like the CD4⁺ and CD8⁺ naïve T cell pool. This raises the possibility that other homeostatic signal(s), such as other γ_c cytokine, allow(s) for the independent non-competitive maintenance of naïve and CD4⁺ memory T lymphocytes. In this context, the recent identification of IL-21 and IL-21R, which are members of the γ_c cytokine/receptor family, is of particular interest.

IL-21 and its receptor (IL-21R) are the most recent γ_c cytokine/receptor pair identified (27, 28). IL-21R associates with γ_c which is required for signal transduction following ligand binding (29, 30). IL-21 has pleiotropic effects on B lymphocytes, T cells, dendritic cells, and NK cells (reviewed in (31)), but the only prominent phenotype identified to date in the IL-21 or IL-21R-deficient murine model is an increase in IgE production by B lymphocytes while IgG₁ production is decreased (32, 33).

IL-21 was originally found to be produced by activated CD4⁺ T lymphocytes (27), but recent evidences revealed a Th2 subset-specific expression (34). Moreover, we have recently identified that stromal cells might produce a constitutive source of IL-21 in the immune system (35). In T lymphocytes, IL-21 was shown to co-stimulate anti-CD3-induced proliferation in addition to increasing IFN- γ production and effector cell functions in CTLs (27, 32, 36). IL-21 was also found to synergize with IL-15 and, to a lower extent, with IL-7, in regulating the function and expansion of naïve and memory-phenotype CD8⁺ lymphocytes (37). Moreover, we recently

described results demonstrating a role for IL-21 in mediating the survival of naïve CD4⁺, CD8⁺, and, to a lesser extent, of CD8⁺ memory T cells *in vitro* (35).

Since we previously demonstrated that IL-21 could mediate the survival of naïve T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺) as well as CD8⁺ memory T cells *in vitro*, we decided to investigate its biological activity *in vivo* by overexpressing IL-21 in transgenic mice. Interestingly, our results show that overexpression of IL-21 in transgenic (Tg) mice drives the accumulation of both CD4⁺ and, more conspicuously, CD8⁺ memory-like T cells. This accumulation of memory phenotype T cells is accompanied by a simultaneous reduction in naïve T cell numbers. The memory T cells found in IL-21 Tg mice possess the functional characteristics of conventional memory T cells. They are functional given their ability to rapidly produce IFN- γ upon phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-ionomycin stimulation and to proliferate following stimulation via their TCR. In an attempt to understand why only memory T lymphocytes accumulate in IL-21 mice, we have evaluated the possible influences of IL-21 on the cell surface expression of cytokine receptors. We have shown that IL-21 inhibits IL-7R expression on naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells *in vitro*. This might explain why naïve T cell numbers declined in IL-21 Tg mice due to a lack of IL-7 survival signals. On the other hand, IL-7R expression was not affected by IL-21 in CD4⁺ memory T cells, allowing IL-7 dependent survival of CD4⁺ memory T cells in IL-21 Tg mice. Although, IL-21 also decreased IL-7R expression in CD8⁺ memory T cells, this had no impact in their survival since they were not dependant on IL-7 for their maintenance in the T cell pool. Moreover, CD8⁺ memory T cells are receptive to IL-21 survival signals (35) thus allowing their accumulation in IL-21 Tg mice. This study identifies IL-21 as an unexpected player in T cell homeostasis and in the regulation of T cell responses to γ_c cytokines.

RESULTS AND DISCUSSION

Generation and characterization of IL-21 Tg mice

Our recently obtained data have demonstrated a role for IL-21 in promoting survival of naïve CD4⁺ and CD8⁺ as well as activated/memory CD8⁺ T cells *in vitro* (35). Moreover, we have shown that IL-21 is constitutively produced by lymphoid organ

stromal cells and that IL-21R is constitutively expressed by T cells (35). This led us to hypothesize that overproduction of IL-21 in transgenic mice might enlarge the naïve T cell pool by promoting naïve T cell survival. To test this possibility, we overexpressed IL-21 in mice using a transgene (Fig. 1A) in which IL-21 expression is driven by the MHC class I promoter and Ig enhancer (38). Unexpectedly, IL-21 Tg mice had a drastically shortened life span (Fig. 1 B). Moreover, all transgenic mice were smaller in size and weight (usually 50% of wt negative littermate, data not shown). Unfortunately, the impaired survival of IL-21 Tg mice prevented breeding and backcrossing to C57BL/6 (B6) mice. To study the effects of IL-21 overexpression, we generated 31 independent IL-21 Tg founders. Importantly, histological analysis of all organs in IL-21 Tg mice showed no gross abnormalities (data not shown). Moreover, we never detected any leukocytic infiltrations nor tumour development in IL-21 Tg mice (data not shown). Further analysis of IL-21 Tg mice revealed that their death occurred due to a defect in hematopoiesis, which led to the accumulation of myeloid cells and severely reduced erythropoiesis (È.-L. Allard and N. Labrecque, manuscript in preparation). Based on their survival, IL-21 Tg mice could be divided into two groups of mice. The group 1 contains mice (~70%) whose life span spreads the first three weeks following birth, while group 2 represents the remaining mice. Only analyses of the T cell phenotype in IL-21 Tg mice from group 2 are presented here since very young mice (group 1) had very few T cells.

Characterization of T cells from IL-21 Tg mice

To evaluate the effect of IL-21 overexpression in mice, we analyzed the cellular composition of secondary lymphoid organs in wt and IL-21 Tg mice. Fig. 2 A shows that mature T and B cells were present in the lymph nodes (LNs) and spleen of IL-21 Tg mice. The proportion (Fig. 2A) and number (Fig. 3A and C) of the different B cell populations were not affected by IL-21 overexpression. However, the distribution and numbers of T cell subsets were affected in both the spleen and LNs of IL-21 Tg mice (Fig. 2 A and Fig. 3 A, C). We always observed a decrease in the percentage and numbers of CD4⁺ T cells in secondary lymphoid organs of IL-21 Tg mice when compared with their negative littermates (Fig. 2 A and Fig. 3 A, C). Moreover, CD8⁺

T lymphocytes were increased in proportion and in numbers in IL-21 Tg mice (Fig. 2 A and Fig. 3 A, C). The decreased representation of CD4⁺ T cells and the simultaneous increase in CD8⁺ T cells led to a reduction in the CD4/CD8 ratio in IL-21 Tg mice. Importantly, IL-21 overexpression had only little impact on the absolute cell numbers that were recovered from LNs and spleen (Fig. 3 C). This is strike contrast to what is observed when the prosurvival cytokine, IL-7, is overexpressed *in vivo* (39).

To understand why CD8⁺ T cells accumulate, we further evaluated the composition of the T cell pool in the secondary lymphoid organs of IL-21 Tg mice. We stained T lymphocytes with mAbs directed against markers specific for naïve, activated and memory T cell subsets. Most of their spleen and lymph node (LN) T cells had a naïve phenotype (CD44^{lo} and CD62L^{hi}). Unexpectedly, most of the IL-21 Tg CD4⁺ and CD8⁺ T cells were bearing hallmarks of a memory phenotype (CD44^{hi} and CD62L^{lo}) compared to their wt littermates (Fig. 2 B,C). We further confirmed their memory phenotype by staining IL-21 Tg T lymphocytes with markers known to be specific for memory T cells. Remarkably, the majority of CD8⁺ T cells (53-88%) in IL-21 Tg mice possessed a memory phenotype as illustrated by their high level of expression of CD44, Ly6C (Fig. 2 B,C) and CD122 (data not shown). Similarly, a high proportion (35-54%) of CD4⁺ T cells had a memory phenotype as shown by their high level of CD44 and low level of CD45RB expression, albeit to a lesser extent than their CD8⁺ T cell counterpart. The expression of activation markers such as CD25 and CD69 was similar in IL-21 Tg and wt mice (data not shown). The accumulation of memory CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes was even more impressive in absolute cell numbers (Fig. 3 A, B). The increased number of CD8⁺ memory phenotype T lymphocytes explains the decreased CD4/CD8 ratio in IL-21 Tg mice (Fig. 2 A,B and Fig. 3 A,B). Moreover, the reduced numbers of CD4⁺ T cells mainly accounted for a loss in naïve CD4⁺ T cells (~5-fold reduction) (Fig. 3A,B).

To determine whether the enlargement in the memory T cell pool in IL-21 Tg mice arose due to clonal or oligoclonal expansion of T cells, we analyzed T cell TCR V β repertoire in IL-21 Tg mice using a panel of different anti-TCR V β Abs. As

shown in Fig. 2D, no skewing in TCR V β usage was observed in IL-21 Tg mice when compared to wt mice (negative littermates).

These results suggested that IL-21 promoted the survival of memory T cells which led to their accumulation, mostly of CD8⁺, at the expense of naïve T cells. These results seem to confirm our previous data indicating a role for IL-21 in promoting survival of memory phenotype CD8⁺ T cells while they are in conflict with our observations that IL-21 promotes naïve T cell survival (35). Moreover, the accumulation of memory phenotype T cells that we observed in IL-21 Tg mice was similar to the one observed by Kieper et al. when they overexpressed IL-7, except for the maintenance of a normal reservoir of naïve T cells in IL-7 Tg mice (39). The experiments described below evaluated the functionality of memory-phenotype T lymphocytes and suggest a possible mechanism for memory T cell accumulation and naïve T cell loss in IL-21 Tg mice.

Functionality of IL-21 Tg memory phenotype T cells

We evaluated the functional capacity of IL-21 Tg memory T cells based on two characteristics. First, upon an *in vitro* 4-hour restimulation with PMA-ionomycin, memory T cells will produce IFN- γ while naïve T lymphocytes will not be able to secrete IFN- γ in such a short period of time (40, 41). Second, memory T cells will undergo quicker mitogen-induced proliferation and will respond to lower dose of Ag or mitogen than naïve T cells (42-44). As shown in Fig. 4 A, IL-21 Tg and wt CD4⁺ memory T cells (CD44^{hi} and CD45RB^{lo}) produced IFN- γ in similar proportion, 44% and 38% respectively, after 4h of stimulation with PMA and ionomycin. The levels of production as evaluated with the mean fluorescence intensity (MFI) were comparable in IL-21 Tg and wt memory CD4⁺ T cells (124 versus 195). Strikingly, the proportion of CD8⁺ memory T lymphocytes (CD44^{hi} and Ly6C^{hi}) synthesizing IFN- γ was much higher in IL-21 Tg (91%) than in wt (70%) mice (Fig. 4A). Moreover, the level of IFN- γ production was also higher in IL-21 Tg (MFI of 427) than in wt (MFI of 240) memory CD8⁺ T lymphocytes. Furthermore, the comparison of IFN- γ production by all CD8⁺ T cells in IL-21 Tg and wt mice confirmed the memory phenotype seen in IL-21 Tg mice. As shown in Fig. 4A, 78% of Tg CD8⁺ T

cells produced IFN- γ , while only 33% of CD8⁺ T cells did in littermates. The higher level of IFN- γ produced by IL-21 Tg CD8⁺ memory T cells compared to those from wt mice may have arisen from the known ability of IL-21 to increase effector functions in T cells (27, 32, 36, 37).

We then monitored the proliferative capacity of Tg CD44^{hi} T cells to different concentrations of anti-CD3 Abs (0.03 to 3 μ g/mL) after 72h of stimulation using CFSE labelled T cells. IL-21 Tg CD44^{hi} CD4⁺ T cells initiated proliferation at 0.1 μ g/mL of anti-CD3 Abs as did their wt counterparts (Fig. 4B). At higher concentration of anti-CD3 Abs, we saw the appearance of a population of T cells refractory to proliferation only in IL-21 Tg mice. Further studies are required to understand why some CD44^{hi} CD4⁺ T cells do not proliferate following anti-TCR stimulation. On the other hand, CD44^{hi} CD8⁺ T cells from IL-21 Tg mice showed massive and more extensive proliferation (Fig. 4B) at the lowest anti-CD3 Abs concentration used (0.03 μ g/mL) when compared to wt CD44^{hi} CD8⁺ T cells. As shown in Fig. 4B, only 35% of IL-21 Tg CD44^{hi} CD8⁺ T cells did not proliferate compared to 81% in wt mice.

Until now, we demonstrated that overexpression of IL-21 resulted in the acquisition of a memory phenotype for most of the Tg CD8⁺ and about a third of Tg CD4⁺ T cells. These IL-21 Tg memory T cells were shown to have enhanced functional capacities in terms of IFN- γ production following PMA-ionomycin stimulation and were able of TCR-dependent proliferation. However, we were puzzled with the fact that we previously described IL-21 as mediating the survival of naïve T cells *in vitro* (35), but these were remarkably reduced in cell number and proportion in IL-21 Tg mice. Moreover, we also have previously demonstrated that, *in vitro*, IL-21 alone did not promote the conversion of naïve T cells (CD44^{lo}) towards an activated/memory (CD44^{hi}) phenotype. Since IL-15 Tg mice show increased numbers of Ag-specific CD8⁺ Tm *in vivo* (45-47) and IL-21 is known to synergize with IL-15 in the expansion of CD8⁺ T cells (37), it might be that overexpression of IL-21, together with the *in vivo* available IL-15, drives naïve CD8⁺ T cells into homeostatic proliferation which leads to the acquisition of memory CD8⁺ T cell phenotype (48). However, this did not explain the disappearance of naïve CD4⁺

lymphocytes, which are not responsive to IL-15 signals. A possible explanation was that IL-21 regulated cell surface expression of cytokine receptors involved in the regulation of T cell survival and homeostasis. A similar situation was recently observed by Park et al. who have shown that members of the γ_c cytokine family downregulate cell surface expression of the IL-7R (49).

Suppression of IL-21R, IL-7R α and IL-2R β expression by IL-21 *in vitro*

To try to understand the potential outcomes IL-21 had *in vivo* on T cell homeostasis, we determined the effect of IL-21 on IL-21R, IL-7R α and IL-2R β (CD122) expression by T cells after 48h of *in vitro* exposure to the cytokine. In our analysis of cytokine receptor expression, we separated T cells based on their expression of CD4, CD8 and CD44 to discriminate effects on naïve versus activated/memory T lymphocytes. In contradiction to another report which showed the opposite (on human naïve CD8⁺ T cells) (50), in our hands, IL-21 exposure of resting T cells led to the downregulation of its own receptor expression on all T cell subsets analyzed (Fig. 5). This was an interesting observation since γ_c cytokines are known to usually upregulate their own receptor expression (51, 52), the only exception being IL-7 (49). Very interestingly, IL-7 was reported to inhibit IL-7R expression *in vitro* and *in vivo*, thus allowing more naïve T cells to receive survival signals through the limited amounts of IL-7 (49). It is tempting to speculate that IL-21 down-regulates its own receptor expression for the same reason as IL-7. This reinforced a possible role for IL-21 in T cell survival and homeostasis.

The recent observation that the other prosurvival γ_c cytokines (IL-2, IL-4, IL-6 and IL-15) reduced IL-7R expression on resting T cells (49) leads us to evaluate if the newest γ_c cytokine, IL-21, also influences IL-7R expression. A possible influence of IL-21 on IL-7R expression in T lymphocytes of IL-21 Tg mice might explain the reduced number of naïve T cells observed in our IL-21 Tg mice. Thus, we evaluated the expression of the IL-7R on T cells after an *in vitro* exposure of 48h to IL-21. As other γ_c cytokines, IL-21 reduced IL-7R expression on both CD4⁺ and CD8⁺ naïve (CD44^{lo}) T cells (Fig. 5). This may have huge impact on the *in vivo* survival of naïve T cells in our IL-21 Tg mice since IL-7 is critical for their survival and maintenance

in the T cell pool (13, 15). However, this suggested that IL-21 signals can not replace IL-7 effect in promoting naïve T cell survival in our IL-21 Tg mice. This was intriguing since both IL-7 and IL-21 promoted T cell survival by inducing the expression of the anti-apoptotic molecule Bcl-2 and by activating the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway (35, 53, 54). Nevertheless, we cannot exclude a simple toxic effect of massive amounts of IL-21 causing death of naïve T cells in our Tg model, although it is difficult to understand how this effect would only occur in naïve T lymphocytes.

We further evaluated if *in vitro* IL-21 exposure influenced IL-7R expression by activated/memory (CD44^{hi}) T cells (Fig. 5). Indeed, IL-7R expression was reduced on CD44^{hi} CD8⁺ T cells, but maintained on CD44^{hi} CD4⁺ T lymphocytes (Fig. 5). CD8⁺ memory T cells are independent of IL-7 for their maintenance (13), so reduced expression of IL-7R should not affect their survival in IL-21 Tg mice. A different picture emerged for CD44^{hi} CD4⁺ T cells. As shown in Fig. 5, *in vitro*, IL-21 had no effect on IL-7R expression by CD44^{hi} CD4⁺ T lymphocytes. Very interestingly, the CD4⁺ memory T cell pool was enlarged in IL-21 Tg mice despite our observations that IL-21 was not able to promote memory phenotype CD4⁺ T cell survival. The lack of effect of IL-21 on IL-7R expression on CD44^{hi} CD4⁺ T cells might allow for their efficient maintenance *in vivo* in IL-21 Tg mice. Furthermore, their increase in number observed in IL-21 Tg mice might have resulted from the enhanced availability of IL-7 due to reduced consumption of IL-7 by naïve T cells that lost IL-7R in IL-21 Tg mice.

Finally, we looked at the effect of IL-21 exposure on the expression of the IL-2R β (CD122) chain by resting T cells. The IL-2R β chain is used by both the IL-2R and IL-15R and is mostly expressed by CD44^{hi} CD8⁺ T cells. In opposition to Alves et al. (50), but in agreement with Kasaian et al. (32), IL-2R β expression was decreased but not completely abrogated on activated/memory CD8⁺ T cells following culture with IL-21. This was unexpected given the CD8⁺ memory phenotype seen in IL-21 Tg mice and the importance of IL-15 in promoting survival of these cells. One way to reconcile these data is the fact that both IL-15 and IL-21 have survival effects on CD8⁺ memory T cell population (19-23, 35), and that high levels of IL-2R β

expression are not needed for IL-15-induced CD8⁺ memory T cell proliferation or survival (23). Moreover, it was shown that a population of IL-15-independent CD8⁺ memory T cells with a CD44^{hi}CD122^{lo} phenotype was still present in IL-15^{-/-} or IL-15R^{-/-} mice (20, 55). The survival and/or proliferation of these cells may be dependent on IL-21, explaining their presence in IL-15^{-/-} and IL-15R^{-/-} mice.

In conclusion, IL-21 Tg mice revealed a new role for IL-21 in promoting memory T cell accumulation. Moreover, IL-21 overexpression led to an imbalance in normal T cell homeostasis by affecting expression of cytokine receptors participating in the regulation of the different T cell pool maintenance. These new functions of IL-21 will have to be considered before manipulating IL-21 levels in patients to treat cancer or autoimmune disease.

MATERIAL AND METHODS

Mice and generation of IL-21 Tg mice. C57BL/6 (B6) mice were obtained from Charles River (USA) or bred at the Guy-Bernier Research Center under SPF conditions. To generate IL-21 Tg mice, the full-length murine IL-21 cDNA was amplified by PCR and subcloned into the pHSE vector, which contains the H-2k^b promoter, the Ig enhancer and the human β -globin splicing and polyadenylation sequences (38). Tg mice were generated by microinjection of the transgene into (B6XC3H)F1 eggs using standard procedure. IL-21 Tg mice were genotyped by southern blot using a probe derived from the IL-21 cDNA. Mice were used according to the protocols approved at the Guy-Bernier Research Center.

Flow cytometry. The following Abs were used: anti-CD4 (L3/T4, Cedarlane), anti-CD8 (53-6.7, BD Biosciences; CT-CD8a, Cedarlane), anti-CD44 (IM7, BD Biosciences), anti-CD62L (MEL-14, Caltag), anti-Ly6C (AL-21, BD Biosciences), anti-CD122 (5H4 or TM- β 1, BD Biosciences), anti-CD45RB (16A, BD Biosciences), anti-B220 (RA3-6B2, Caltag), anti-IgM (Caltag), anti-IL-7R α (A7R34, eBioscience), and anti-TCR V β screening panel (BD Biosciences). Cell stainings were performed on ice in FACSwash (DMEM without phenol red supplemented with 3% heat-inactivated horse serum, 0.03M HEPES and 0.1% NaN₃) and analyzed on a FACSCalibur using CellQuest software (Becton Dickinson) or WinMDI software (from Joseph Trotter, Scripps Clinic, La Jolla, CA).

IL-21R expression was detected as previously described (35). Briefly, cells were incubated with 50 ng of IL-21Fc fusion protein or human IgG followed by biotinylated-goat F(ab')₂ anti-human IgG (Fc specific) (Caltag) and SA-PerCP (Caltag).

Detection of *ex vivo* IFN- γ production. Splenocytes (10⁶ cells/mL) were stimulated with PMA (50 ng/mL, Sigma-Aldrich) and ionomycin (500 ng/mL, Sigma-Aldrich) in complete RPMI medium supplemented with 10% FBS (Invitrogen) for 4h at 37°C. 10 μ g of brefeldin A (Sigma-Aldrich) per mL of cells was added to the culture for the last 2h. Cells were fixed in 2% formaldehyde in PBS 1.2X for 20 min at room

temperature. 10^6 cells were stained with anti-IFN- γ (clone XMG1.2, Caltag) Abs diluted in 0.5% saponin (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature. Cells were washed twice before cell surface staining with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RB and anti-Ly6C Abs.

Anti-CD3 stimulation. Splenocytes (10^7 /mL in PBS) were labelled with 0.5 μ M CFSE (Molecular probes, Eugene, OR) for 10 min at 37°C and then washed 3 time in RPMI supplemented with 10% FBS. 2×10^6 CFSE labelled cells were stimulated in 24-well plates coated with different concentrations (0 to 3 μ g/mL) of anti-CD3 Abs (145-2C11, Cedarlane). After 72h, cells were harvested and stained with anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD44 Abs before FACS analysis.

Effect of IL-21 on γ_c cytokine receptor expression. B6 LN cells (2×10^6 cells/mL) were cultured for 48h in RPMI complete medium containing murine rIL-21 (25 ng/mL) (R&D Systems) or murine rIL-7 (10 ng/mL) (Medicorp). Cells were harvested and then stained with either anti-IL-7R α or anti-IL-2R β mAbs or IL-21Fc fusion protein in combination with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44 Abs followed by FACS analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Sebastien Harton and Éric Milot for the production of IL-21 Tg mice. We acknowledge Caroline Meunier for help with histological analysis of Il-21 Tg mice. We are grateful to Claude Perreault and Rafick-Pierre Sékaly for critical reading of the manuscript.

This work was supported by a pilot project grant no NIP-67713 from the Canadian Institutes of Health and Research (CIHR) and by grant from Valorisation Recherche Québec to N. Labrecque. The Guy-Bernier Research Center FACS facility is supported by a multi-user maintenance grant (no MME-67439) from the CIHR. N. Labrecque is supported by a CIHR new investigator salary award. È.-L. Allard received a studentship from University of Montreal.

The authors have no conflicting financial interests.

REFERENCES

1. Jameson, S.C. 2002. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2:547-556.
2. Tanchot, C., and B. Rocha. 1997. Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output. *J Exp Med* 186:1099-1106.
3. Tanchot, C., and B. Rocha. 1995. The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8+ T cell pools. *Eur J Immunol* 25:2127-2136.
4. Tanchot, C., and B. Rocha. 1998. The organization of mature T-cell pools. *Immunol Today* 19:575-579.
5. Boursalian, T.E., and K. Bottomly. 1999. Survival of naive CD4 T cells: roles of restricting versus selecting MHC class II and cytokine milieu. *J Immunol* 162:3795-3801.
6. Tanchot, C., F.A. Lemonnier, B. Perarnau, A.A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276:2057-2062.
7. Takeda, S., H.R. Rodewald, H. Arakawa, H. Bluethmann, and T. Shimizu. 1996. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 5:217-228.
8. Rooke, R., C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis. 1997. Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity* 7:123-134.
9. Kirberg, J., A. Berns, and H. von Boehmer. 1997. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med* 186:1269-1275.
10. Nestic, D., and S. Vukmanovic. 1998. MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8+ thymic emigrants. *J Immunol* 160:3705-3712.
11. Brocker, T. 1997. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* 186:1223-1232.
12. Witherden, D., N. van Oers, C. Waltzinger, A. Weiss, C. Benoist, and D. Mathis. 2000. Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med* 191:355-364.

13. Schluns, K.S., W.C. Kieper, S.C. Jameson, and L. Lefrancois. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1:426-432.
14. Vivien, L., C. Benoist, and D. Mathis. 2001. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int Immunol* 13:763-768.
15. Tan, J.T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K.I. Weinberg, and C.D. Surh. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8732-8737.
16. Garcia, S., J. DiSanto, and B. Stockinger. 1999. Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity* 11:163-171.
17. Swain, S.L., H. Hu, and G. Huston. 1999. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* 286:1381-1383.
18. Murali-Krishna, K., L.L. Lau, S. Sambhara, F. Lemonnier, J. Altman, and R. Ahmed. 1999. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286:1377-1381.
19. Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D.F. Tough, and J. Sprent. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8:591-599.
20. Lodolce, J.P., D.L. Boone, S. Chai, R.E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin, and A. Ma. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9:669-676.
21. Ku, C.C., M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler, and P. Marrack. 2000. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288:675-678.
22. Kennedy, M.K., M. Glaccum, S.N. Brown, E.A. Butz, J.L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C.R. Willis, K. Brasel, P.J. Morrissey, K. Stocking, J.C. Schuh, S. Joyce, and J.J. Peschon. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 191:771-780.
23. Berard, M., K. Brandt, S. Bulfone-Paus, and D.F. Tough. 2003. IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *J Immunol* 170:5018-5026.
24. Kondrack, R.M., J. Harbertson, J.T. Tan, M.E. McBreen, C.D. Surh, and L.M. Bradley. 2003. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med* 198:1797-1806.

25. Seddon, B., P. Tomlinson, and R. Zamoyska. 2003. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* 4:680-686.
26. Freitas, A.A., and B. Rocha. 2000. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu Rev Immunol* 18:83-111.
27. Parrish-Novak, J., S.R. Dillon, A. Nelson, A. Hammond, C. Sprecher, J.A. Gross, J. Johnston, K. Madden, W. Xu, J. West, S. Schrader, S. Burkhead, M. Heipel, C. Brandt, J.L. Kuijper, J. Kramer, D. Conklin, S.R. Presnell, J. Berry, F. Shiota, S. Bort, K. Hambly, S. Mudri, C. Clegg, M. Moore, F.J. Grant, C. Lofton-Day, T. Gilbert, F. Rayond, A. Ching, L. Yao, D. Smith, P. Webster, T. Whitmore, M. Maurer, K. Kaushansky, R.D. Holly, and D. Foster. 2000. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408:57-63.
28. Ozaki, K., K. Kikly, D. Michalovich, P.R. Young, and W.J. Leonard. 2000. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11439-11444.
29. Asao, H., C. Okuyama, S. Kumaki, N. Ishii, S. Tsuchiya, D. Foster, and K. Sugamura. 2001. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* 167:1-5.
30. Habib, T., S. Senadheera, K. Weinberg, and K. Kaushansky. 2002. The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3. *Biochemistry* 41:8725-8731.
31. Leonard, W.J., and R. Spolski. 2005. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* 5:688-698.
32. Kasaian, M.T., M.J. Whitters, L.L. Carter, L.D. Lowe, J.M. Jussif, B. Deng, K.A. Johnson, J.S. Witek, M. Senices, R.F. Konz, A.L. Wurster, D.D. Donaldson, M. Collins, D.A. Young, and M.J. Grusby. 2002. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* 16:559-569.
33. Ozaki, K., R. Spolski, C.G. Feng, C.F. Qi, J. Cheng, A. Sher, H.C. Morse, 3rd, C. Liu, P.L. Schwartzberg, and W.J. Leonard. 2002. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298:1630-1634.
34. Wurster, A.L., V.L. Rodgers, A.R. Satoskar, M.J. Whitters, D.A. Young, M. Collins, and M.J. Grusby. 2002. Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that

- specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells. *J Exp Med* 196:969-977.
35. Ostiguy, V., E.-L. Allard, and N. Labrecque. 2005. IL-21 promotes T lymphocyte survival. *J Leukoc Biol* In preparation.
 36. Ma, H.L., M.J. Whitters, R.F. Konz, M. Senices, D.A. Young, M.J. Grusby, M. Collins, and K. Dunussi-Joannopoulos. 2003. IL-21 activates both innate and adaptive immunity to generate potent antitumor responses that require perforin but are independent of IFN-gamma. *J Immunol* 171:608-615.
 37. Zeng, R., R. Spolski, S.E. Finkelstein, S. Oh, P.E. Kovanen, C.S. Hinrichs, C.A. Pise-Masison, M.F. Radonovich, J.N. Brady, N.P. Restifo, J.A. Berzofsky, and W.J. Leonard. 2005. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med* 201:139-148.
 38. Pircher, H., T.W. Mak, R. Lang, W. Ballhausen, E. Ruedi, H. Hengartner, R.M. Zinkernagel, and K. Burki. 1989. T cell tolerance to Mlsa encoded antigens in T cell receptor V beta 8.1 chain transgenic mice. *Embo J* 8:719-727.
 39. Kieper, W.C., J.T. Tan, B. Bondi-Boyd, L. Gapin, J. Sprent, R. Ceredig, and C.D. Surh. 2002. Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med* 195:1533-1539.
 40. Cho, B.K., C. Wang, S. Sugawa, H.N. Eisen, and J. Chen. 1999. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2976-2981.
 41. Bachmann, M.F., M. Barner, A. Viola, and M. Kopf. 1999. Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *Eur J Immunol* 29:291-299.
 42. Byrne, J.A., J.L. Butler, and M.D. Cooper. 1988. Differential activation requirements for virgin and memory T cells. *J Immunol* 141:3249-3257.
 43. Bruno, L., J. Kirberg, and H. von Boehmer. 1995. On the cellular basis of immunological T cell memory. *Immunity* 2:37-43.
 44. Rogers, P.R., C. Dubey, and S.L. Swain. 2000. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* 164:2338-2346.
 45. Marks-Konczalik, J., S. Dubois, J.M. Losi, H. Sabzevari, N. Yamada, L. Feigenbaum, T.A. Waldmann, and Y. Tagaya. 2000. IL-2-induced activation-induced

- cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11445-11450.
46. Fehniger, T.A., K. Suzuki, A. Ponnappan, J.B. VanDeusen, M.A. Cooper, S.M. Florea, A.G. Freud, M.L. Robinson, J. Durbin, and M.A. Caligiuri. 2001. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med* 193:219-231.
 47. Nishimura, H., T. Yajima, Y. Naiki, H. Tsunobuchi, M. Umemura, K. Itano, T. Matsuguchi, M. Suzuki, P.S. Ohashi, and Y. Yoshikai. 2000. Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo. *J Exp Med* 191:157-170.
 48. Surh, C.D., and J. Sprent. 2000. Homeostatic T cell proliferation: how far can T cells be activated to self-ligands? *J Exp Med* 192:F9-F14.
 49. Park, J.H., Q. Yu, B. Erman, J.S. Appelbaum, D. Montoya-Durango, H.L. Grimes, and A. Singer. 2004. Suppression of IL7 α Transcription by IL-7 and Other Prosurvival Cytokines; A Novel Mechanism for Maximizing IL-7-Dependent T Cell Survival. *Immunity* 21:289-302.
 50. Alves, N.L., F.A. Arosa, and R.A. van Lier. 2005. IL-21 sustains CD28 expression on IL-15-activated human naive CD8+ T cells. *J Immunol* 175:755-762.
 51. Depper, J.M., W.J. Leonard, C. Drogula, M. Kronke, T.A. Waldmann, and W.C. Greene. 1985. Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4230-4234.
 52. Ohara, J., and W.E. Paul. 1988. Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8221-8225.
 53. von Freeden-Jeffry, U., N. Solvason, M. Howard, and R. Murray. 1997. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 7:147-154.
 54. Pallard, C., A.P. Stegmann, T. van Kleffens, F. Smart, A. Venkitaraman, and H. Spits. 1999. Distinct roles of the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT5 pathways in IL-7-mediated development of human thymocyte precursors. *Immunity* 10:525-535.
 55. Judge, A.D., X. Zhang, H. Fujii, C.D. Surh, and J. Sprent. 2002. Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J Exp Med* 196:935-946.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Impaired survival of IL-21 transgenic mice. (A) Structure of the IL-21 transgene. The murine IL-21 cDNA (450 pb) was subcloned into the pHSE vector containing the H-2K^b promoter, Ig enhancer and the human β -globin splicing and polyadenylation sequences. X, *XhoI*; S, *SallI*; B, *BamHI*; E, *EcoRI*. (B) Survival curve of IL-21 Tg mice. The survival rate of 31 individual founders is shown over time.

Figure 2. IL-21 overexpression leads to the accumulation of memory phenotype T cells. (A) Lymphocyte subsets distribution in the spleen and LN of the IL-21 Tg mice and their negative littermates. CD4/CD8 (left dot plots) and B220/IgM (right dot plots) profiles from wt and IL-21 tg mice from the LN (top panels) or spleen (bottom panels). LN and spleen cell suspensions were stained with mAbs directed against CD4, CD8, B220 and IgM. The percentage of CD4⁺, CD8⁺, B220⁺IgM⁻, B220⁺IgM⁺ and B220^{hi}IgM⁺ cells is shown on each dot plot. (B) Phenotype of IL-21 Tg CD4⁺ T lymphocytes. CD44/CD62L (left dot plots) and CD44/CD45RB (right dot plots) profiles gated on CD4⁺ T cells from LN (top panels) and spleen (bottom panels) of wt and IL-21 Tg mice. LN and spleen cell suspensions were stained with anti-CD4, anti-CD44 and anti-CD45RB Abs. (C) Memory phenotype of IL-21 Tg CD8⁺ T cells. CD44/CD62L (left dot plots) and CD44/Ly6C (right dot plots) profiles gated on CD8⁺ T cells from LN (top panels) and spleen (bottom panels) of wt and IL-21 Tg mice. LN cells and splenocytes were stained with anti-CD8, anti-CD62L, anti-CD44 and anti-Ly6C. (D) T cell repertoire of IL-21 Tg mice. TCR V β use by CD4⁺ (white bars) and CD8⁺ (black bars) T lymphocytes from IL-21 Tg and wt mice. LN cells were stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD3 and a panel of anti-TCR V β Abs. The FACS analyses from panel A to C are representative of 8 independent IL-21 Tg founders while the data from panel C is from 2 different founders. The wt mice used in all experiments were negative littermates.

Figure 3. Analysis of lymphoid cellularity in IL-21 Tg and control mice. (A) Cellular composition of the lymph nodes from IL-21 Tg and control mice. The analyses were done on pooled axillary, inguinal and mesenteric lymph nodes. (B) Splenic cellularity in IL-21 Tg mice. (C) Total cell number of secondary lymphoid organs and splenic B cell numbers recovered from IL-21 Tg mice. Absolute numbers of total organ and different lymphocyte subsets are shown. Mean +/- SEM is represented. IL-21 Tg mice (white squares), negative littermates (black squares). Tm, memory T cells.

Figure 4. Functional capacity of IL-21 Tg memory phenotype CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes (A) Rapid IFN- γ production by IL-21 Tg memory phenotype T cells. Splenocytes were stimulated with PMA (50 ng/mL) and ionomycin (500 ng/mL) for 4h. Brefeldin A (10 μ g/mL) was added during the last 2h of culture. Cells were then fixed in formaldehyde followed by staining with anti-IFN- γ , anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44 and anti-CD45RB Abs. Fluorescence histograms show IFN- γ production gated on CD4⁺ (left histograms) or CD8⁺ (right histograms) T cells from wt (top panels) and IL-21 Tg (bottom panels) mice. The thin line represents IFN- γ production by total CD4⁺ or CD8⁺ T cells while the bold line shows IFN- γ production by memory CD8⁺ (Ly6C^{high}) or CD4⁺ (CD45RB^{low}) T lymphocytes. The dotted line stands for isotype control staining. The percentage of memory T lymphocytes (bold) and total lymphocytes (normal) producing IFN- γ are indicated on the histogram. Wt mice correspond to IL-21 Tg negative littermates. (B) Normal proliferation of memory phenotype T cells from IL-21 Tg mice following anti-CD3 stimulation. IL-21 Tg and wt (negative littermates) splenocytes were labeled with CFSE and *in vitro* stimulated with different concentrations of anti-CD3 Ab (0.03 to 3 μ g/mL). 72 h later, cells were stained with anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD44 Abs followed by FACS analysis. CFSE profiles gated on CD4⁺CD44^{hi} (left histograms) or CD8⁺CD44^{hi} (right histograms) T cells from wt or IL-21 Tg mice are shown for the different anti-CD3 Ab concentrations. Thin line, CFSE profiles obtained after anti-CD3 stimulation; dotted line, CFSE fluorescence by unstimulated cells.

Figure 5. IL-21 regulates γ_c cytokine receptor expression on T lymphocytes *in vitro*. B6 LN cells (1×10^6 /mL) were cultured either with rIL-21 (25 ng/mL), rIL-7 (10 ng/mL) or medium alone for 48 h. Cells were then harvested and stained to detect IL-21R, IL-7R α and IL-2R β expression by the different T cell subsets. mAbs were used to detect IL-7R α and IL-2R β expression while an IL-21Fc fusion protein was used to detect IL-21R expression. The expression profiles of the different γ_c cytokine receptors after culture with cytokines are compared to freshly harvested LN cells. Bold line, culture with rIL-21; thin line, culture with rIL-7; dotted line, *ex vivo*; dashed line, isotype (note that the staining for the different isotypes overlaid).

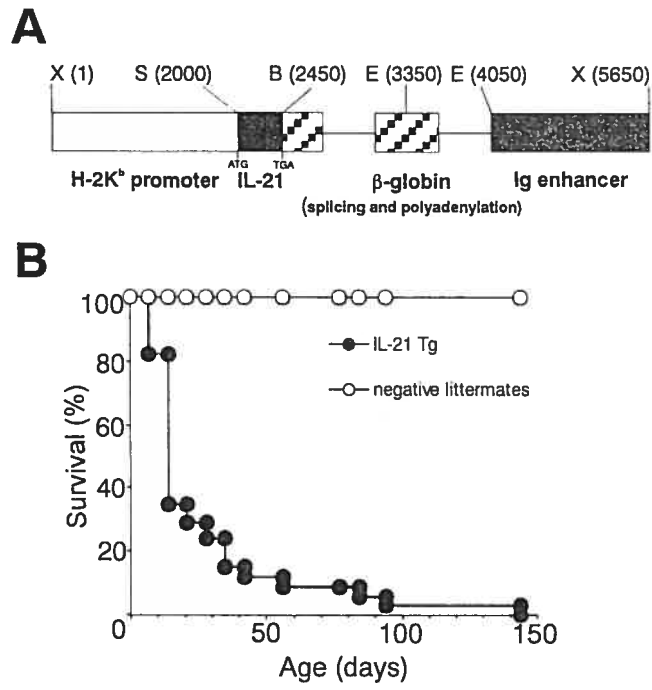


Figure 1

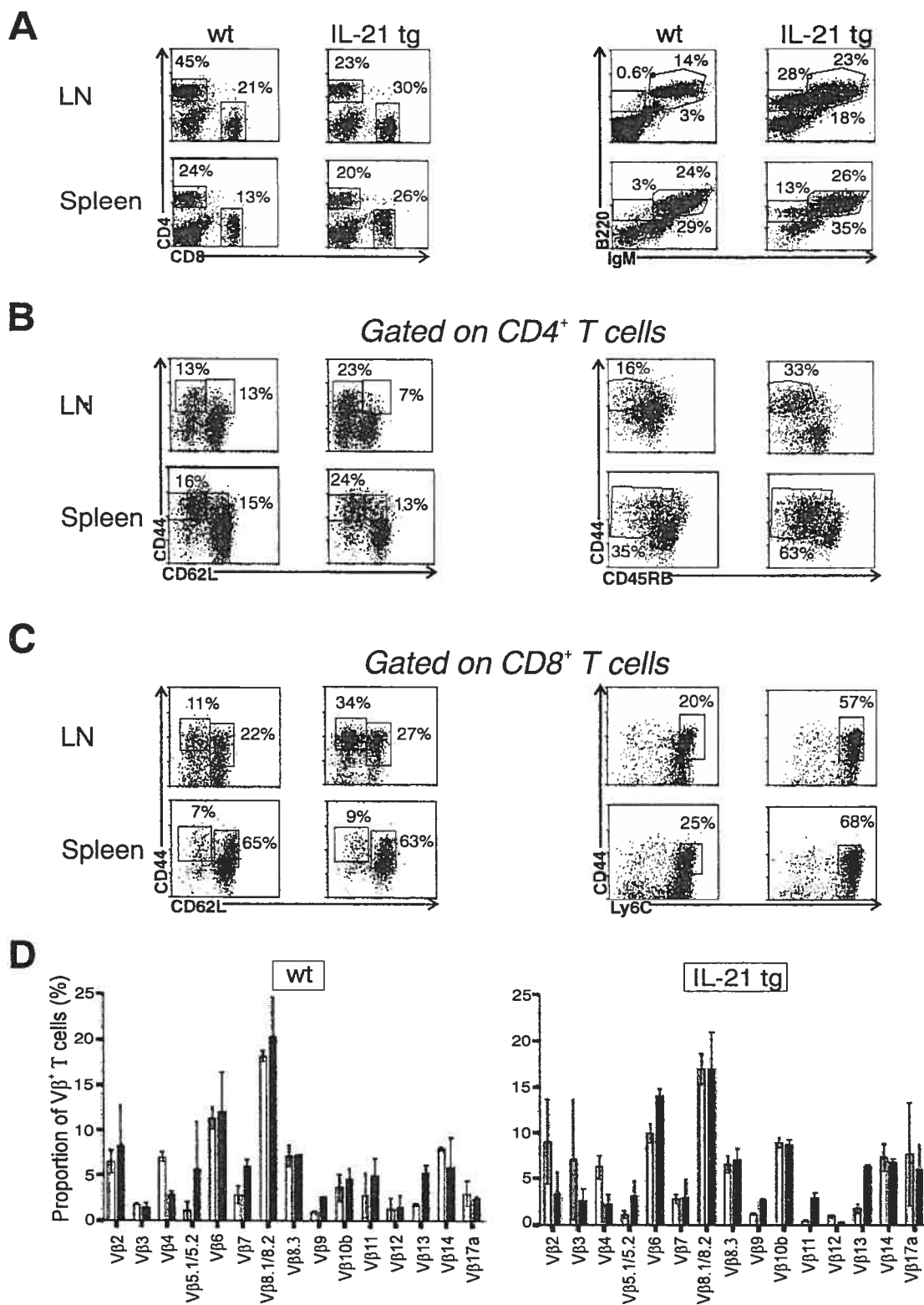


Figure 2

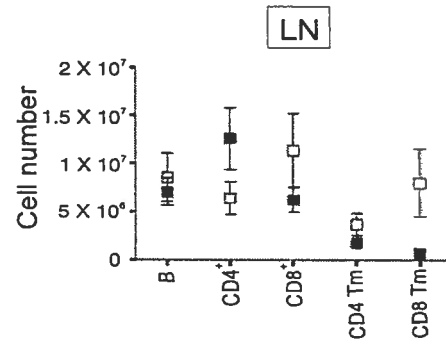
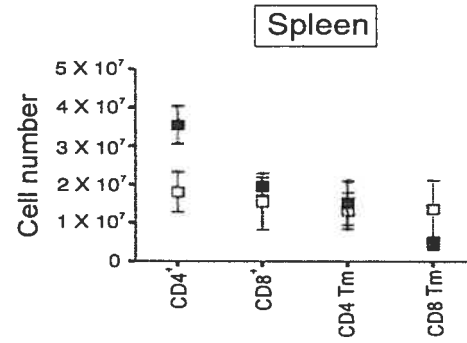
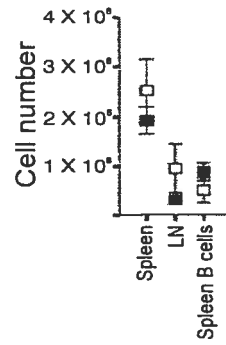
A**B****C**

Figure 3

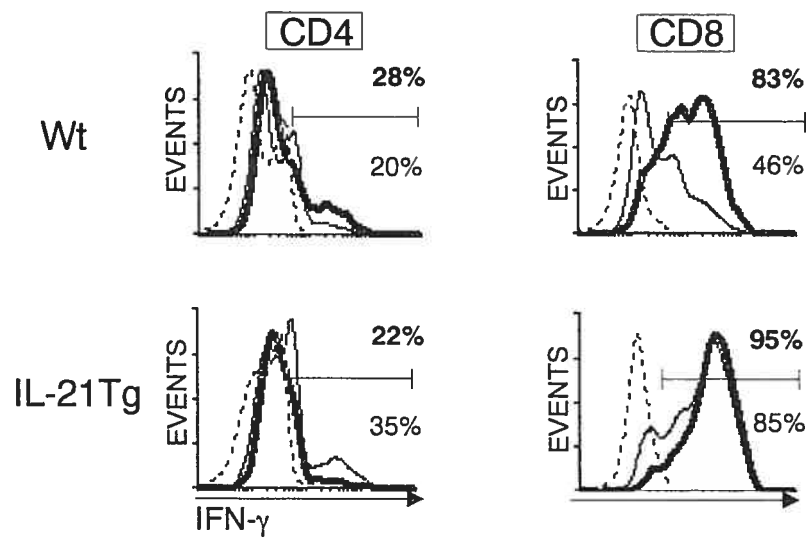
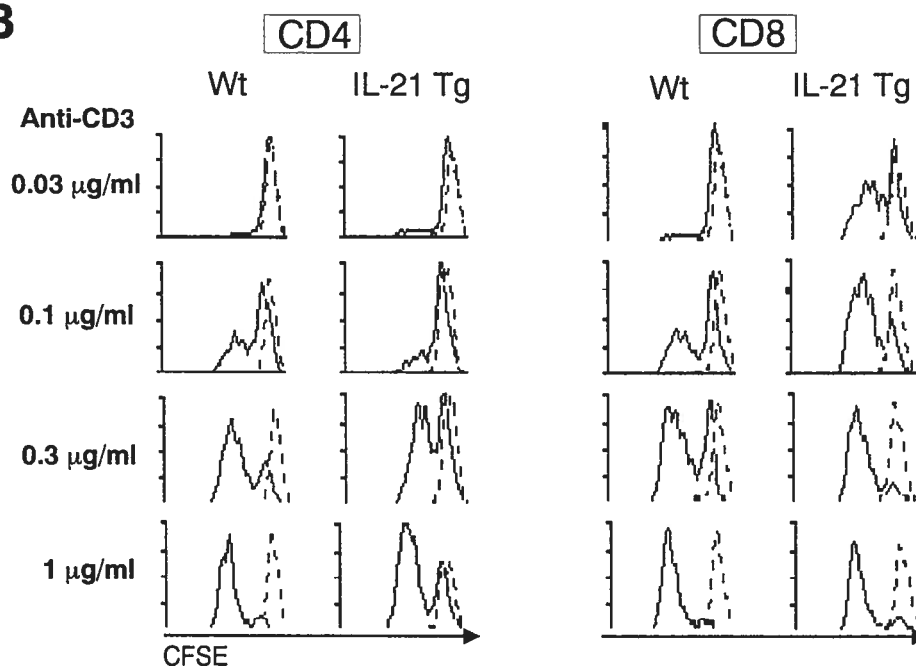
A**B**

Figure 4

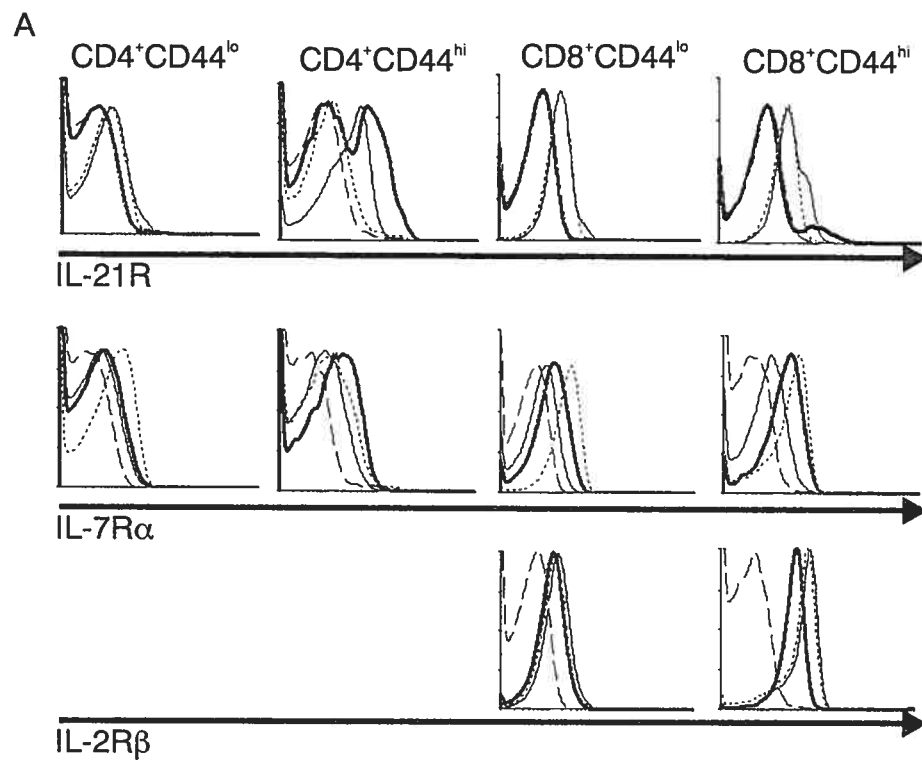


Figure 5

CHAPITRE 4.
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

4.1 PARTICIPATION À L'ARTICLE OSTIGUY *ET AL.* INTITULÉ « IL-21 PROMOTES T LYMPHOCYTE SURVIVAL » EN PRÉPARATION POUR *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY*

Ma contribution a consisté à évaluer l'effet de l'IL-21 sur les différents sous-types de lymphocytes T, basé sur leur expression de la molécule CD44, i.e. d'analyser le rôle de l'IL-21 sur la viabilité des lymphocytes naïfs (CD44^{lo}) versus activés/mémoires (CD44^{hi}). Ce résultat est présenté dans ce mémoire puisqu'il contribue à l'interprétation des résultats obtenus avec la souris IL-21 Tg.

4.1.1 L'IL-21 induit la survie des lymphocytes T *in vitro*

Notre laboratoire a démontré que l'IL-21 favorisait la survie des lymphocytes T en culture ¹⁰⁷. Cependant, nous voulions étudier l'effet de l'IL-21 sur la viabilité des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ selon leur expression de CD44 afin de déterminer si la survie observée était applicable à toutes les sous-populations de lymphocytes T. Nous avons donc comparé la survie induite par l'IL-21 sur les cellules T naïves (CD44^{low}) versus activées/mémoires (CD44^{high}). Comme prévu, l'IL-21 induit la survie des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves (58% ± 1.3% et 50% ± 6.7% respectivement) comparativement au milieu seul (27% ± 4.8% et 18% ± 2.2% respectivement) (Figure 7A). De façon très intéressante, nous pouvons aussi constater un effet sur la population CD8⁺ activée/mémoire (22% ± 2.1%) qui est absent chez leur vis-à-vis CD4⁺ (22% ± 11%) par rapport au contrôle sans cytokine (6% ± 1.4% et 29% ± 5.3% respectivement). Deux scénarios peuvent expliquer la raison de cette augmentation de viabilité chez les lymphocytes CD8⁺ activés/mémoires. Premièrement, l'IL-21 pourrait avoir un effet positif direct sur la survie de cette population. Deuxièmement, l'IL-21 pourrait induire l'expression à la hausse de CD44 sur les cellules T CD8⁺ naïves, expliquant l'augmentation de la population de lymphocytes T CD8⁺CD44^{high}. Puisque nous avons démontré que l'IL-21 favorise la survie des cellules T naïves, il est possible que les lymphocytes CD8⁺ naïfs aient reçu un signal de survie de l'IL-21 et aient été induits à se différencier. Afin de vérifier

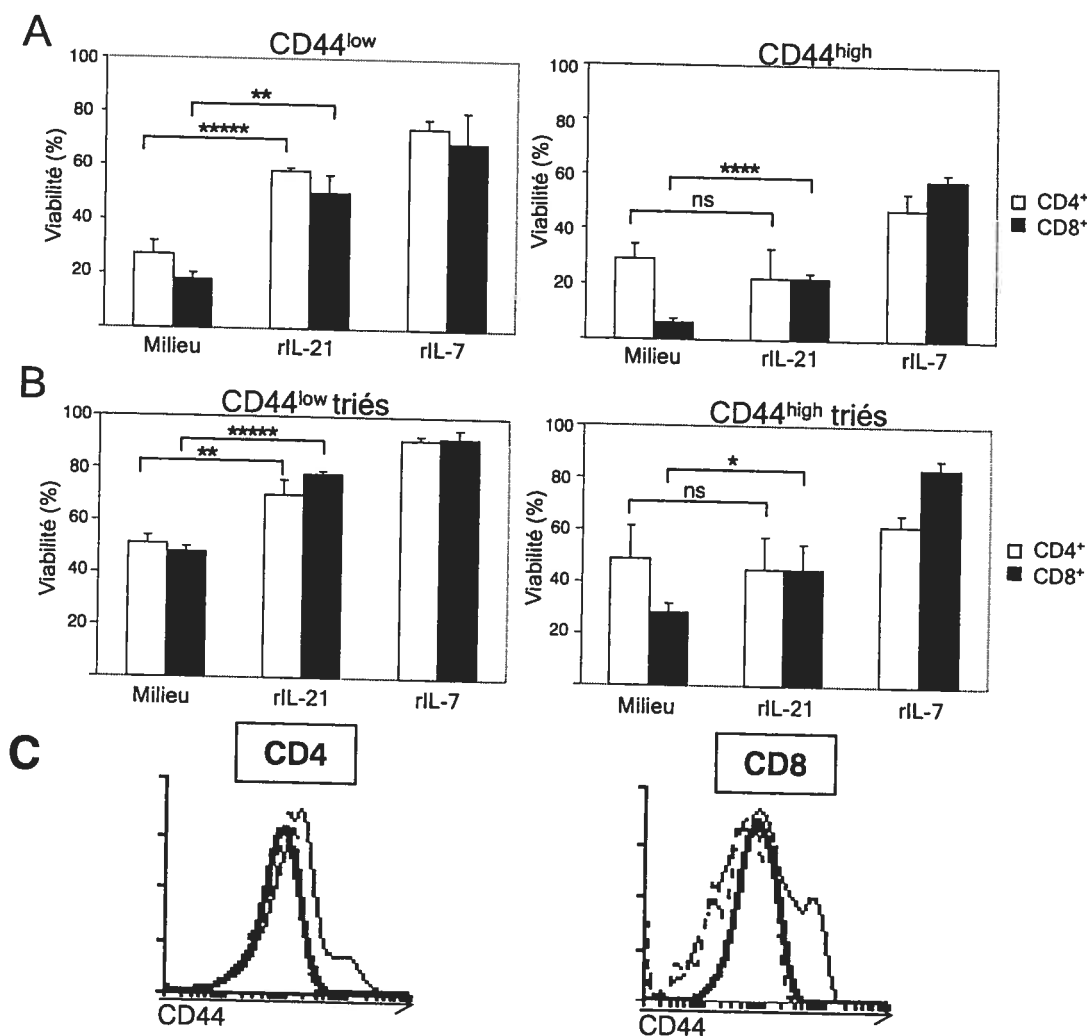


Figure 7. L'IL-21 induit la survie des lymphocytes T naïfs et des cellules T CD8⁺ activées/mémoires. (A) Viabilité des cellules CD4⁺ et CD8⁺ en fonction de l'expression de CD44 en présence ou absence de rIL-21 ou rIL-7. Une suspension cellulaire de ganglions lymphatiques de souris B6 a été cultivée *in vitro* pour 72h sans stimulation en présence ou absence de rIL-21 (25 ng/mL) ou rIL-7 (10 ng/mL). Le pourcentage de viabilité a été obtenu suite à un marquage au 7-AAD en combinaison avec des Ac dirigés contre CD4, CD8 et CD44. (B) Viabilité des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ triées en fonction de leur expression de CD44. Une suspension cellulaire de ganglions a été triée selon les phénotypes suivants: CD4⁺CD44^{low}, CD4⁺CD44^{high}, CD8⁺CD44^{low} ou CD8⁺CD44^{high} et cultivés *in vitro* pour 72h tel que décrit en A. Le pourcentage de viabilité et l'expression de CD44 ont été analysés suite à un marquage au 7-AAD en combinaison avec un Ac anti-CD44. (C) L'IL-21 n'induit pas la différenciation des lymphocytes T naïfs. L'expression de CD44 est démontrée avant le tri (trait fin), après le tri (trait pointillé) et après culture de 72h avec le rIL-21 (trait gras). Données représentant trois expériences indépendantes. Les statistiques ont été obtenues en utilisant un test T de Student bilatéral où * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.005$, **** = $p < 0.0005$ and ***** = $p < 0.00005$.

cette hypothèse, nous avons trié des cellules CD4⁺ et CD8⁺ selon leur expression de CD44 et les avons cultivées avec rIL-21 (25 ng/mL) pour 72h. Ces cellules ont été marquées avec le 7-AAD et un Ac anti-CD44 afin de vérifier si son expression

augmentait suite à la culture avec l'IL-21. Tel qu'illustré dans la figure 7B, nous avons pu constater que l'IL-21 avait un effet direct sur la survie des lymphocytes T naïfs sans toutefois activer ces derniers (figure 7C). De plus, l'IL-21 semble avoir un effet direct sur la survie des lymphocytes CD8⁺ activés/mémoires, mais cet effet est absent sur la population CD4⁺ activée/mémoire. La survie observée chez les lymphocytes T CD8⁺ activés/mémoires est donc le résultat de la culture avec l'IL-21 et non de la différenciation des cellules naïves vers un phénotype mémoire.

4.2 PERTURBATION DE L'HÉMATOPOÏÈSE CHEZ LA SOURIS IL-21 Tg

L'article présenté au chapitre 3 de ce mémoire décrit l'accumulation de lymphocytes T mémoires chez la souris IL-21 Tg (voir chapitre 3). Cependant, la surexpression de l'IL-21 provoque aussi un deuxième effet chez la souris Tg qui altère le développement hématopoïétique. Ce processus altéré chez la souris IL-21 Tg conduit à la mort de celle-ci. Nous avons mentionné dans l'article qu'environ 70% des souris IL-21 Tg mourraient durant les 3 premières semaines suivant la naissance. Nous avons appelé celles-ci groupe 1. Les cellules de ces souris IL-21 Tg ne présentent pas le phénotype mémoire, mais ont un développement hématopoïétique changé. Les souris IL-21 Tg du groupe 2, englobant les autres souris, ont aussi un défaut hématopoïétique en plus de développer une accumulation de lymphocytes T mémoires. Les résultats qui seront présentés vont dépendre le phénotype hématopoïétique observé dans le modèle murin afin d'apporter des réponses préliminaires pour expliquer la nature de ce phénomène.

4.2.1 Accumulation de cellules de la lignée myéloïde chez la souris IL-21 Tg

La mort des souris IL-21 Tg du groupe 1 nous a amené à investiguer le développement hématopoïétique chez la souris IL-21 Tg puisqu'en histologie, tous les autres organes étaient normaux. L'analyse de coupe histologique de la MO montre

une hypercellularité dans celle-ci (Figure 8A). De plus, on observe une accumulation importante de neutrophiles dans la rate (Figure 8B). Ces observations nous ont amenés à caractériser les populations cellulaires présentes dans la MO et la rate par cytométrie en flux.

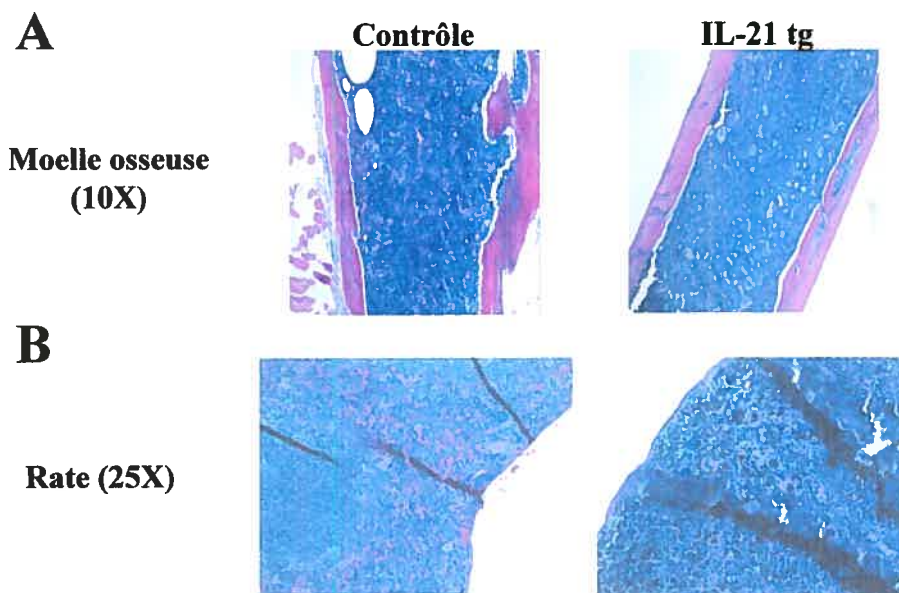


Figure 8. Histologie de la moelle osseuse et de la rate de souris IL-21 Tg colorée avec hématoxyline-éosine. L'os du bras (A) et la rate (B) ont été prélevés dans le formol, puis fixés sur paraffine. Les coupes ont ensuite été colorées avec l'hématoxyline-éosine. Nous remarquons la présence de nombreux neutrophiles dans la MO IL-21 Tg ainsi que dans la rate.

L'analyse du profil FSC/SSC de la MO démontre une accumulation massive de cellules myéloïdes immatures ($FSC^{hi}SSC^{hi}$) chez la souris IL-21 Tg (Figure 9). Cette augmentation du nombre de cellules myéloïdes immatures est accompagnée de la diminution des cellules lymphoïdes ($FSC^{lo}SSC^{lo}$) (Figure 9). Ceci a été confirmé par l'absence de lymphopoïèse B dans la MO de la souris IL-21 Tg, caractérisée par la disparition de la population $B220^{+}IgM^{+}$ chez les groupes 1 et 2 de souris IL-21 Tg (souris contrôle : 3.7×10^6 vs souris IL-21 Tg : 1.5×10^5 pour le groupe 1, 5.1×10^6 vs 4.7×10^5 pour le groupe 2) (Figures 9 et 10). Le phénotype myéloïde chez les souris des groupes 1 et 2 a été confirmé par l'observation d'une accumulation de cellules myéloïdes $CD11b^{+}Gr-1^{+}$, et ce, en terme de pourcentage

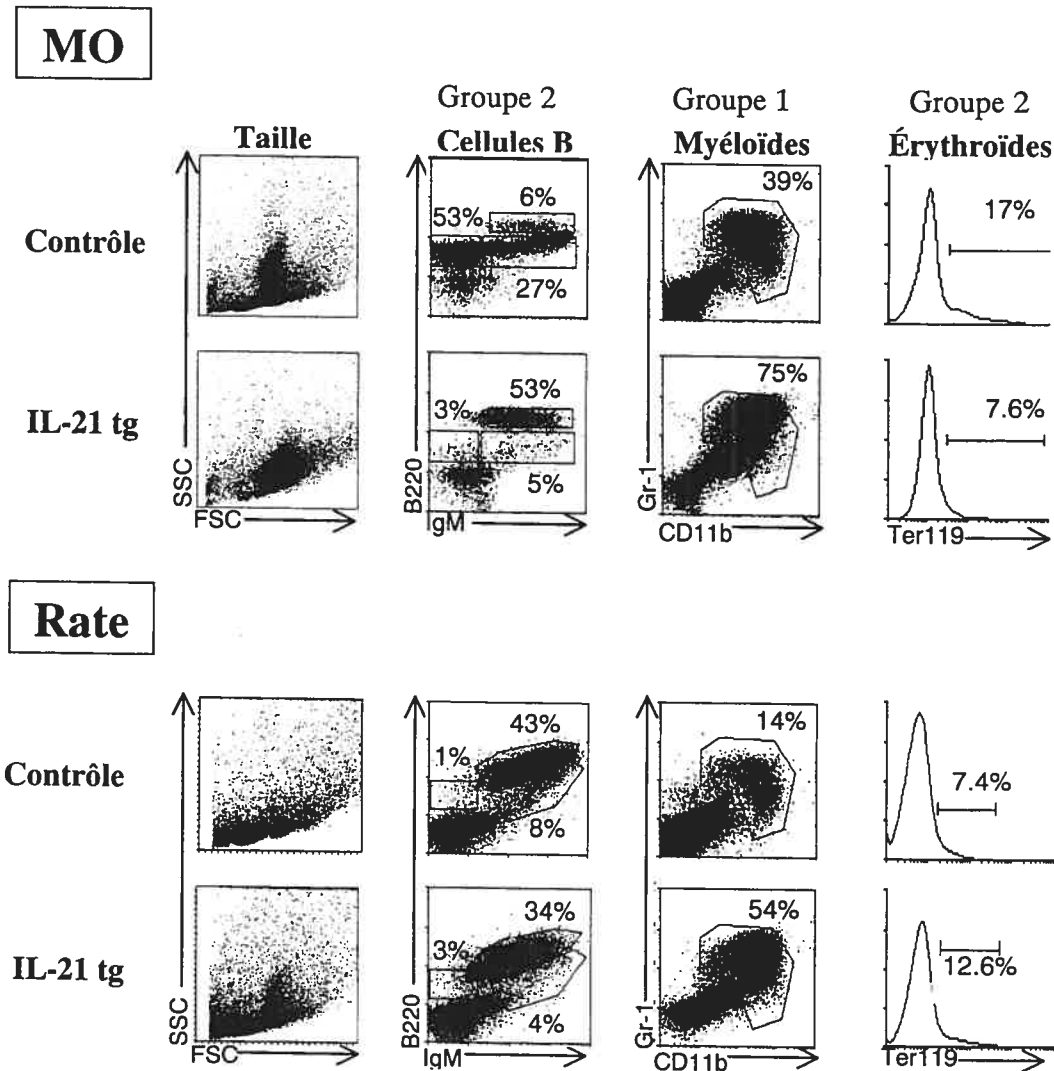


Figure 9. Accumulation de cellules myéloïdes dans la MO et la rate des souris IL-21 Tg. Analyses en cytométrie en flux de la taille cellulaire et des populations, de cellules myéloïdes, érythroïdes et lymphoïdes présentes dans la rate et la MO des souris IL-21 Tg et contrôles. Les cellules ont été marquées avec des Ac anti-CD11b, anti-Gr1, anti-Ter119, anti-B220 et anti-IgM. Les profils lymphoïdes et érythroïdes de la MO et de la rate proviennent de souris IL-21 Tg du groupe 2. Les profils myéloïdes de la MO et de la rate représentent les souris du groupe 1. Le profil représentatif d'une souris sur un groupe de 7 (groupe 1) ou 6 (groupe 2) est montré.

(Figure 10, Figure 9 et résultat non montré). Nous pouvons aussi remarquer que la population $CD11b^+Gr-1^{int}$ chez la souris IL-21 Tg du groupe 2 semble plus marquée que chez la souris contrôle, ce qui n'est pas le cas chez les souris du groupe 1 (Figure 10). Gr-1 et CD11b étant des marqueurs pour la différenciation terminale des granulocytes et monocytes, ceci suggère un blocage partiel dans la maturation de ces derniers. De plus, la MO IL-21 Tg (groupe 2) semble éprouver un défaut

d'érythropoïèse selon le marquage Ter119, démontrant la presque absence d'érythrocytes. Ce phénomène intrigant nous a poussés à étudier la rate afin de vérifier si le même phénotype y apparaissait.

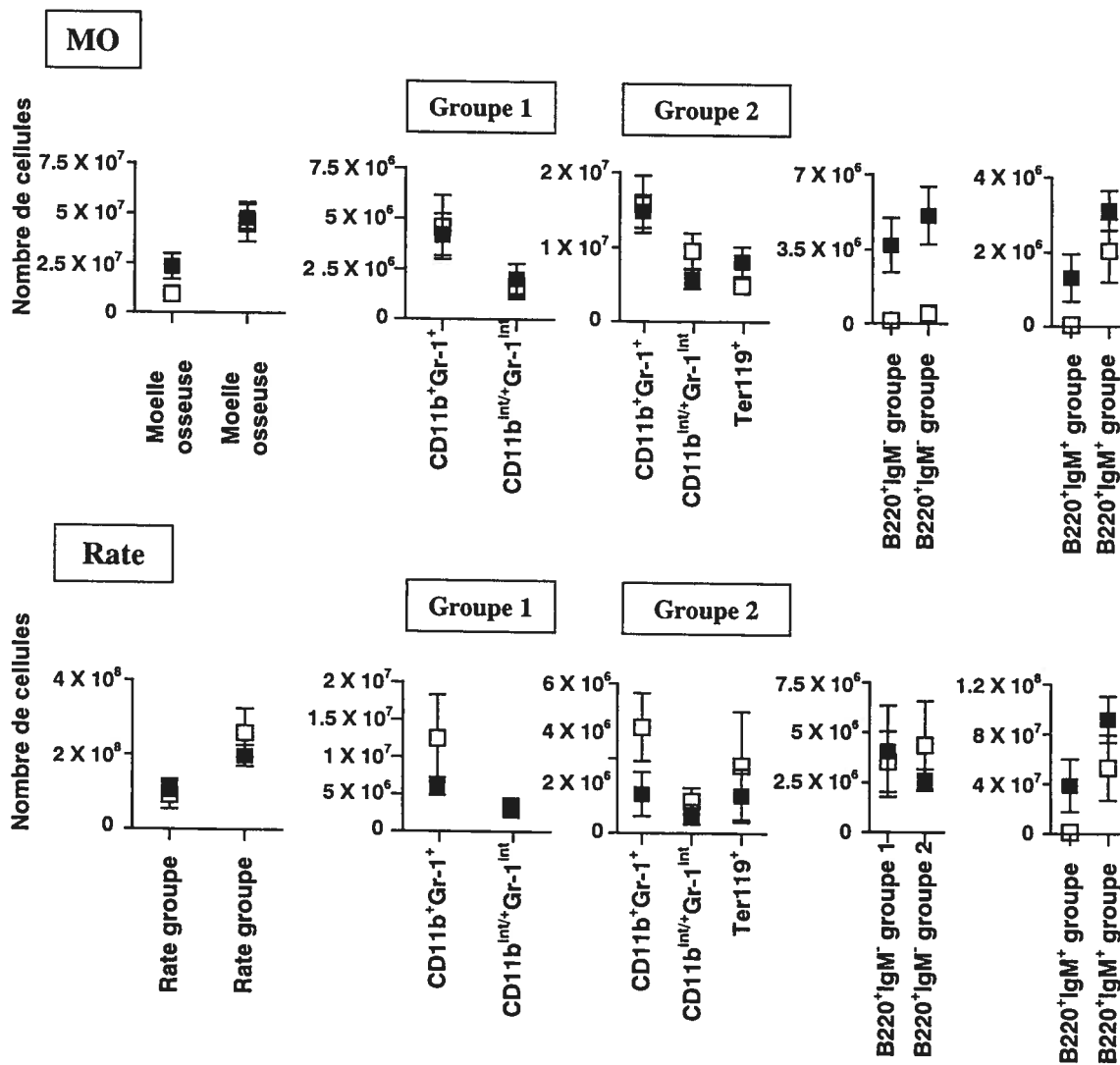


Figure 10. Composition cellulaire de la moelle osseuse et de la rate chez les deux groupes de souris IL-21 Tg. Le nombre total de cellules ainsi que la composition cellulaire de la moelle osseuse et de la rate sont illustrés pour les souris des groupes 1 et 2. Les cellules CD11b⁺Gr-1⁺ incluent toute la population monocyte/granulocyte. Souris IL-21 Tg, groupe 1, n = 6, groupe 2, n = 6 contrôles, n = 12. Carrés noirs : souris non-Tg sacrifiées au même âge que les souris Tg; carrés blancs : souris IL-21 Tg

Nous observons aussi chez la rate des souris IL-21 Tg une population représentant des cellules myéloïdes (FSC^{hi}SSC^{hi}) (Figure 9). La rate IL-21 Tg contient des progéniteurs B (B220⁺IgM⁻) de façon surprenante chez le groupe 2 tout

en ayant une déficience en lymphocytes B matures ($B220^+IgM^+$) (Figures 9 et 10). Le groupe 1 de souris IL-21 Tg ne diffère pas des contrôles concernant le développement des progéniteurs B dans la rate. Cependant, le développement semble bloqué à ce stade puisqu'il y a absence de lymphocytes B matures (Figure 10). Comme nous pouvons le constater, il y a présence d'une accumulation de cellules myéloïdes dans la rate des souris IL-21 Tg des groupes 1 et 2 (Figure 9, résultat non montré, Figure 10). On retrouve aussi la population $CD11b^+Gr-1^{int}$ chez la souris Tg du groupe 2 alors que les souris du groupe 1 sont normales (Figure 10). Contrairement à ce qui a été vu dans la MO IL-21 Tg, la rate semble présenter une augmentation de l'érythropoïèse (souris IL-21 Tg du groupe 2), ce qui pourrait suggérer qu'un mécanisme compensatoire a été mis en place dans la rate de la souris Tg afin de répondre aux besoins de l'organisme en érythrocytes (Figures 9 et 10). La perte de cellules érythroïdes est aussi identifiable à l'œil nu sur les os provenant de la souris IL-21 Tg : la moelle en est incolore. Ces résultats suggèrent un défaut dans l'hématopoïèse qui induirait le développement de la lignée myéloïde au détriment des lignées lymphoïdes et érythroïdes chez les souris IL-21 Tg. De plus, le thymus de ces souris est atrophié et montre une forte diminution dans la population DP (résultat non montré).

Afin d'essayer de comprendre pourquoi il y a une accumulation de granulocytes dans la MO des souris IL-21 Tg (groupes 1 et 2), nous avons évalué si le nombre de progéniteurs myéloïdes était augmenté chez la souris IL-21 Tg (Figure 11). Selon les nombres cellulaires, il y a une diminution de 3X des progéniteurs myéloïdes chez la souris IL-21 Tg du groupe 1 (4.6×10^5 vs 1.6×10^5). Les CSH sont 1.6X moins nombreuses que chez la souris contrôle (6.4×10^4 vs 3.9×10^4) (Figure 11). Il y a aussi une perte des progéniteurs myéloïdes chez les souris IL-21 Tg du groupe 2 (1.2×10^6 vs 3.3×10^5). Cependant, ces souris démontrent une nette augmentation chez les CSH (4.5×10^4 vs 8.4×10^5).

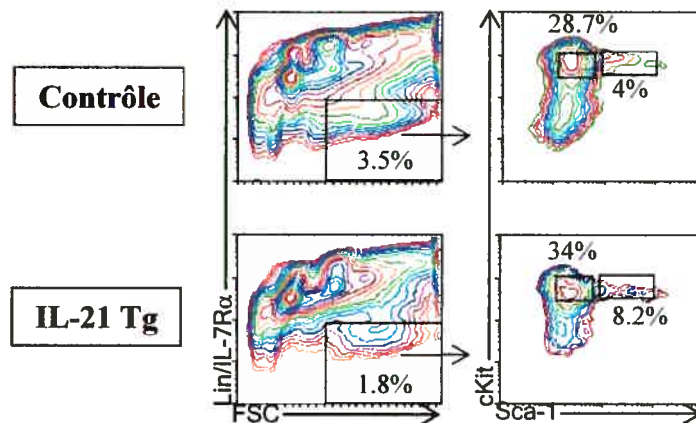


Figure 11. Profil des progéniteurs myéloïdes dans la MO de souris IL-21 Tg. La MO de souris IL-21 Tg et contrôles a été marquée avec des Ac anti-Lin, anti-IL-7R α , anti-cKit et anti-Sca-1. La population immature et large (FSC^{hi}) négative pour Lin et l'IL-7R α a été séparée selon l'expression de cKit et Sca-1. Les CSH sont c-Kit^{hi}Sca-1^{hi} alors que les précurseurs myéloïdes (CMP, GMP et MEP) sont c-Kit^{hi}Sca-1⁻. Une souris du groupe 1 est présentée. Groupe 1, n = 1, groupe 2, n = 1.

4.2.2 Reconstitution hématopoïétique après la greffe de MO de souris IL-21 Tg

Nous avons mentionné dans l'article inclus dans ce mémoire (chapitre 3) la durée de vie restreinte des souris IL-21 Tg. Afin de déterminer si la cause de la mortalité était liée au défaut hématopoïétique observé chez la souris IL-21 Tg, nous avons effectué des expériences de greffe de la MO chez des souris receveuses après irradiation létale (1200 rads) (Tableau VI). De façon intéressante, toutes les souris transférées avec de la MO provenant de souris IL-21 Tg (sauf 2 provenant de la greffe 2) sont décédées plus ou moins 25 jours après le transfert alors que les souris ayant reçu de la MO contrôle se portaient très bien (> 90 jours). Nous avons analysé le phénotype des souris irradiées et reconstituées avec la MO Tg comparativement à celui de la souris Tg donneuse et d'un contrôle (Figure 12). À noter, la souris contrôle utilisée est une souris sauvage, et non une receveuse de MO normale, ce contrôle n'ayant pas été fait lors de la première greffe. De plus, les souris ayant reçu la greffe de MO IL-21 Tg à la troisième expérience sont mortes durant la nuit, nous empêchant de faire toutes les analyses. Après analyse d'une souris receveuse de MO Tg de la greffe 1, nous remarquons que son profil FSC/SSC est très semblable à celui de la souris IL-21 Tg donneuse (Figure 12). De plus, nous observons une accumulation de

cellules myéloïdes (CD11b⁺Gr-1⁺) chez la souris receveuse de MO de la souris IL-21 Tg. Le développement des lymphocytes B semble aussi absent compte tenu de la perte de la population des progéniteurs B (B220⁺IgM⁻), phénotype similaire à celui observé chez les souris IL-21 Tg. L'érythropoïèse est aussi diminuée chez la souris receveuse, car on retrouve environ 20% de cellules Ter119 dans une MO contrôle. Ces résultats démontrent que le défaut hématopoïétique est responsable de la viabilité réduite des souris IL-21 Tg, sûrement via une réduction dans l'érythropoïèse causant une anémie, puisque la majorité de l'espace est occupé par des cellules de la lignée myéloïde.

Pour les souris receveuses de la greffe 2 (Tableau VI), nous avons attendu que les souris receveuses de MO provenant de souris IL-21 Tg aient des signes de faiblesse, symptômes utilisés pour décider quand euthanasier une souris IL-21 Tg. Ces souris sont restées en santé pendant au moins 3 mois. Nous avons décidé de les euthanasier afin de voir si un phénotype hématopoïétique se développait. Nous avons observé que leur MO présentait un profil identique à celui retrouvé chez la souris contrôle (résultat non montré). La souris IL-21 Tg ayant servi de donneur de MO n'avait pas un phénotype complet. La MO ne présentait pas une accumulation de cellules myéloïdes et l'érythropoïèse était normale. Seul le développement des lymphocytes B était altéré (absence de progéniteurs B).

Tableau VI. Greffes de MO provenant de souris IL-21 Tg.

Greffe et âge des souris IL-21 Tg	Âge des souris receveuses à leur mort	Taux de IL-21 Tg	survie	wt
Greffe 1 (144 jours)	Entre 25 et 30 jours	0/4	4/4	
Greffe 2 (35 jours)	>100 jours	2/2	2/2	
Greffe 3 (62 jours)	25 jours	0/4	4/4	

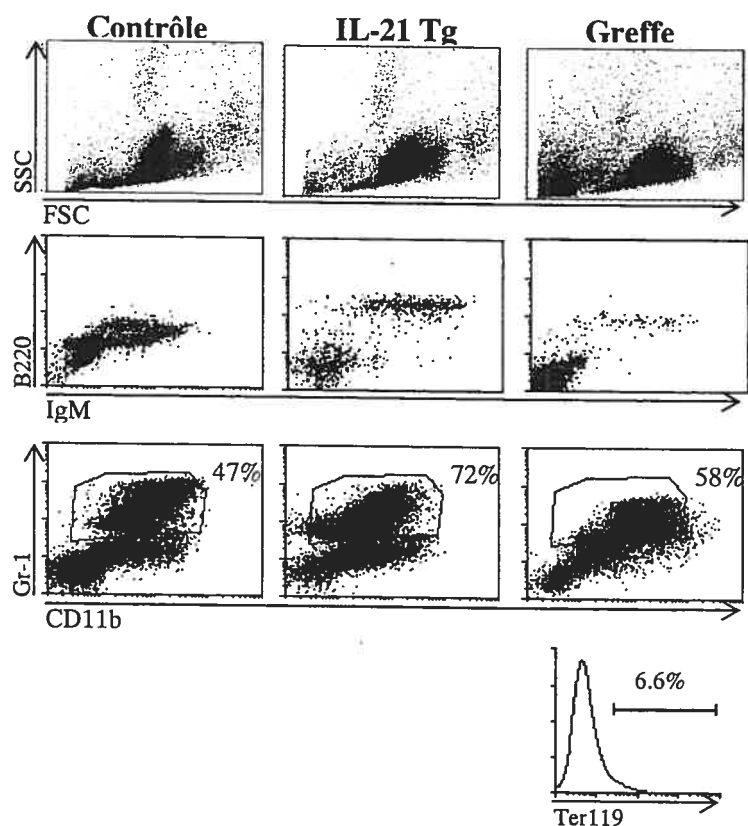


Figure 12. La reconstitution hématopoïétique suite à une greffe de MO de souris IL-21 Tg recrée le phénotype des souris IL-21 Tg chez la souris receveuse. La MO de souris IL-21 Tg ou contrôle a été transférée dans des hôtes irradiés de façon létale (1200 rad). Les souris ayant reçu la MO Tg sont décédées au jour 25 post-transfert. Les résultats des marquages de la MO avec des Ac anti-CD11b, anti-Gr1, anti-B220, anti-IgM et Ter119 sont montrés. Malheureusement, le marquage Ter119 n'a pas été effectué sur la souris IL-21 Tg et son contrôle durant cette expérience.

4.2.3 Détermination de l'expression de l'IL-21R par les progéniteurs hématopoïétiques

Compte tenu du phénotype hématopoïétique observé chez les souris IL-21 Tg et prenant en considération que l'expression de l'IL-21R n'a jamais été caractérisée chez les précurseurs de la MO, nous avons voulu étudier quelle(s) population(s) de la MO expriment le récepteur à l'IL-21. Les expériences ont été conduites dans la logique où l'accumulation de cellules myéloïdes doit résulter d'un effet de l'IL-21 sur la survie et/ou la prolifération de l'un ou plusieurs des stades de maturation présents

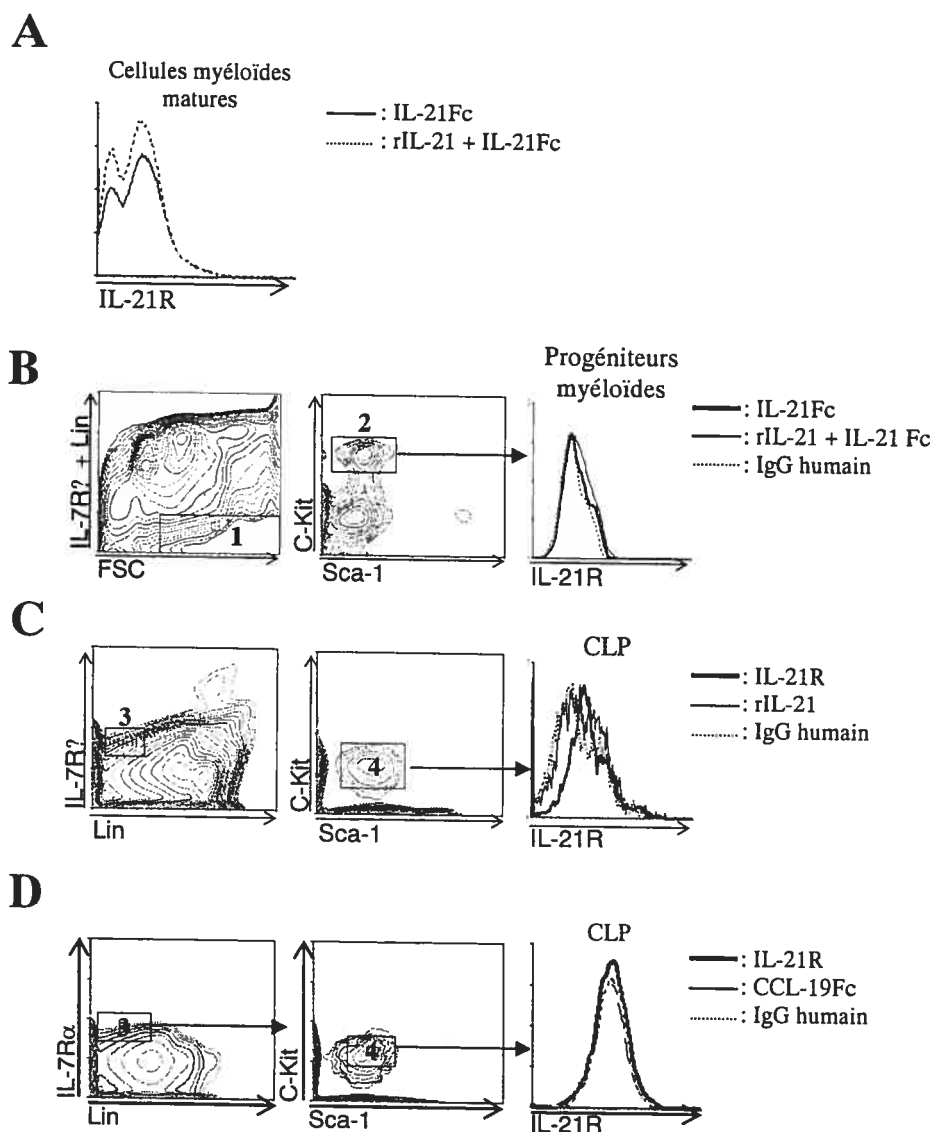


Figure 13. Expression de l'IL-21R par les cellules myéloïdes matures et les précurseurs hématopoïétiques de la MO. Nous avons étudié l'expression de l'IL-21R en cytométrie en flux par les cellules myéloïdes matures (A), les progéniteurs myéloïdes (B), les précurseurs lymphoïdes sans enrichissement en progéniteurs (C) ou avec enrichissement (déplétion des cellules matures Lin⁺ par séparation magnétique) (D) provenant de souris B6. Les progéniteurs myéloïdes (CMP, GMP et MEP) ont été identifiés par les régions 1 (Lin⁻IL-7R α ⁺FSC^{hi}) et 2 (c-Kit^{hi}Sca-1⁻). Les CLP proviennent des régions 3 (Lin⁻IL-7R α ⁺) et 4 (c-Kit^{lo}Sca-1^{lo}). L'IL-21R a été détecté avec une protéine de fusion IL-21Fc humaine révélée avec un anti-humain IgG Fc spécifique. Dans le panneau D, la protéine de fusion CCL19-Fc (chémokine se liant au CCR7, absent dans la MO) a été utilisée comme second contrôle isotypique. n = 5 pour les progéniteurs myéloïdes, n = 1 pour CLP sans déplétion, n = 2 pour CLP avec déplétion.

dans cette lignée de différenciation. L'accumulation de cellules myéloïdes CD11b⁺Gr-1⁺ dans la MO IL-21 Tg nous a amené à vérifier l'expression de l'IL-21R sur la population myéloïde mature provenant de souris B6 (Figure 13A). Afin de s'assurer de la spécificité de notre protéine de fusion (IL-21Fc) pour l'IL-21R, nous avons effectué un essai de compétition avec le rIL-21. Ce dernier devrait bloquer les récepteurs à l'IL-21, empêchant l'IL-21Fc de s'y fixer, nous donnant donc un contrôle négatif pour l'expression de l'IL-21R. La figure 13A illustre l'absence de l'expression d'IL-21R sur les cellules myéloïdes, suggérant que l'accumulation de celles-ci ne résulte pas d'un effet de prolifération direct sur cette population. Par contre, il était possible que l'accumulation de cellules myéloïdes provienne d'un effet sur les progéniteurs donnant naissance aux cellules de la lignée myéloïde (CMP et leurs descendants). Nous avons donc évalué par cytométrie en flux l'expression de l'IL-21R sur les progéniteurs myéloïdes (Lin⁻IL-7R α ⁻c-Kit^{hi}Sca-1⁻). La figure 13B montre l'absence d'expression de l'IL-21R sur les progéniteurs myéloïdes.

L'absence d'expression du récepteur à l'IL-21 sur les cellules de la lignée myéloïde nous a amené à émettre une autre hypothèse. Il a été démontré que l'expression ectopique de certains récepteurs de cytokine en combinaison avec leur ligand permettait de reprogrammer le développement des progéniteurs lymphoïdes vers la lignée myéloïde ^{165,211}. Nous avons donc émis l'hypothèse que la surexpression d'IL-21 pouvait convertir la différenciation des CLP vers la lignée myéloïde, si ceux-ci expriment l'IL-21R. Nous avons donc évalué l'expression de l'IL-21R sur les CLP, ces derniers étant Lin⁻IL-7R α ⁺c-Kit^{lo}Sca-1^{lo}. Cette expérience a été effectuée avec une suspension cellulaire de MO enrichie (les cellules matures ont été enlevées par sélection magnétique) ou non en progéniteurs (Figure 13C et D). Lors de l'expérience sur la MO complète, nous avons détecté un faible niveau d'expression de l'IL-21R sur les CLP (Figure 13C). De façon étrange, nous avons perdu ce signal lorsque nous avons enrichi la MO en précurseurs grâce à une déplétion des cellules Lin⁺. Ceci est peut-être dû à l'augmentation du bruit de fond dans les marquages (comparer les figures 13C et D). D'autres expériences de marquages devront être effectuées. Afin d'essayer de réconcilier les résultats

contradictoires concernant l'expression de l'IL-21R, nous avons évalué l'expression du messager de l'IL-21R. Les précurseurs lymphoïdes et myéloïdes ont été triés et analysés pour la présence de l'ARNm de l'IL-21R par transcription inverse et PCR (Figure 14).

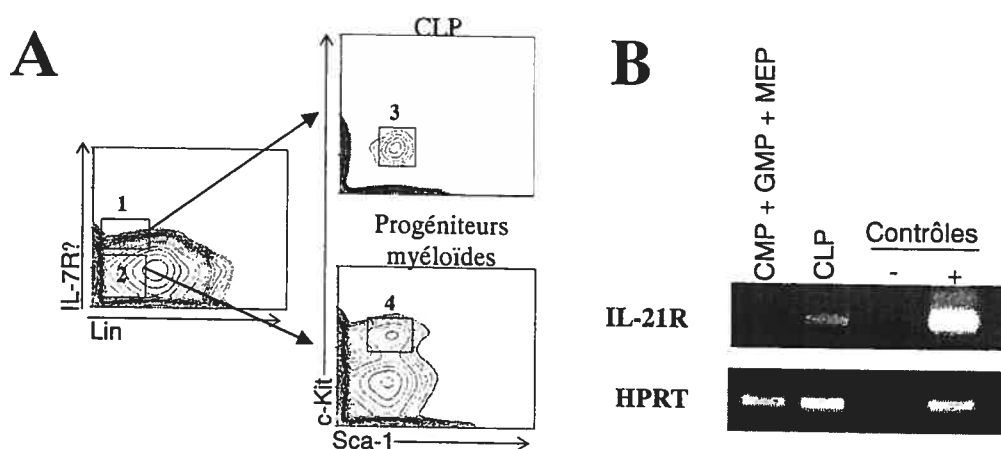


Figure 14. Évaluation de l'expression du récepteur à l'IL-21 par les précurseurs hématopoïétiques. La MO de quatre souris B6 a été prélevée et enrichie en précurseurs hématopoïétiques grâce à une déplétion des cellules matures Lin⁺. (A) Stratégie utilisée pour trier les CLP et les progéniteurs myéloïdes. Pour les CLP, nous avons trié les cellules c-Kit^{lo} et Sca-1^{lo} (région 3) provenant de la fenêtre 1 (région 1, Lin⁻IL-7R α^+) tandis que les progéniteurs myéloïdes (incluant les CMP, GMP et MEP) ont été triés en utilisant les régions 2 (Lin⁺IL-7R α^+) et 4 (c-Kit^{hi} et Sca-1⁺). Les cellules (20000) ont été triées directement en TRIzol afin d'extraire l'ARN. (B) Expression de l'ARNm de l'IL-21R par les CLP. Une RT-PCR a été effectuée avec des oligonucléotides spécifiques pour l'IL-21R. HPRT a été utilisé comme contrôle interne alors que des cellules de ganglions et un contrôle eau ont servi de contrôle positif et négatif, respectivement.

Nous pouvons voir de façon très claire le messager de l'IL-21R chez les CLP. Cependant, il est moins abondant que dans les cellules totales provenant de ganglions. Ceci suggère que la densité de l'IL-21R sur les CLP est très réduite. Confirmant les résultats obtenus par cytométrie en flux, on note l'absence d'IL-21R dans la population myéloïde. Ces résultats suggèrent que l'IL-21, lorsqu'en grandes quantités, pourrait agir sur les CLP qui expriment l'IL-21R et, par un mécanisme inconnu, induire l'accumulation de cellules myéloïdes au détriment des cellules lymphoïdes.

CHAPITRE 5.
DISCUSSION

De nombreuses cytokines de type I appartenant à la famille γ_c régulent différents aspects de la réponse immunitaire. Leurs rôles variés incluent la survie des lymphocytes, que ces derniers soient naïfs ou mémoires, leur prolifération et différenciation ainsi que leur apoptose. Considérant l'importance considérable de ces cytokines γ_c dans la réponse des cellules T *in vivo* et le fait que l'IL-21, le plus récent membre de la famille γ_c , induit la survie des lymphocytes T *in vitro*, nous avons émis l'hypothèse suivante : la surexpression de l'IL-21 *in vivo* permettra la survie des cellules T. Ainsi, nous nous attendons à ce que l'IL-21 participe à l'homéostasie des lymphocytes T en induisant leur génération et/ou leur survie. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons généré un modèle murin surexprimant l'IL-21 sous le contrôle du promoteur de CMH de classe I ainsi que d'une séquence amplificatrice des Ig. Le résultat le plus surprenant est que les souris IL-21 Tg ont une espérance de vie très limitée. De plus, les souris IL-21 Tg se divisent en deux groupes : le premier groupe a une espérance de survie d'un maximum de 3 semaines et présente un défaut hématopoïétique caractérisé par l'accumulation de cellules de la lignée myéloïde aux dépens des lignées érythroïdes et lymphoïdes au niveau de la MO. Afin de déterminer sur quelle(s) population(s) de précurseurs hématopoïétiques ou de cellules matures agissait l'IL-21, nous avons vérifié la(les)quelle(s) de ces populations exprimai(en)t l'IL-21R. Nous démontrons que ce récepteur est exprimé par les CLP et absent sur les cellules myéloïdes, progénitrices ou matures. Le deuxième groupe de souris IL-21 Tg englobe toutes les autres souris (survie > 3 semaines) qui démontrent une accumulation de cellules T_M. Nous avons par ailleurs confirmé que l'IL-21 permettait la survie de lymphocytes CD8⁺ activés/mémoires *in vitro*, effet absent chez la population homologue CD4⁺. Nos résultats suggèrent que l'IL-21 participerait activement à la génération et/ou la survie des lymphocytes T ayant un phénotype mémoire. De plus, nous révélons un rôle inattendu de l'IL-21 dans la régulation de l'hématopoïèse. Les sections suivantes ont pour but de discuter les hypothèses conduisant à la compréhension du phénotype mémoire et hématopoïétique observé chez la souris IL-21 Tg.

5.1 ACCUMULATION DE LYMPHOCYTES T PRÉSENTANT UN PHÉNOTYPE MÉMOIRE

La forte représentativité de lymphocytes T exprimant un phénotype mémoire est observée surtout chez les souris dont la longévité dépasse 20 jours. En effet, chez les souris plus jeunes, la proportion occupée par les cellules T dans la rate et les ganglions est très faible (entre 1% et 5%), donc aucun phénotype n'est visible. Nous avons démontré que ces cellules ont les capacités fonctionnelles typiques des lymphocytes T mémoires en termes de production d'IFN- γ suite à une courte stimulation via le RCT et de prolifération suite à un stimulus mitogénique. De plus, nous avons vérifié que le répertoire des lymphocytes T était oligoclonal afin d'éliminer la possibilité que l'accumulation de cellules mémoires ne soit le fruit de la prolifération excessive d'un ou de quelques clones spécifiques. Cependant, comment expliquer cette accumulation de lymphocytes T mémoires aux dépens des cellules T naïves, alors que l'IL-21 est connue pour induire la survie de ces dernières ¹⁰⁸? Plusieurs hypothèses ont été développées et sont décrites dans les sous-sections suivantes. Nous discuterons des possibilités suivantes:

- augmentation du nombre de cellules T_E spécifiques à l'Ag
- disponibilité accrue de cytokines permet à la niche des lymphocytes T mémoires de s'élargir
- diminution de la sensibilité des T_E à l'AICD
- augmentation du taux d'auto-renouvellement des lymphocytes T mémoires
- induction de Bcl-6 chez les lymphocytes T CD8⁺
- prolifération homéostatique des lymphocytes T
- effet de l'IL-21 sur l'expression de récepteurs importants dans la survie des lymphocytes T naïfs et activés/mémoires

5.1.1 Augmentation du nombre de cellules T_E spécifiques à l'Ag

Le groupe de Zeng et al. a observé que l'IL-21 et l'IL-15 agissaient de façon synergique dans l'expansion des lymphocytes CD8⁺ activés/mémoires *in vitro*¹⁰⁶. Lors de la rencontre avec un pathogène, l'IL-21 pourrait permettre la génération accrue de lymphocytes T_E et/ou induire leur survie (Figure 15A). En effet, il a déjà été démontré que l'IL-21 induisait un plus grand nombre de cellules T_E spécifiques à un Ag donné *in vitro*¹⁰⁶ et *in vivo*²⁶². De plus, nous savons que le nombre de cellules T_M dépend du nombre de T_E qui ont été générés lors de la réponse immunitaire⁵⁴. La quantité élevée de cellules T mémoires pourrait donc provenir de la différenciation des cellules T effectrices présentes de façon plus importante chez la souris IL-21 Tg, en accord avec le modèle linéaire de différenciation des cellules T mémoires⁴⁴⁻⁴⁸. Il se pourrait que la rencontre d'Ag environnementaux chez la souris IL-21 Tg génère les lymphocytes T_M observés. Nous pourrions tester cette hypothèse en immunisant une souris IL-21 Tg avec un virus. Au pic de la réponse, il serait possible d'identifier les lymphocytes T spécifiques à l'un des peptides codés par le virus grâce à l'utilisation de tétramères (tétramère de molécules de CMH couplées au peptide codé par le virus). Nous pourrions comparer la proportion occupée par les cellules T spécifiques chez la souris IL-21 Tg versus un contrôle C57BL/6. D'autres souris immunisées avec le virus seraient utilisées pour observer le développement de cellules T mémoires spécifiques à ce virus. Nous pourrions alors comparer si la génération de T_M spécifiques au virus chez la souris IL-21 Tg est plus élevée que chez le contrôle.

Cependant, ceci n'explique pas pourquoi les cellules T mémoires débordent de leur niche et occupent la majorité de l'espace attribué aux lymphocytes T naïfs. Ceci sera discuté dans la section suivante.

5.1.2 Disponibilité accrue de cytokines permet à la niche des lymphocytes T mémoires de s'élargir

L'IL-7 et l'IL-15 sont importantes dans la survie des lymphocytes T naïfs et mémoires ainsi que dans l'auto-renouvellement des cellules CD8⁺ T_M (pour l'IL-15). Notre laboratoire a démontré que l'IL-21 induisait aussi la survie des lymphocytes T naïfs ainsi que celle des cellules CD8⁺ T_M. Les modèles murins Tg pour ces cytokines doivent donc comporter certaines similitudes. La souris IL-7 Tg démontre un accroissement dans le nombre de lymphocytes T et B de 10-20 fois dans les organes lymphoïdes secondaires¹⁴³. Cette augmentation au niveau des cellules T est plus prononcée chez les CD8⁺ que chez les CD4⁺ et la majorité (55-70%) des cellules CD8⁺ arborent un phénotype mémoire. Ces cellules T_M sont fonctionnelles et semblent résulter d'une prolifération homéostatique en réponse aux peptides du soi.

Chez la souris IL-15 Tg ou injectée avec l'IL-15, il y a aussi présence d'une expansion préférentielle des lymphocytes CD8⁺ qui possèdent un phénotype mémoire^{64,281-283}. De plus, l'immunisation des souris IL-15 Tg avec un virus amène la génération d'un nombre supérieur de lymphocytes T CD8⁺ mémoires^{132,283}. Les lymphocytes T de la souris IL-15 Tg produisent de plus grandes quantités d'IFN- γ . Fait intéressant, il y a diminution de l'apoptose chez les cellules T IL-15 Tg induite par l'AICD *in vitro*²⁸². L'ajout d'un Ac dirigé contre l'IL-15 restaure la sensibilité des lymphocytes T à l'AICD. Ceci est en accord avec le rôle positif connu de l'IL-15 sur l'auto-renouvellement et la survie des lymphocytes CD8⁺ T_M^{73,101}.

Les phénotypes mentionnés précédemment ressemblent beaucoup à ce qui est observé chez la souris IL-21 Tg concernant l'accumulation de lymphocytes T ayant un phénotype mémoire ainsi que les propriétés de ceux-ci. Normalement, la génération de nouvelles cellules T mémoires devrait remplacer certains clones déjà présents dans le réservoir mémoire, gardant le nombre de lymphocytes T_M stable¹³⁸. Par contre, dans les deux modèles Tg décrits plus haut, une accumulation de cellules T_M a été observée. L'IL-7 et l'IL-15 régulent la survie et l'auto-renouvellement des

lymphocytes T_M $CD4^+$ et $CD8^+$, respectivement, et leur surexpression permet l'accumulation de cellules T mémoires $CD8^+$. Nous pourrions émettre l'hypothèse que la disponibilité accrue de ces cytokines permet à la niche des lymphocytes T_M de s'agrandir, entraînant une croissance dans le nombre de cellules T mémoires. Compte tenu que la souris IL-21 Tg contient aussi un nombre élevé de lymphocytes T_M $CD8^+$ et que nous démontrons que l'IL-21 induit leur survie¹⁰⁷, il serait possible alors que la niche des cellules T mémoires soit élargie chez la souris IL-21 Tg. En effet, les lymphocytes $CD8^+$ T_M pourraient utiliser l'IL-7, l'IL-15 ou l'IL-21, cette dernière étant la plus abondante dans la souris IL-21 Tg.

5.1.3 Diminution de la sensibilité des cellules T_E à l'AICD

Nous avons démontré que l'IL-21 permet la survie des lymphocytes $CD8^+$ T_M , mais ceci ne pourrait pas expliquer le nombre très important de ces cellules chez la souris IL-21 Tg. En effet, l'IL-21 induirait la survie des cellules T mémoires présentes dans l'organisme, ce qui correspond à un certain pourcentage du nombre total de lymphocytes T. Cependant, chez la souris IL-21 Tg, la très grande majorité des lymphocytes T $CD8^+$ et une partie des $CD4^+$ présentent un phénotype mémoire, ce qui indique qu'un mécanisme autre que la survie doit entrer en action afin d'augmenter le réservoir de lymphocytes T mémoires.

Une autre hypothèse expliquant l'accumulation de cellules T mémoires se base sur la démonstration que la culture de cellules T $CD3^+$ avec l'IL-21 diminue l'expression de CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2) et CD122 (chaîne β des récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15) induite par l'IL-15 *in vitro*¹⁰⁸. Nous pourrions imaginer un scénario où, suite à l'élimination du pathogène, l'action de l'IL-21 aurait diminué l'expression de l'IL-2R α et l'IL-2R β . Lors de la phase de contraction induite par l'IL-2, les cellules T_E seraient donc moins sensibles à l'action de celle-ci. Puisque l'IL-2 induit normalement la mort par apoptose des cellules T_E suite à l'élimination du pathogène, cette situation se produirait de façon moindre dans la souris Tg IL-21, conséquence de la diminution de l'expression de l'IL-2R. Ceci amènerait donc un

plus grand nombre de cellules T_E à survivre durant la phase de contraction, donc une augmentation parallèle du nombre de lymphocytes T_M (Figure 15B). Il serait possible de vérifier cette hypothèse en immunisant une souris $IL-21R^{-/108}$ avec un virus. La détection des lymphocytes T spécifiques s'effectuerait grâce à un tétramère contenant l'un des peptides encodés par le virus. En connaissant la cinétique de la réponse immunitaire au virus utilisé, il serait possible de vérifier, par marquage à l'annexine V, la proportion de lymphocytes T spécifiques au peptide qui sont en apoptose. Si l'IL-21 diminue vraiment la sensibilité des cellules T_E à l'AICD, nous devrions observer un nombre plus important de cellules apoptotiques dans la souris $IL-21R^{-/}$ que dans la souris normale.

D'un autre côté, il serait possible que l'absence de signalisation via l'IL-21R ne provoquerait pas plus d'apoptose des cellules T_E que chez la souris contrôle si l'IL-21 ne fait qu'empêcher la mort des cellules T_E . Nous pourrions donc effectuer cette expérience chez les souris IL-21 Tg qui devraient présenter moins de cellules T_E annexine V^+ par rapport à la souris contrôle. Un travail récent en faveur de cette hypothèse démontre que le transfert de lymphocytes T naïfs spécifiques à un peptide exprimé par une tumeur suivi d'injections d'IL-21 abolit la phase de contraction et permet la génération et le maintien d'une population T mémoire spécifique à long terme²⁷⁷. De plus, les lymphocytes T $CD4^+$ de la souris IL-15 Tg ont été démontrés comme étant résistants à l'AICD, phénomène qui pourrait se produire aussi chez la souris IL-21 Tg²⁸².

5.1.4 Augmentation du taux d'auto-renouvellement des lymphocytes mémoires

Un autre mécanisme par lequel l'IL-21 pourrait augmenter le réservoir des lymphocytes T_M serait d'augmenter le taux d'auto-renouvellement de ces derniers (normalement, la demi-vie des T_M humains se situe entre 22 et 79 jours⁸⁹) (Figure 15C). Une façon simple de vérifier cette possibilité serait d'étudier l'incorporation de bromodeoxyuridine (BrdU) chez une souris IL-21 Tg. Cet analogue de base s'incorpore dans l'ADN lors de la prolifération cellulaire et peut être détecté à l'aide

d'un Ac anti-BrdU. Cette expérience pourrait aussi être effectuée chez une souris normale à qui on aurait injecté du rIL-21. L'objectif serait de voir si l'incorporation de BrdU est présente chez une plus grande proportion de lymphocytes T_M comparativement à une souris contrôle non-Tg ou injectée avec du PBS. Finalement, il est connu que l'IL-15 participe activement au maintien des lymphocytes $CD8^+ T_M$ *in vivo* en agissant sur l'auto-renouvellement de ces derniers^{115,140}. De plus, la culture de cellules triées $CD8^+CD44^{high}$ marquées au CFSE en combinaison avec l'IL-15 et l'IL-21 entraîne une division plus rapide des cellules (majorité de celles-ci sont CFSE négatives) qu'avec l'IL-15 ou l'IL-21 seule après une même période de temps¹⁰⁶. L'IL-21 seule ne semble donc pas promouvoir la division des lymphocytes $CD8^+ T_M$ *in vitro*. Afin de vérifier *in vivo* si l'auto-renouvellement accru potentiel chez la souris IL-21 Tg résulterait de l'action de l'IL-21 seule ou nécessiterait l'effet concomitant de l'IL-15 *in vivo*, nous pourrions effectuer les essais d'incorporation de BrdU chez une souris IL-15^{-/-} à qui nous aurions injecté de l'IL-21 ou la croiser avec une souris IL-21 Tg. Cette même expérience pourrait être conduite chez une souris IL-15R α ^{-/-}.

5.1.5 Induction de l'expression Bcl-6 chez les lymphocytes T $CD8^+$

L'accumulation de lymphocytes T $CD8^+$ mémoires chez la souris IL-21 Tg pourrait aussi être provoquée par l'induction de l'expression d'un facteur de transcription contrôlant le développement et/ou le maintien des lymphocytes $CD8^+ T_M$ suite à la signalisation via le récepteur de l'IL-21. Jusqu'à maintenant, le seul FT connu pour influencer le développement et l'auto-renouvellement des cellules T $CD8^+$ mémoires est le répresseur transcriptionnel Bcl-6^{284,285}. Le groupe de Ichii et al. a démontré que Bcl-6 était important dans la génération et le maintien de lymphocytes T $CD8^+$ mémoires²⁸⁴, surtout au niveau des cellules $CD8^+ T_{MC}$ puisque la proportion occupée par ces dernières dans la rate corrèle avec l'expression de Bcl-6 chez les cellules T²⁸⁵. Bcl-6 est un répresseur transcriptionnel exprimé de façon ubiquitaire, mais est prédominant dans les centres germinatifs des cellules B²⁸⁶⁻²⁸⁸. Afin de démontrer le rôle de Bcl-6 chez les lymphocytes $CD8^+$ mémoires, Ichii et al.

ont utilisé un modèle murin déficient pour l'expression de Bcl-6 (Bcl-6^{-/-}) comparativement à un modèle Tg (*lck-Bcl6*, où le promoteur *lck* conduit l'expression de Bcl-6 dans les lymphocytes T²⁸⁹) et à une souris sauvage²⁸⁴. Après immunisation avec un peptide, les lymphocytes T mémoires de la souris Bcl-6^{-/-} ont disparu de façon rapide (4 semaines) alors que ceux de la souris sauvage se maintenaient. Chez la souris Tg Bcl-6, une augmentation du nombre de cellules CD8⁺ T_M spécifiques était évidente²⁸⁴. D'autre part, un essai d'incorporation de BrdU par les lymphocytes CD8⁺ T_M de la souris Tg Bcl-6 a démontré que trois fois plus de cellules étaient en cycle cellulaire comparativement à une souris sauvage²⁸⁵. Ces résultats soutiennent donc un rôle très important pour Bcl-6 dans la génération, le maintien et la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ mémoires et expliquent pourquoi nous nous attardons plus à ce FT. De plus, il a été démontré que l'IL-21 induisait l'expression du messager de Bcl-6 chez les lymphocytes B²⁷⁰. On pourrait penser que la signalisation du complexe IL-21/IL-21R entraîne aussi la transcription de Bcl-6 dans les cellules T CD8⁺ (Figure 15D). Vu sous cet angle, la présence d'un Ag chez la souris IL-21 Tg entraînerait une réponse immunitaire, puis une phase de contraction où les cellules T_E meurent par apoptose. La présence d'IL-21 en grande quantité permettrait d'induire l'expression de Bcl-6 chez une grande partie des cellules effectrices, conduisant à la génération d'un nombre plus élevé de T_M. De plus, Bcl-6 étant toujours activé par l'IL-21, son expression constante permettrait le maintien et la prolifération des cellules CD8⁺ mémoires générées, similaire à ce qui est observé chez la souris Tg *lck-Bcl6*. D'un autre côté, il serait possible qu'une réponse antigénique ne soit pas nécessaire dans l'induction de l'expression de Bcl-6 chez les lymphocytes T CD8⁺. La signalisation constitutive de l'IL-21R par son ligand dans un contexte sans infection chez la souris IL-21 Tg pourrait induire l'expression de Bcl-6 chez les cellules T CD8⁺, les entraînant à se différencier en cellules T mémoires. Des résultats en faveur de cette hypothèse démontrent que STAT5 régule l'expression de Bcl-6 chez les lymphocytes B humains²⁹⁰. L'IL-21 a été démontrée comme recrutant STAT5 chez une lignée de cellules T leucémiques humaines²⁴⁹. Ceci pourrait être testé en cultivant des lymphocytes T CD8⁺ naïfs avec de l'IL-21

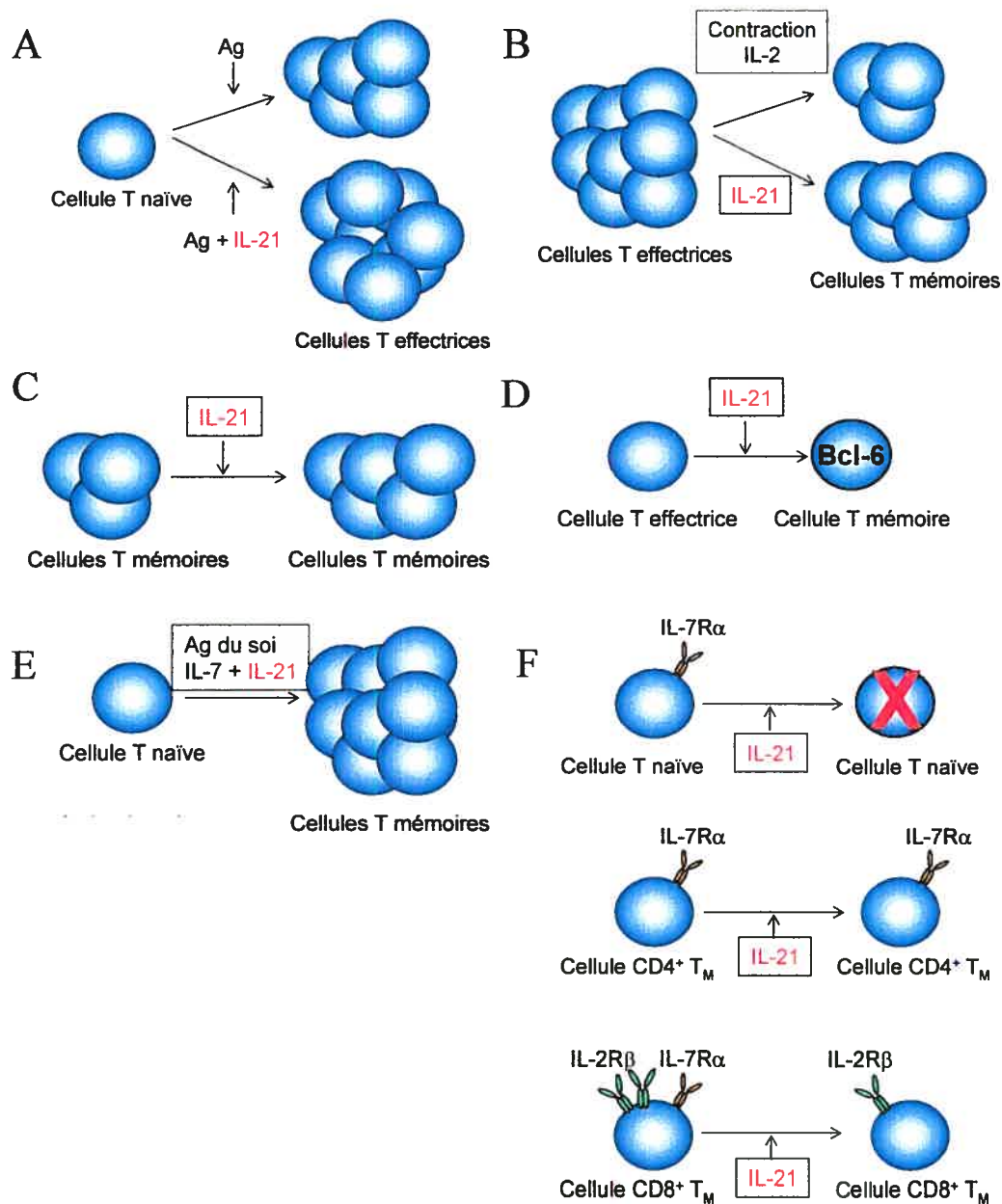


Figure 15. Modèles proposés afin d'expliquer l'accumulation de lymphocytes T ayant un phénotype mémoire dans la souris IL-21 Tg. L'accumulation de cellules mémoires, plus particulièrement des CD8⁺ T_M, peut être le résultat de plusieurs mécanismes impliquant l'IL-21. (A) L'IL-21 a été démontré comme co-stimulant la prolifération de cellules T_E spécifiques à un Ag donné. (B) L'expression de l'IL-2Rα et IL-2Rβ est diminuée par l'IL-21 sur les lymphocytes T. Cela pourrait causer une insensibilité à l'AICD lors de la phase de contraction. L'IL-21 pourrait aussi directement induire la survie des T_E. (C) L'IL-21 induit la survie des CD8⁺ T_M *in vitro*, mais pourrait induire leur auto-renouvellement seul ou en combinaison avec l'IL-15. (D) L'IL-21 induit Bcl-6 chez les lymphocytes B. Il serait possible qu'il en soit de même chez les cellules T CD8⁺. (E) L'accumulation de lymphocytes ayant un phénotype mémoire est peut-être le résultat d'une prolifération homéostatique des cellules T naïves lorsqu'elles arrivent en périphérie. (F) La perte des cellules naïves peut être expliquée par la diminution de l'expression de l'IL-7Rα induite par l'IL-21, causant la mort de celles-ci. Les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ T_M survivent grâce au maintien du récepteur à l'IL-7 ou via l'IL-15, respectivement.

afin d'observer s'il y a induction de l'expression de Bcl-6 ainsi qu'en vérifiant l'expression de Bcl-6 chez la souris IL-21 Tg.

5.1.6 Prolifération homéostatique chez la souris IL-21 Tg

Les hypothèses précédentes expliquent les différentes possibilités causant l'accumulation de lymphocytes T mémoires dans la souris IL-21 Tg. Cependant, il est à noter que non seulement la proportion de cellules mémoires augmente, mais qu'elle prend presque toute la place dans les organes lymphoïdes secondaires. En effet, le nombre de lymphocytes T mémoires équivaut presque à celui du nombre total de lymphocytes T dans les ganglions et la rate. Le phénotype remarqué chez la souris IL-21 Tg n'est donc pas dû seulement à une accumulation de cellules mémoires, mais aussi à la disparition des cellules naïves. Un phénomène pouvant expliquer à la fois la perte de cellules T naïves et l'accumulation de lymphocytes T_M est la prolifération homéostatique. Ce mécanisme opère lorsque l'espace en périphérie alloué aux lymphocytes T n'est pas plein, comme chez la souris lymphopénique *Rag*^{-/-}. En situation de lymphopénie, les lymphocytes T prolifèrent de façon à remplir l'espace disponible. Pendant ce processus de prolifération homéostatique, les lymphocytes T naifs acquièrent un phénotype de cellules T mémoires fonctionnelles et ce, en absence d'Ag^{71,72}.

Cette différenciation des cellules T naives en mémoires pourrait donc expliquer l'accumulation de lymphocytes T mémoires dans la souris IL-21 Tg. Des évidences du groupe de King et al. démontrent que l'IL-21 pourrait être une molécule favorisant la prolifération homéostatique *in vivo* (Figure 15E)²⁷⁸. Ceci est basé sur l'observation que la souris NOD (modèle de diabète autoimmun) est lymphopénique et que le gène de l'IL-21 est présent dans le locus de susceptibilité au diabète de type I *Idd3*. De plus, les niveaux du messager de l'IL-21 dans les lymphocytes T provenant de la souris NOD sont 4 à 7 fois plus élevés que chez la souris contrôle contenant le locus *Idd3* protecteur d'une souris B6. Une plus grande proportion des cellules T activées/mémoires exprimant l'IL-21R dans la souris NOD prolifèrent, ce

qui suggère que la signalisation de l'IL-21 via son récepteur induit les lymphocytes T à proliférer. Ceci induirait donc la prolifération homéostatique. Cependant, quelques évidences vont à l'encontre de cette hypothèse. Premièrement, nous avons effectué une expérience qui reproduit la prolifération homéostatique *in vitro*. En effet, la culture de DC avec des lymphocytes T marqués au CFSE permet de recréer l'expansion homéostatique en combinaison avec l'IL-7. En cultivant les cellules T avec l'IL-21, nous avons remarqué l'absence de prolifération homéostatique *in vitro* comparativement à l'IL-7 (résultat non montré). Deuxièmement, la prolifération homéostatique ne rétablit pas le nombre de cellules retrouvé dans les organes lymphoïdes secondaires des souris normales^{85,291-294}. Au contraire, notre souris IL-21 Tg démontre une cellularité dans la rate et les ganglions lymphatiques équivalente à celle des souris non-Tg. Aucune indication ne nous permet de penser que la souris IL-21 Tg a été ou est lymphopénique. Nous pourrions évaluer si la lymphopénie est présente chez la souris IL-21 Tg en lui transférant des lymphocytes T préalablement marqués au CFSE ayant un RCT Tg, de façon à pouvoir les reconnaître. Nous pourrions comparer la prolifération des cellules T transférées observée chez la souris IL-21 Tg avec celle obtenue chez une souris non-Tg. Cependant, les souris IL-7 Tg présentent une accumulation de lymphocytes T et pourtant, l'accumulation de lymphocytes T CD8⁺ ayant un phénotype mémoire est due à la prolifération homéostatique¹⁴³. En effet, il a été démontré que l'abondance d'IL-7 amplifiait la reconnaissance de complexes CMH : peptide du soi par les cellules T naïves. Ces démonstrations suggèrent que la reconnaissance d'un complexe CMH : peptide du soi par le RCT d'une cellule T naïve en présence d'IL-7 permet la survie de la cellule. En cas d'abondance d'IL-7, le contact du RCT est augmenté, entraînant les cellules T naïves à proliférer et se différencier en cellules T mémoires¹⁴³. Il se pourrait que l'IL-21 fasse de même, ce qui confirmerait l'hypothèse de la prolifération homéostatique.

5.1.7 Effet de l'IL-21 sur l'expression de récepteurs importants dans la survie des lymphocytes T naïfs et activés/mémoires

La cytokine essentielle à la survie des lymphocytes T naïfs CD4⁺ et CD8⁺ est l'IL-7. De plus, l'IL-7 est perçue comme étant le joueur limitant dans l'espace périphérique accordé aux cellules T, puisque ces dernières doivent rivaliser entre elles afin de recevoir un signal de survie ^{68,295}. D'autre part, le groupe de Park et al. a démontré que l'IL-7 ainsi que d'autres membres de la famille des cytokines γ_c (l'IL-21 n'a pas été étudié) inhibaient l'expression de l'IL-7R α au niveau transcriptionnel ²⁹⁶. Notre laboratoire a démontré que l'IL-21 était aussi une cytokine pro-survie pour les lymphocytes T naïfs ¹⁰⁷. De façon intéressante, les cytokines ayant le plus d'effet sur l'expression de l'IL-7R α sont celles sécrétées lors d'une réponse immunitaire (IL-2, IL-4, IL-6 et IL-15), donc plutôt absentes à l'état basal. Dans un organisme normal en absence d'infection, l'IL-21 ne serait produite que par les cellules stromales des organes lymphoïdes secondaires. Cependant, dans la souris IL-21 Tg, elle est fortement présente peu importe la présence d'une infection ou non grâce au promoteur du CMH de classe I. Nous avons démontré que l'IL-21 inhibait l'expression de l'IL-7R α sur les cellules T naïves. Ceci pourrait expliquer la perte de ces dernières dans la souris IL-21 Tg, vue leur grande dépendance vis-à-vis cette cytokine pour leur survie. En effet, l'effet de survie via l'IL-7 passe par l'augmentation de Bcl-2, un facteur pro-survie, ainsi que par l'activation de la voie PI3-K. L'IL-21 quant à elle maintient l'expression de Bcl-2 et induit la cascade PI3-K. La différence dans l'induction de la survie entre l'IL-7 et l'IL-21 réside donc dans leur action sur le niveau d'expression de Bcl-2 : la première induit Bcl-2, la seconde maintient Bcl-2. Puisque l'IL-21 est présente en plus grande quantité chez la souris IL-21 Tg que l'IL-7, les cellules T ont donc plus de chance de recevoir un signal par l'IL-21, ce qui induit leur survie et inhibe l'expression de l'IL-7R α . Il se pourrait qu'à plus long terme, l'effet de survie de l'IL-21 sur les lymphocytes T naïfs ait un impact moindre que celui normalement généré par l'IL-7, causant la disparition des cellules T naïves. De plus, l'IL-21 ayant été démontré comme inhibant la présence de son propre récepteur, les cellules naïves n'exprimeraient ni l'IL-21R, ni l'IL-7R α , ce

qui pourrait diriger les lymphocytes naïfs vers leur mort cellulaire (Figure 15F). Cependant, il nous reste à prouver que l'expression des récepteurs à l'IL-7 et à l'IL-21 est diminuée chez les lymphocytes T naïfs de la souris IL-21 Tg par cytométrie en flux et/ou RT-PCR semi-quantitatif.

Dans un autre ordre d'idée, la survie des lymphocytes T mémoires $CD4^+$ et $CD8^+$ dépend de l'IL-15, pour les $CD8^+$, et de l'IL-7, pour les $CD4^+$ et $CD8^+$. De façon intéressante, le récepteur à l'IL-7 est maintenu sur les $CD4^+$ T_M et diminué sur les cellules $CD8^+$ T_M lors de la culture *in vitro* avec l'IL-21. Ces deux populations peuvent survivre *in vivo* chez la souris IL-21 Tg, les cellules $CD4^+$ T_M utilisant l'IL-7 et les $CD8^+$ dépendant surtout de l'IL-15 (Figure 15F). Cependant, l'expression de l'IL-2R β était réduite chez ces derniers. Ceci était inattendu compte tenu de l'accumulation de lymphocytes T $CD8^+$ présentant un phénotype mémoire ainsi que de l'importance de l'IL-15 dans leur survie. Par contre, il a été démontré que l'expression de l'IL-2R β n'avait pas à être forte afin que l'IL-15 puisse induire la survie de sa population cible¹⁰¹. De plus, il existe une population de cellules $CD8^+$ T_M qui est indépendante de l'IL-15 et porte un phénotype $CD44^{high}CD122^{low}$ ²⁹⁷. Cette population est présente chez les souris IL-15^{-/-} et IL-15R^{-/-}. Il se pourrait donc que l'IL-21 induise la prolifération et/ou la survie de ce groupe qui composerait la majeure partie des lymphocytes T $CD8^+$ mémoires de la souris IL-21 Tg, ceci reste à vérifier.

Finalement, le groupe de Kamimura et al. a soulevé un point intéressant lorsqu'ils ont démontré qu'une troisième cytokine de la famille γ_c pouvait utiliser l'IL-2R β afin d'induire l'expansion des cellules $CD8^+CD44^{high}$ ²⁹⁸. Brièvement, ils ont montré que ces lymphocytes se divisaient de façon normale dans une souris déficiente en IL-15 à qui on avait injecté un Ac anti-IL-2. Par contre, cet auto-renouvellement était complètement aboli lors de l'ajout d'un Ac anti-IL-2R β , impliquant qu'une troisième cytokine pouvait signaler via l'IL-2R β et induire la prolifération de $CD8^+$ T_M . L'IL-21R étant connu pour partager beaucoup d'homologie avec l'IL-2R β (29% d'identité, 46% de similarité), l'IL-21 serait un bon

candidat comme troisième cytokine utilisant l'IL-2R β . Ceci pourrait même expliquer pourquoi l'IL-21 diminue l'expression de l'IL-2R β sur les cellules CD8⁺ T_M si elle l'utilise dans sa signalisation. Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions utiliser les souris IL-15^{-/-} et les injecter avec un Ac anti-IL-2 ainsi qu'un anti-IL-21. Il serait possible alors d'étudier l'auto-renouvellement des lymphocytes T CD8⁺ T_M chez la souris IL-15^{-/-} où l'IL-2 et l'IL-21 ne sont plus disponibles en présence ou non d'un Ac anti-IL-2R β . Si l'IL-21 est la 3^e cytokine utilisant l'IL-2R β , il devrait y avoir absence de division des cellules T CD8⁺ chez les souris injectées avec l'Ac anti-IL-21 avec ou sans l'anti-IL-2R β .

Toutes les hypothèses décrites précédemment pourraient expliquer la cause de l'accumulation de lymphocytes T ayant un phénotype mémoire chez la souris IL-21 Tg. Cependant, certaines sont favorisées à nos yeux. Nous croyons que l'IL-21, par son abondance, augmente l'espace alloué à la niche des cellules T mémoires. Comme les lymphocytes T_M dépendent de l'IL-7 et de l'IL-15 (pour les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ respectivement), la présence de l'IL-21 permet aux lymphocytes CD8⁺ T_M de prendre plus de place, car ils ne dépendent plus seulement de l'IL-15. Il serait très possible que l'IL-21, en plus de son rôle de survie chez les lymphocytes CD8⁺ mémoires, induise aussi l'auto-renouvellement de ces derniers. La perte concomitante des cellules T naïves serait la conséquence de l'inhibition de l'expression du récepteur de l'IL-7 par l'IL-21 et/ou l'induction de l'expression de Bcl-6 chez celles-ci. L'explication du phénotype mémoire observé chez la souris IL-21 Tg représente donc un défi stimulant.

5.2 PHÉNOTYPE HÉMATOPOÏÉTIQUE CHEZ LA SOURIS IL-21 TG

Lors de la caractérisation du modèle murin surexprimant l'IL-21, nous avons observé la présence de deux phénotypes distincts chez les souris IL-21 Tg. Le premier groupe avait une durée de vie ne dépassant pas 3 semaines alors que dans le 2^e groupe, la survie était supérieure à 3 semaines. La différence expliquant pourquoi nous obtenons deux groupes de souris réside peut-être dans le site d'intégration du

transgène. En effet, chaque souris IL-21Tg pourrait présenter un site d'insertion du transgène différent. Les séquences amplificatrices, inhibitrices ou promotrices se trouvant dans les environs de l'insertion pourraient moduler l'expression transgénique. De plus, il se pourrait que le transgène abolisse l'expression d'un autre gène important, conduisant au phénomène hématopoïétique que nous avons observé. Il serait donc intéressant de comparer la concentration en IL-21 du sérum des souris IL-21 Tg versus leur durée de vie afin de voir si une corrélation existe entre l'espérance de vie de la souris IL-21 Tg et son niveau d'IL-21 sérique. Pour résumer, le groupe 1 de souris IL-21 Tg présente un défaut de lymphopoïèse dans la MO puisqu'il y a absence de précurseurs B ($B220^{+}IgM^{-}$) et cellules B matures ($B220^{+}IgM^{+}$). Les pro-B sont normaux dans la rate, mais on y note l'absence de cellules B matures. Malheureusement, l'érythropoïèse n'a pas encore été analysée chez ce groupe de souris IL-21 Tg. L'absence de lymphopoïèse est aussi observée dans la MO chez le groupe 2 de souris IL-21 Tg. Il y a perte des précurseurs B et moins de cellules B matures. Au niveau de la rate, nous voyons un nombre supérieur de progéniteurs B et une diminution de cellules B matures. Les souris du groupe 2 possèdent une érythropoïèse réduite dans la MO qui semble compensée par une accumulation d'érythrocytes dans la rate. Chez les deux groupes de souris IL-21 Tg, nous avons remarqué l'accumulation de cellules de la lignée myéloïde ($CD11b^{+}Gr-1^{+}$) dans la MO, cette sur-représentation étant massive dans la rate. La souris IL-21 Tg présente un défaut hématopoïétique qui pourrait expliquer leur viabilité réduite. **Ainsi**, nous avons procédé à une greffe de MO chez des souris syngéniques irradiées. Lors de l'analyse de la souris receveuse, i.e. aux environs du jour 25 post-greffe où elle montrait des signes de grande faiblesse, nous avons remarqué la présence de ce même phénotype hématopoïétique. Ceci suggère donc que l'IL-21 régule l'hématopoïèse et, lorsque présente en grandes quantités, cause la mortalité chez les souris IL-21 Tg due à un défaut dans le développement des progéniteurs hématopoïétiques.

Les sous-sections suivantes présentent les différentes hypothèses afin d'expliquer le rôle de l'IL-21 dans la régulation de l'hématopoïèse

5.2.1 Accumulation de cellules myéloïdes au détriment des lignées érythroïdes et lymphoïdes

Comme nous avons observé une accumulation de cellules myéloïdes dans la MO et la rate de la souris IL-21 Tg, nous suggérons que l'IL-21 inhibe la lymphopoïèse et l'érythropoïèse au profit de la myélopoïèse chez la souris IL-21 Tg. L'absence de pro-, pre- et cellules immatures B dans la MO des souris IL-21 Tg pourrait être causée par un effet toxique de l'IL-21 sur cette population. En effet, il n'a pas été démontré que l'IL-21 était une cytokine produite de façon endogène par la MO dans une souris sauvage. La forte présence d'IL-21 dans la MO de la souris IL-21 Tg pourrait avoir comme conséquence la mort par apoptose de la lignée lymphoïde B. Des évidences suggèrent que l'IL-21 induit l'apoptose chez les cellules B naïves et activées de la rate tout en les stimulant à proliférer^{253,266}. Cependant, les effets sur les cellules B de la MO ne sont pas connus. Nous pourrions étudier l'effet de l'IL-21 sur la lignée lymphoïde B (pro-, pre-B, B immatures et matures) de la MO par injection de rIL-21 à des souris sauvages ou tout simplement en cultivant des lymphocytes B avec de l'IL-21. En utilisant le marquage à l'annexine V, il serait possible d'observer s'il y a apoptose chez les différents stades de maturation B causée par l'IL-21 à différents temps.

La colonisation de la rate par les progéniteurs B dans la souris IL-21 Tg est peut-être un mécanisme compensatoire ayant pour but d'améliorer l'homéostasie des lymphocytes B en périphérie. Quoique surprenant, la présence de progéniteurs B dans la rate IL-21 Tg a déjà été illustrée chez une souris surexprimant l'IL-7 sous le contrôle du promoteur de CMH de classe II^{299,300}. Cependant, l'IL-7 est connue pour réguler le développement des lymphocytes B, ce qui n'est pas le cas de l'IL-21. Toutefois, l'IL-21R est exprimé par les cellules B pendant leur développement, ce qui pourrait suggérer un rôle de l'IL-21 dans le développement des lymphocytes B^{107,253}. De plus, un autre groupe a démontré la présence de cellules B immatures dans la rate

chez une souris IL-21 Tg²⁷⁰. À la différence de notre souris, la souris IL-21 Tg construite par ce groupe surexprime l'IL-21 humain.

La présence plus élevée d'érythrocytes dans la rate IL-21 Tg servirait aussi à combler le manque laissé par leur absence dans la MO. En effet, des travaux précédents suggèrent qu'une anémie causée par le manque d'érythrocytes amène l'hypoxie dans les tissus, induisant l'expression d'érythropoïétine (Epo) par les reins. L'augmentation de la concentration sérique en Epo entraînerait les cellules de la MO à migrer vers la rate où elles se différencient et prolifèrent^{301,302}. D'ailleurs, la rate supporte très bien l'érythropoïèse³⁰³. Il serait envisageable de prolonger la survie des souris IL-21 Tg en leur injectant de l'EPO, ce qui inhiberait l'anémie présente et pourrait prolonger la survie de celles-ci.

Afin de confirmer que l'IL-21 inhibe la lymphopoïèse et l'érythropoïèse au profit de la myélopoïèse chez la souris IL-21 Tg, nous pourrions cultiver les cellules de la MO et/ou de la rate de celles-ci dans un milieu supportant le développement de colonies pre-B (rIL-7), érythroïdes (SCF, érythropoïétine), ou myéloïdes (IL-3, IL-6, SCF). En phénotypant et comptant le nombre de colonies obtenues dans chacun des milieux, il nous serait possible de déterminer l'activité progénitrice des cellules de la MO et ou/de la rate provenant de souris IL-21 Tg pour chaque lignée. Afin de vérifier l'effet direct de l'IL-21 *in vitro* sur le développement de ces différents types de colonies, il serait très intéressant de cultiver des cellules de MO ou de rate prélevées d'une souris normale B6 dans les milieux mentionnés précédemment. L'ajout de rIL-21 à ces milieux pourrait nous donner une indication sur le rôle de l'IL-21 dans le développement des différentes lignées. Cependant, cet effet de l'IL-21 sur les cellules précurseurs doit passer par la signalisation via son récepteur, l'IL-21R. Nous avons donc caractérisé l'expression de l'IL-21R sur les différents types de progéniteurs de la MO chez une souris normale.

5.2.2 Expression de l'IL-21R sur les progéniteurs hématopoïétiques

Puisque la souris IL-21 Tg présente une sur-représentation de cellules myéloïdes dans la MO et une diminution concomitante des lymphocytes B et des érythrocytes, nous pensons que l'IL-21R doit être exprimé par les cellules myéloïdes. L'accumulation de cellules myéloïdes serait donc expliquée par une prolifération des cellules myéloïdes immatures et/ou matures. Afin d'expliquer comment l'IL-21 cause les défauts hématopoïétiques, nous avons tenté de détecter la/les population(s) hématopoïétique(s) exprimant l'IL-21R chez une souris sauvage. Compte tenu de l'accumulation de cellules myéloïdes chez la souris IL-21 Tg, nous pensions trouver l'expression de l'IL-21R sur les cellules myéloïdes matures, ce qui aurait suggéré un rôle de l'IL-21 dans la survie et/ou la prolifération de celles-ci. Puisque tel n'était pas le cas, nous nous sommes tournés vers les progéniteurs myéloïdes, mais l'IL-21R brillait toujours par son absence. En dernier recours, nous avons analysé les CLP de la souris sauvage. Nous avons été surpris de constater l'expression de l'IL-21R sur les CLP par RT-PCR, car ce résultat implique dès lors que l'IL-21 agit directement sur les CLP. Dans les sections suivantes, nous proposons certains mécanismes par lesquels l'IL-21 pourrait agir sur les CLP.

5.2.2.1 Effet de l'IL-21 sur l'expression de l'IL-7R chez les CLP et répercussion sur le développement des cellules B et T

Nous avons démontré que l'IL-21 diminuait l'expression de l'IL-7R α sur les lymphocytes T naïfs ainsi que sur les cellules T CD8⁺ activées/mémoires. Si l'IL-21 cause aussi la diminution de l'IL-7R sur les CLP, ceci peut avoir des conséquences importantes au niveau du développement des stades de différenciation subséquents. L'expression de l'IL-7R α par les CLP est essentielle pour le développement des lignées lymphoïdes B et T, car l'IL-7 induit la différenciation des CLP vers les lymphocytes B et permet aux progéniteurs T arrivés dans le thymus de proliférer aux stades DN et de survivre via l'induction de Bcl-2^{162,163,206,215,216,218,304}. La forte présence d'IL-21 pourrait donc causer une diminution dans la différenciation des

CLP vers les lymphocytes B, expliquant leur absence dans la MO de la souris IL-21 Tg. Par le fait même, la survie des progéniteurs T et leur développement pourraient aussi être altérés, ces derniers ne recevant plus de signaux de survie et de prolifération via l'IL-7R α . Il est à noter que le thymus des souris IL-21 Tg montre une forte diminution du nombre de thymocytes DP, ce qui pourrait être causé par l'absence de prolifération chez les stades DN due à la perte de l'expression de l'IL-7R α .

Cependant, la diminution de l'expression de l'IL-7R α par l'IL-21 ne pourrait affecter directement la survie des CLP. En effet, la signalisation via ce récepteur n'est pas essentielle dans le maintien d'un nombre normal de CLP, comme constaté chez une souris déficiente en IL-7R α ^{162,206}. L'absence de l'IL-7R α sur les CLP jouerait donc un rôle négatif dans la différenciation des CLP vers les lymphocytes B et T plutôt que dans la survie des CLP. Il serait intéressant de cultiver des CLP de souris sauvage sur un milieu permettant le développement de colonies B et d'y ajouter de l'IL-21. Ceci pourrait récapituler l'effet de l'IL-21 sur le développement de ces deux populations afin de vérifier si celui-ci est inhibé.

Évidemment, il serait intéressant de confirmer la baisse de l'expression du récepteur à l'IL-7 sur les CLP de la souris IL-21 Tg. Par contre, nous prévoyons quelques difficultés à identifier ces derniers, compte tenu que la reconnaissance des CLP est basée sur l'expression de l'IL-7R α . Il nous faudrait aussi confirmer que l'IL-21 diminue l'expression de l'IL-7R α chez les CLP. Il faudrait pour cela trier des CLP qui seraient ensuite cultivés *in vitro* en présence ou absence de rIL-21. Par cytométrie en flux ou RT-PCR, nous pourrions détecter si l'IL-21 diminue l'expression de l'IL-7R α sur les CLP.

5.2.2.2 Signalisation par l'IL-21R sur les CLP

Nous avons observé une accumulation de cellules myéloïdes chez la souris IL-21 Tg alors que l'IL-21R est exprimé par les CLP. Ceci implique que la

signalisation via l'IL-21R provoquerait un changement de différenciation des CLP vers la lignée myéloïde. Nous nous devons de noter que l'expression de l'IL-21R sur les CLP est très faible comparativement à celle observée sur les lymphocytes matures. Ceci soulève la question suivante : Est-ce que le niveau d'expression de l'IL-21R est proportionnel au besoin de la cellule de recevoir un signal de l'IL-21? En effet, pour l'IL-7, des cellules T cultivées en son absence augmentent l'expression de l'IL-7R α alors que la présence d'IL-7 la diminue ²⁹⁶. Nous savons que l'IL-21R est exprimé fortement sur les lymphocytes T et B activés. Ces derniers requièrent des signaux via l'IL-21R afin d'induire la production d'IgG et l'apoptose chez les cellules B, ainsi que la prolifération chez les lymphocytes T et B. Ces exemples démontrent à quel point une forte expression de l'IL-21R permet à ces types cellulaires de répondre à une infection. Cependant, la production d'IL-21 dans la MO n'a pas été démontrée. Sa forte présence dans la souris IL-21 Tg pourrait donc conduire à une signalisation intracellulaire chez les CLP de la souris IL-21 Tg qui est normalement absente chez les CLP d'une souris sauvage.

L'action de l'IL-21 dans le changement de lignée de différenciation pourrait donc se présenter sous forme d'expression de récepteurs normalement absents chez les CLP ou par l'activation et/ou l'inhibition de FT importants dans le développement myéloïde et lymphoïde. Des évidences en faveur de cette hypothèse ont été obtenues par deux groupes de recherche ^{165,211}. La transfection de CLP avec le gène pour le GM-CSFR ou l'IL-2R a permis aux CLP d'exprimer de façon ectopique ces récepteurs qui ne sont pas présents normalement chez cette population. La culture de ces CLP transfectées avec l'IL-2 ou le GM-CSF a entraîné celles-ci à se différencier vers la lignée myéloïde, démontrant que l'action de cytokines peut changer le programme de différenciation d'une lignée de développement vers une autre ^{165,211}. Dans le cas de la souris IL-21 Tg, l'activation constitutive d'un FT comme PU.1 dans les CLP par l'IL-21 pourrait inhiber l'expression de l'IL-7R α et activer la transcription des gènes codant pour les récepteurs de cytokines myéloïdes. Ces dernières pourraient alors transmettre des signaux à une cellule auparavant dédiée à la lignée lymphoïde. Il nous serait possible d'examiner l'expression de récepteurs

normalement absents sur les CLP (GM-CSFR, G-CSFR) cultivés ou non avec l'IL-21 afin de comprendre si le changement dans la lignée de différenciation est dû à l'action de cytokines myéloïdes via leurs récepteurs. De plus, nous pourrions vérifier l'activation ou l'inhibition de FT importants dans le développement myéloïde ou lymphoïde en cultivant les CLP avec l'IL-21. L'expression de gènes cibles (comme PU.1, IL-7R α , EBF, GATA-1) chez les CLP traités ou non avec l'IL-21 serait ensuite analysée.

D'un autre côté, l'IL-21 pourrait simplement mener à l'apoptose des CLP, laissant toute la place aux cellules myéloïdes. Il serait possible que l'IL-21 induise la mort des CLP comme elle le fait chez les lymphocytes B^{253,266}. Ceci pourrait être étudié en cultivant les CLP avec l'IL-21 et observer si elles subissent l'apoptose en les marquant à l'annexine V.

5.2.2.3 Activation de FT et expression de récepteurs aberrants par les CLP

L'expression de l'IL-7R α représente le changement initial dans la différenciation des CSH vers les CLP, car ce récepteur est absent des CSH¹⁵⁷. De plus, la diminution de l'expression de GM-CSFR serait aussi importante dans l'engagement vers la lignée lymphoïde, puisque l'expression ectopique de ce récepteur chez les CLP entraîne ces derniers à se développer dans la lignée myéloïde *in vitro*¹⁶⁵. De façon intéressante, l'expression de l'IL-7R α et du GM-CSFR est contrôlée par le FT PU.1^{205,305,306}. Une forte expression de PU.1 active la transcription du GM-CSFR, alors qu'une faible expression de PU.1 induit l'expression de l'IL-7R α . De plus, l'engagement des CSH vers les CLP ou les CMP est dépendant de la concentration en PU.1. Une quantité plus élevée de PU.1 dirige les cellules vers le développement myéloïde plutôt que lymphoïde²⁰⁰. Nous proposons deux mécanismes expliquant le phénotype myéloïde observé dans la MO de la souris IL-21 Tg (Figure 16). Premièrement, l'IL-21, en se liant à l'IL-21R, pourrait inhiber l'expression de l'IL-7R α , qui ne pourrait signaler via le FT EBF²¹⁹. Ce dernier serait incapable d'activer la transcription de Pax5³⁰⁷, qui normalement est

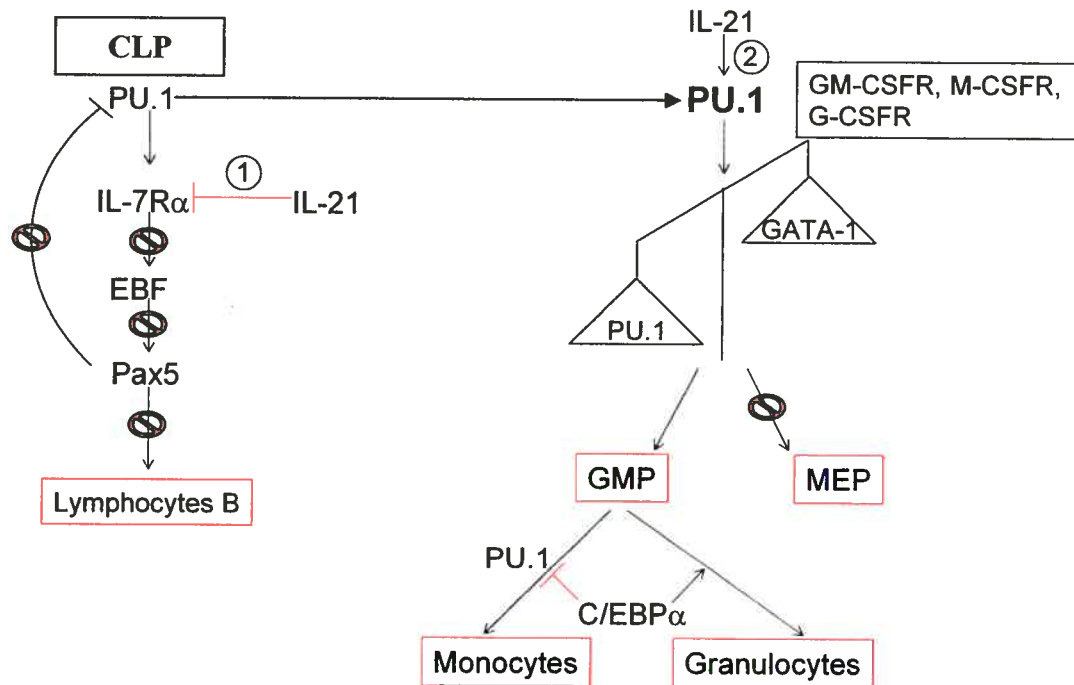


Figure 16. Modèle hypothétique proposé sur l'effet de l'IL-21 chez les CLP dans la souris IL-21 Tg. Nous avons démontré que les CLP expriment le récepteur à l'IL-21. Afin d'expliquer l'absence de développement B et l'accumulation de cellules myéloïdes, nous suggérons deux mécanismes. Le premier tire partie des observations que l'IL-21 inhibe l'expression de l'IL-7R α sur les lymphocytes T naïfs périphériques. S'il en est de même sur les CLP, la perte de l'IL-7R α entraînera un arrêt du développement B. De plus, le FT PU.1 pourrait s'accumuler puisqu'il n'est pas modulé par Pax5 et s'autoactive. L'abondance de PU.1 empêchera GATA-1 de diriger les CMP vers les MEP, donc la différenciation s'effectuera plutôt du côté des GMP. Ceux-ci peuvent ensuite devenir granulocytes ou monocytes matures selon l'expression de C/EBP α .

un antagoniste de PU.1³⁰⁸. Ce dernier serait alors présent en grandes quantités puisqu'il se transcrit par lui-même³⁰⁹, favorisant la différenciation de ce qui était auparavant une cellule CLP vers la lignée myéloïde. De plus, PU.1 est reconnu pour moduler à la hausse l'expression des récepteurs des cytokines myéloïdes (GM-CSF, M-CSF, G-CSF). L'expression de ces derniers favoriserait la maturation le long des stades myéloïdes, inhibant toute différenciation lymphoïde au profit des CMP. Le deuxième mécanisme impliquerait l'activation directe de PU.1 comme cible de la signalisation via l'IL-21R, le reste de la cascade étant identique à ce qui a été décrit ci-haut. Ceci aurait deux conséquences : une haute teneur en PU.1 dirige la différenciation des précurseurs vers la lignée myéloïde. L'expression des gènes relatifs au développement de la lignée B serait donc très diminuée. De plus, dès le choix myéloïde engagé, le ratio PU.1/GATA-1 serait en faveur de PU.1. Ces deux FT

étant des antagonistes et GATA-1 entraînant la différenciation vers les MEP, les précurseurs seraient dirigés vers les GMP. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de PU.1 dans les cellules totales provenant de la MO de souris IL-21 Tg afin de vérifier si la signalisation par l'IL-21R n'induirait pas ce FT, provoquant ainsi son augmentation.

Évidemment, l'analyse du transcrite de GATA-1 dans la MO de la souris IL-21 Tg permettrait de confirmer cette hypothèse. Ceci expliquerait l'absence de cellules érythroïdes. Ensuite, nous pourrions analyser l'expression de C/EBP α , le joueur permettant le développement des granulocytes aux dépens des monocytes, puisqu'il inactive PU.1³¹⁰. La suite d'expériences décrites dans cette section nous permettrait de comprendre comment l'IL-21 agit sur les populations hématopoïétiques, conduisant à l'accumulation de cellules de la lignée myéloïde. Ceci serait un nouvel exemple de l'action d'une cytokine dans la détermination du choix de lignée de différenciation.

5.3 CONCLUSION

Cette étude a permis de caractériser le rôle de l'IL-21 *in vivo* dans l'homéostasie des lymphocytes T. Nous avons été surpris de constater que malgré des résultats *in vitro* démontrant que l'IL-21 était un facteur de survie chez les lymphocytes T naïfs, le phénotype observé chez la souris IL-21 Tg consistait en l'accumulation de lymphocytes T_M. En effet, ceux-ci présentent les caractéristiques fonctionnelles des cellules T mémoires dont la production d'IFN- γ et la prolifération suite à une stimulation. Ces résultats amèneront une meilleure compréhension des mécanismes régulant l'homéostasie des lymphocytes T. De plus, l'effet de l'IL-21 sur l'expansion de cellules T spécifiques à un Ag pourrait être utilisé lors de l'administration de vaccins thérapeutiques. L'ajout de l'IL-21 au vaccin thérapeutique permettrait une meilleure réponse immunitaire afin d'enrayer une maladie ou une tumeur. Le rôle de l'IL-21 dans la génération et/ou la survie des lymphocytes T mémoires peut s'avérer important au niveau de la vaccination préventive. En effet, le succès de la vaccination préventive réside dans la génération d'une population mémoire efficace et stable à travers le temps. L'IL-21 pourrait aider, via la génération de lymphocytes T mémoires, à développer une meilleure protection contre les infections chez des sujets à risque.

Étonnamment, la souris IL-21 Tg démontre une viabilité diminuée qui serait la conséquence d'un défaut hématopoïétique. Les analyses effectuées sur la MO et la rate ont permis de découvrir une accumulation de cellules myéloïdes. De plus, la MO est dépourvue de lymphocytes B et d'érythrocytes. Ceci suggère donc un rôle inattendu pour l'IL-21 dans la détermination du choix de différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, choix biaisé vers la lignée myéloïde. Cette découverte permettra une meilleure compréhension des mécanismes régulant le choix de différenciation des progéniteurs de la MO. En outre, il pourrait être utile d'étudier l'effet de l'IL-21 chez des patients souffrant d'un manque en cellules du système inné (granulocytes, monocytes). Finalement, la compréhension du phénotype de la souris

IL-21 Tg devrait nous donner des indices concernant le développement de syndromes myéloprolifératifs, par exemple les leucémies myéloïdes chroniques.

RÉFÉRENCES

1. Bazan, J.F. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* **11**, 350-4 (1990).
2. Thoreau, E., Petridou, B., Kelly, P.A., Djiane, J. & Mornon, J.P. Structural symmetry of the extracellular domain of the cytokine/growth hormone/prolactin receptor family and interferon receptors revealed by hydrophobic cluster analysis. *FEBS Lett* **282**, 26-31 (1991).
3. Bazan, J.F. A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem Biophys Res Commun* **164**, 788-95 (1989).
4. Idzerda, R.L. et al. Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J Exp Med* **171**, 861-73 (1990).
5. Bazan, J.F. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6934-8 (1990).
6. Wlodawer, A., Pavlovsky, A. & Gustchina, A. Hematopoietic cytokines: similarities and differences in the structures, with implications for receptor binding. *Protein Sci* **2**, 1373-82 (1993).
7. He, Y.W. & Malek, T.R. The structure and function of gamma c-dependent cytokines and receptors: regulation of T lymphocyte development and homeostasis. *Crit Rev Immunol* **18**, 503-24 (1998).
8. Nelson, B.H. & Willerford, D.M. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* **70**, 1-81 (1998).
9. Sugamura, K. et al. The common gamma-chain for multiple cytokine receptors. *Adv Immunol* **59**, 225-77 (1995).
10. Leonard, W.J., Shores, E.W. & Love, P.E. Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunol Rev* **148**, 97-114 (1995).
11. Grabstein, K.H. et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* **264**, 965-8 (1994).
12. Noguchi, M. et al. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* **73**, 147-57 (1993).
13. Leonard, W.J., Noguchi, M., Russell, S.M. & McBride, O.W. The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: the role of the interleukin-2 receptor gamma chain as a common gamma chain, gamma c. *Immunol Rev* **138**, 61-86 (1994).
14. Sugamura, K. et al. The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol* **14**, 179-205 (1996).
15. Conley, M.E. et al. Nonrandom X chromosome inactivation in B cells from carriers of X chromosome-linked severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3090-4 (1988).

16. Wengler, G.S., Allen, R.C., Parolini, O., Smith, H. & Conley, M.E. Nonrandom X chromosome inactivation in natural killer cells from obligate carriers of X-linked severe combined immunodeficiency. *J Immunol* **150**, 700-4 (1993).
17. Leonard, W.J. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol* **1**, 200-8 (2001).
18. Tanner, J.W., Chen, W., Young, R.L., Longmore, G.D. & Shaw, A.S. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J Biol Chem* **270**, 6523-30 (1995).
19. Vosshenrich, C.A. & Di Santo, J.P. Interleukin signaling. *Curr Biol* **12**, R760-3 (2002).
20. Rane, S.G. & Reddy, E.P. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* **19**, 5662-79 (2000).
21. Johnston, J.A. et al. Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature* **370**, 151-3 (1994).
22. Witthuhn, B.A. et al. Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature* **370**, 153-7 (1994).
23. Russell, S.M. et al. Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science* **266**, 1042-5 (1994).
24. Miyazaki, T. et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* **266**, 1045-7 (1994).
25. O'Shea, J.J. et al. Jak3 and the pathogenesis of severe combined immunodeficiency. *Mol Immunol* **41**, 727-37 (2004).
26. Darnell, J.E., Jr. STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-5 (1997).
27. Leonard, W.J. & O'Shea, J.J. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* **16**, 293-322 (1998).
28. Badovinac, V.P., Porter, B.B. & Harty, J.T. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* **3**, 619-26 (2002).
29. Kaech, S.M., Wherry, E.J. & Ahmed, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* **2**, 251-62 (2002).
30. Ahmed, R. & Gray, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* **272**, 54-60 (1996).
31. Janeway, C.A. Chap.7: The development and survival of lymphocytes. in *Immunobiology : the immune system in health and disease*, Vol. 5th edition (ed. Congress, L.o.) (Garland Publishing, New York, 2001).
32. Paul, W. Chapter 8: T-cell antigen receptors. in *Fundamental immunology* (ed. L.W., W.) (Philadelphia, 2003).
33. Arbones, M.L. et al. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* **1**, 247-60 (1994).
34. Forster, R. et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**, 23-33 (1999).
35. Salter, R.D. et al. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature* **345**, 41-6 (1990).
36. Doyle, C. & Strominger, J.L. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* **330**, 256-9 (1987).

37. Banchereau, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811 (2000).
38. Blattman, J.N. et al. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* **195**, 657-64 (2002).
39. Murali-Krishna, K. et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* **8**, 177-87 (1998).
40. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. & Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348-57 (1986).
41. Kagi, D. et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* **265**, 528-30 (1994).
42. Liu, Y., Wenger, R.H., Zhao, M. & Nielsen, P.J. Distinct costimulatory molecules are required for the induction of effector and memory cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **185**, 251-62 (1997).
43. Manjunath, N. et al. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* **108**, 871-8 (2001).
44. Hu, H. et al. CD4(+) T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division. *Nat Immunol* **2**, 705-10 (2001).
45. Kaech, S.M. & Ahmed, R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* **2**, 415-22 (2001).
46. Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E. & Ahmed, R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* **111**, 837-51 (2002).
47. Opferman, J.T., Ober, B.T. & Ashton-Rickardt, P.G. Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science* **283**, 1745-8 (1999).
48. Swain, S.L., Hu, H. & Huston, G. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* **286**, 1381-3 (1999).
49. van Stipdonk, M.J., Lemmens, E.E. & Schoenberger, S.P. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* **2**, 423-9 (2001).
50. Krammer, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-95 (2000).
51. Cho, B.K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H.N. & Chen, J. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2976-81 (1999).
52. Iezzi, G., Scheidegger, D. & Lanzavecchia, A. Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* **193**, 987-93 (2001).
53. Rogers, P.R., Dubey, C. & Swain, S.L. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* **164**, 2338-46 (2000).
54. Hou, S., Hyland, L., Ryan, K.W., Portner, A. & Doherty, P.C. Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature* **369**, 652-4 (1994).

55. Busch, D.H., Pilip, I.M., Vijh, S. & Pamer, E.G. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* **8**, 353-62 (1998).
56. Tough, D.F. & Sprent, J. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med* **179**, 1127-35 (1994).
57. Bruno, L., von Boehmer, H. & Kirberg, J. Cell division in the compartment of naive and memory T lymphocytes. *Eur J Immunol* **26**, 3179-84 (1996).
58. Zimmerman, C., Brduscha-Riem, K., Blaser, C., Zinkernagel, R.M. & Pircher, H. Visualization, characterization, and turnover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts. *J Exp Med* **183**, 1367-75 (1996).
59. Thomas, M.L. The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol* **7**, 339-69 (1989).
60. Beverley, P.C., Merckenschlager, M. & Terry, L. Phenotypic diversity of the CD45 antigen and its relationship to function. *Immunol Suppl* **1**, 3-5 (1988).
61. Boursalian, T.E. & Bottomly, K. Stability of naive and memory phenotypes on resting CD4 T cells in vivo. *J Immunol* **162**, 9-16 (1999).
62. Johnson, R., Lancki, D.W. & Fitch, F.W. Accessory molecules involved in antigen-mediated cytotoxicity and lymphokine production by cytotoxic T lymphocyte subsets. I. Identification of functions for the T cell surface molecules Ly-6C and Thy-1. *J Immunol* **151**, 2986-99 (1993).
63. Walunas, T.L., Bruce, D.S., Dustin, L., Loh, D.Y. & Bluestone, J.A. Ly-6C is a marker of memory CD8+ T cells. *J Immunol* **155**, 1873-83 (1995).
64. Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D.F. & Sprent, J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* **8**, 591-9 (1998).
65. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-12 (1999).
66. Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L. & Lefrancois, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* **291**, 2413-7 (2001).
67. Reinhardt, R.L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T. & Jenkins, M.K. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* **410**, 101-5 (2001).
68. Stockinger, B., Barthlott, T. & Kassiotis, G. The concept of space and competition in immune regulation. *Immunology* **111**, 241-7 (2004).
69. Tanchot, C. & Rocha, B. The organization of mature T-cell pools. *Immunol Today* **19**, 575-9 (1998).
70. Marrack, P. et al. Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells. *Nat Immunol* **1**, 107-11 (2000).
71. Viret, C., Wong, F.S. & Janeway, C.A., Jr. Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity* **10**, 559-68 (1999).
72. Ernst, B., Lee, D.S., Chang, J.M., Sprent, J. & Surh, C.D. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* **11**, 173-81 (1999).

73. Ku, C.C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J. & Marrack, P. Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines. *Science* **288**, 675-8 (2000).
74. Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C. & Lefrancois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* **1**, 426-32 (2000).
75. Tan, J.T. et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8732-7 (2001).
76. Fry, T.J. & Mackall, C.L. Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol* **22**, 564-71 (2001).
77. Dai, Z. & Lakkis, F.G. Cutting edge: Secondary lymphoid organs are essential for maintaining the CD4, but not CD8, naive T cell pool. *J Immunol* **167**, 6711-5 (2001).
78. Bender, J., Mitchell, T., Kappler, J. & Marrack, P. CD4⁺ T cell division in irradiated mice requires peptides distinct from those responsible for thymic selection. *J Exp Med* **190**, 367-74 (1999).
79. Jameson, S.C. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* **2**, 547-56 (2002).
80. Oehen, S. & Brduscha-Riem, K. Naive cytotoxic T lymphocytes spontaneously acquire effector function in lymphocytopenic recipients: A pitfall for T cell memory studies? *Eur J Immunol* **29**, 608-14 (1999).
81. Goldrath, A.W. & Bevan, M.J. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8⁺ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity* **11**, 183-90 (1999).
82. Kieper, W.C. & Jameson, S.C. Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13306-11 (1999).
83. Murali-Krishna, K. & Ahmed, R. Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *J Immunol* **165**, 1733-7 (2000).
84. Cho, B.K., Rao, V.P., Ge, Q., Eisen, H.N. & Chen, J. Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *J Exp Med* **192**, 549-56 (2000).
85. Goldrath, A.W., Bogatzki, L.Y. & Bevan, M.J. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med* **192**, 557-64 (2000).
86. Scollay, R.G., Butcher, E.C. & Weissman, I.L. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur J Immunol* **10**, 210-8 (1980).
87. Tanchot, C., Rosado, M.M., Agenes, F., Freitas, A.A. & Rocha, B. Lymphocyte homeostasis. *Semin Immunol* **9**, 331-7 (1997).
88. Sprent, J. & Tough, D.F. Lymphocyte life-span and memory. *Science* **265**, 1395-400 (1994).
89. McCune, J.M. et al. Factors influencing T-cell turnover in HIV-1-seropositive patients. *J Clin Invest* **105**, R1-8 (2000).
90. Takeda, S., Rodewald, H.R., Arakawa, H., Bluethmann, H. & Shimizu, T. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4⁺ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* **5**, 217-28 (1996).

91. Rooke, R., Waltzinger, C., Benoist, C. & Mathis, D. Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity* **7**, 123-34 (1997).
92. Tanchot, C., Lemonnier, F.A., Perarnau, B., Freitas, A.A. & Rocha, B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* **276**, 2057-62 (1997).
93. Kirberg, J., Berns, A. & von Boehmer, H. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med* **186**, 1269-75 (1997).
94. Labrecque, N. et al. How much TCR does a T cell need? *Immunity* **15**, 71-82 (2001).
95. Boursalian, T.E. & Bottomly, K. Survival of naive CD4 T cells: roles of restricting versus selecting MHC class II and cytokine milieu. *J Immunol* **162**, 3795-801 (1999).
96. Clarke, S.R. & Rudensky, A.Y. Survival and homeostatic proliferation of naive peripheral CD4+ T cells in the absence of self peptide:MHC complexes. *J Immunol* **165**, 2458-64 (2000).
97. Witherden, D. et al. Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med* **191**, 355-64 (2000).
98. Seddon, B. & Zamoyska, R. TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells. *J Immunol* **169**, 2997-3005 (2002).
99. Rathmell, J.C., Farkash, E.A., Gao, W. & Thompson, C.B. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol* **167**, 6869-76 (2001).
100. Vivien, L., Benoist, C. & Mathis, D. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int Immunol* **13**, 763-8 (2001).
101. Berard, M., Brandt, K., Bulfone-Paus, S. & Tough, D.F. IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *J Immunol* **170**, 5018-26 (2003).
102. Khaled, A.R., Kim, K., Hofmeister, R., Muegge, K. & Durum, S.K. Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14476-81 (1999).
103. von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M. & Murray, R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* **7**, 147-54 (1997).
104. Vella, A., Teague, T.K., Ihle, J., Kappler, J. & Murrack, P. Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med* **186**, 325-30 (1997).
105. Teague, T.K., Murrack, P., Kappler, J.W. & Vella, A.T. IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J Immunol* **158**, 5791-6 (1997).
106. Zeng, R. et al. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med* **201**, 139-48 (2005).
107. Ostiguy, V., Allard, E-L, Labrecque, N. IL-21 promotes T lymphocyte survival. *Journal of Leukocyte Biology* **En préparation**.

108. Kasaian, M.T. et al. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* **16**, 559-69 (2002).
109. Butz, E.A. & Bevan, M.J. Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* **8**, 167-75 (1998).
110. Lodolce, J.P. et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* **9**, 669-76 (1998).
111. Fehniger, T.A. & Caligiuri, M.A. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* **97**, 14-32 (2001).
112. Schorle, H., Holtschke, T., Hunig, T., Schimpl, A. & Horak, I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* **352**, 621-4 (1991).
113. Blattman, J.N. et al. Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nat Med* **9**, 540-7 (2003).
114. Kundig, T.M. et al. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science* **262**, 1059-61 (1993).
115. Becker, T.C. et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* **195**, 1541-8 (2002).
116. Teague, R.M., Tempero, R.M., Thomas, S., Murali-Krishna, K. & Nelson, B.H. Proliferation and differentiation of CD8+ T cells in the absence of IL-2/15 receptor beta-chain expression or STAT5 activation. *J Immunol* **173**, 3131-9 (2004).
117. Carson, W.E. et al. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *J Clin Invest* **96**, 2578-82 (1995).
118. Jonuleit, H. et al. Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells. *J Immunol* **158**, 2610-5 (1997).
119. Blauvelt, A. et al. Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes Langerhans cells, and blood-derived dendritic cells and is downregulated by ultraviolet B radiation. *J Invest Dermatol* **106**, 1047-52 (1996).
120. Weiler, M. et al. Interleukin-15, a leukocyte activator and growth factor, is produced by cortical tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* **9**, 1194-201 (1998).
121. Sadlack, B. et al. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* **75**, 253-61 (1993).
122. Lenardo, M.J. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* **353**, 858-61 (1991).
123. Van Parijs, L. et al. Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* **11**, 281-8 (1999).
124. Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C.A., Tschopp, J. & Abbas, A.K. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* **8**, 615-23 (1998).
125. Li, X.C. et al. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med* **7**, 114-8 (2001).

126. Kedl, R.M., Kappler, J.W. & Marrack, P. Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation. *Curr Opin Immunol* **15**, 120-7 (2003).
127. Letterio, J.J. & Roberts, A.B. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* **16**, 137-61 (1998).
128. Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765 (2001).
129. Moreno, M.B., Memon, S.A. & Zacharchuk, C.M. Apoptosis signaling pathways in normal T cells: differential activity of Bcl-2 and IL-1beta-converting enzyme family protease inhibitors on glucocorticoid- and Fas-mediated cytotoxicity. *J Immunol* **157**, 3845-9 (1996).
130. Sprent, J. & Surh, C.D. Generation and maintenance of memory T cells. *Curr Opin Immunol* **13**, 248-54 (2001).
131. Vella, A.T., Dow, S., Potter, T.A., Kappler, J. & Marrack, P. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3810-5 (1998).
132. Yajima, T. et al. Overexpression of IL-15 in vivo increases antigen-driven memory CD8+ T cells following a microbe exposure. *J Immunol* **168**, 1198-203 (2002).
133. Khan, I.A. & Casciotti, L. IL-15 prolongs the duration of CD8+ T cell-mediated immunity in mice infected with a vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **163**, 4503-9 (1999).
134. Prlic, M., Lefrancois, L. & Jameson, S.C. Multiple choices: regulation of memory CD8 T cell generation and homeostasis by interleukin (IL)-7 and IL-15. *J Exp Med* **195**, F49-52 (2002).
135. Kondrack, R.M. et al. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med* **198**, 1797-806 (2003).
136. Li, J., Huston, G. & Swain, S.L. IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J Exp Med* **198**, 1807-15 (2003).
137. Murali-Krishna, K. et al. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* **286**, 1377-81 (1999).
138. Selin, L.K., Vergilis, K., Welsh, R.M. & Nahill, S.R. Reduction of otherwise remarkably stable virus-specific cytotoxic T lymphocyte memory by heterologous viral infections. *J Exp Med* **183**, 2489-99 (1996).
139. Schluns, K.S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X.X. & Lefrancois, L. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* **168**, 4827-31 (2002).
140. Goldrath, A.W. et al. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med* **195**, 1515-22 (2002).
141. Tan, J.T. et al. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J Exp Med* **195**, 1523-32 (2002).
142. Kennedy, M.K. et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* **191**, 771-80 (2000).
143. Kieper, W.C. et al. Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med* **195**, 1533-9 (2002).

144. Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T.A. & Tagaya, Y. IL-15R α recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity* **17**, 537-47 (2002).
145. Burkett, P.R. et al. IL-15R α expression on CD8+ T cells is dispensable for T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4724-9 (2003).
146. Schluns, K.S., Klonowski, K.D. & Lefrancois, L. Transregulation of memory CD8 T-cell proliferation by IL-15R α + bone marrow-derived cells. *Blood* **103**, 988-94 (2004).
147. Seddon, B., Tomlinson, P. & Zamoyska, R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* **4**, 680-6 (2003).
148. Evans, T. Developmental biology of hematopoiesis. *Hematol Oncol Clin North Am* **11**, 1115-47 (1997).
149. Metcalf, D. *The Molecular Control of Blood Cells*, (Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, 1988).
150. Zhu, J. & Emerson, S.G. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* **21**, 3295-313 (2002).
151. Till, J.E. & Mc, C.E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**, 213-22 (1961).
152. Spangrude, G.J., Heimfeld, S. & Weissman, I.L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**, 58-62 (1988).
153. Orkin, S.H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* **1**, 57-64 (2000).
154. Cheshier, S.H., Morrison, S.J., Liao, X. & Weissman, I.L. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3120-5 (1999).
155. Morrison, S.J. & Weissman, I.L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* **1**, 661-73 (1994).
156. Morrison, S.J., Wandycz, A.M., Hemmati, H.D., Wright, D.E. & Weissman, I.L. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* **124**, 1929-39 (1997).
157. Kondo, M., Weissman, I.L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-72 (1997).
158. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I.L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-7 (2000).
159. Rosmarin, A.G., Yang, Z. & Resendes, K.K. Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol* **33**, 131-43 (2005).
160. Baum, C.M., Weissman, I.L., Tsukamoto, A.S., Buckle, A.M. & Peault, B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2804-8 (1992).
161. Hunte, B.E., Hudak, S., Campbell, D., Xu, Y. & Rennick, D. flk2/flt3 ligand is a potent cofactor for the growth of primitive B cell progenitors. *J Immunol* **156**, 489-96 (1996).

162. Peschon, J.J. et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* **180**, 1955-60 (1994).
163. von Freeden-Jeffry, U. et al. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* **181**, 1519-26 (1995).
164. Galy, A., Travis, M., Cen, D. & Chen, B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* **3**, 459-73 (1995).
165. Kondo, M. et al. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* **407**, 383-6 (2000).
166. Traver, D. et al. Fetal liver myelopoiesis occurs through distinct, prospectively isolatable progenitor subsets. *Blood* **98**, 627-35 (2001).
167. Manz, M.G., Miyamoto, T., Akashi, K. & Weissman, I.L. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11872-7 (2002).
168. Lacaud, G., Carlsson, L. & Keller, G. Identification of a fetal hematopoietic precursor with B cell, T cell, and macrophage potential. *Immunity* **9**, 827-38 (1998).
169. Wu, L., Antica, M., Johnson, G.R., Scollay, R. & Shortman, K. Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J Exp Med* **174**, 1617-27 (1991).
170. Ardavin, C., Wu, L., Li, C.L. & Shortman, K. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* **362**, 761-3 (1993).
171. Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T. & Zlotnik, A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* **150**, 4244-52 (1993).
172. Lesley, J., Schulte, R., Trotter, J. & Hyman, R. Qualitative and quantitative heterogeneity in Pgp-1 expression among murine thymocytes. *Cell Immunol* **112**, 40-54 (1988).
173. Pearse, M. et al. A murine early thymocyte developmental sequence is marked by transient expression of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1614-8 (1989).
174. Petrie, H.T., Hugo, P., Scollay, R. & Shortman, K. Lineage relationships and developmental kinetics of immature thymocytes: CD3, CD4, and CD8 acquisition in vivo and in vitro. *J Exp Med* **172**, 1583-8 (1990).
175. Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D. & Hayakawa, K. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* **173**, 1213-25 (1991).
176. Li, Y.S., Wasserman, R., Hayakawa, K. & Hardy, R.R. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* **5**, 527-35 (1996).
177. Ogawa, M., ten Boekel, E. & Melchers, F. Identification of CD19(-)B220(+)-c-Kit(+)-Flt3/Flk-2(+)-cells as early B lymphoid precursors before pre-B-I cells in juvenile mouse bone marrow. *Int Immunol* **12**, 313-24 (2000).

178. Tudor, K.S., Payne, K.J., Yamashita, Y. & Kincade, P.W. Functional assessment of precursors from murine bone marrow suggests a sequence of early B lineage differentiation events. *Immunity* **12**, 335-45 (2000).
179. Li, Y.S., Hayakawa, K. & Hardy, R.R. The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J Exp Med* **178**, 951-60 (1993).
180. Meffre, E., Casellas, R. & Nussenzweig, M.C. Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol* **1**, 379-85 (2000).
181. Terstappen, L.W., Hollander, Z., Meiners, H. & Loken, M.R. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leukoc Biol* **48**, 138-48 (1990).
182. Terstappen, L.W., Safford, M. & Loken, M.R. Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia* **4**, 657-63 (1990).
183. Kansas, G.S., Muirhead, M.J. & Dailey, M.O. Expression of the CD11/CD18, leukocyte adhesion molecule 1, and CD44 adhesion molecules during normal myeloid and erythroid differentiation in humans. *Blood* **76**, 2483-92 (1990).
184. Arnaout, M.A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* **75**, 1037-50 (1990).
185. Hestdal, K. et al. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* **147**, 22-8 (1991).
186. Lesley, J., Hyman, R., Schulte, R. & Trotter, J. Expression of transferrin receptor on murine hematopoietic progenitors. *Cell Immunol* **83**, 14-25 (1984).
187. Ikuta, K. et al. A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell* **62**, 863-74 (1990).
188. Lok, C.N. & Ponka, P. Identification of an erythroid active element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* **275**, 24185-90 (2000).
189. Kina, T. et al. The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. *Br J Haematol* **109**, 280-7 (2000).
190. Berridge, M.V., Ralph, S.J. & Tan, A.S. Cell-lineage antigens of the stem cell-megakaryocyte-platelet lineage are associated with the platelet IIb-IIIa glycoprotein complex. *Blood* **66**, 76-85 (1985).
191. Prandini, M.H., Uzan, G., Martin, F., Thevenon, D. & Marguerie, G. Characterization of a specific erythromegakaryocytic enhancer within the glycoprotein IIb promoter. *J Biol Chem* **267**, 10370-4 (1992).
192. Clay, D. et al. CD9 and megakaryocyte differentiation. *Blood* **97**, 1982-9 (2001).
193. Metcalf, D. Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. *Blood* **92**, 345-7; discussion 352 (1998).
194. Enver, T., Heyworth, C.M. & Dexter, T.M. Do stem cells play dice? *Blood* **92**, 348-51; discussion 352 (1998).
195. Maguer-Satta, V., Oostendorp, R., Reid, D. & Eaves, C.J. Evidence that ceramide mediates the ability of tumor necrosis factor to modulate primitive human hematopoietic cell fates. *Blood* **96**, 4118-23 (2000).

196. Zandstra, P.W., Conneally, E., Petzer, A.L., Piret, J.M. & Eaves, C.J. Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4698-703 (1997).
197. Ramsfjell, V. et al. Distinct requirements for optimal growth and In vitro expansion of human CD34(+)CD38(-) bone marrow long-term culture-initiating cells (LTC-IC), extended LTC-IC, and murine in vivo long-term reconstituting stem cells. *Blood* **94**, 4093-102 (1999).
198. Hromas, R. et al. Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1. *Blood* **82**, 2998-3004 (1993).
199. Anderson, M.K., Hernandez-Hoyos, G., Diamond, R.A. & Rothenberg, E.V. Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage. *Development* **126**, 3131-48 (1999).
200. DeKoter, R.P. & Singh, H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* **288**, 1439-41 (2000).
201. Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J. & Singh, H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**, 1573-7 (1994).
202. McKercher, S.R. et al. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J* **15**, 5647-58 (1996).
203. Scott, E.W. et al. PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity* **6**, 437-47 (1997).
204. DeKoter, R.P., Walsh, J.C. & Singh, H. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *Embo J* **17**, 4456-68 (1998).
205. DeKoter, R.P., Lee, H.J. & Singh, H. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* **16**, 297-309 (2002).
206. Miller, J.P. et al. The earliest step in B lineage differentiation from common lymphoid progenitors is critically dependent upon interleukin 7. *J Exp Med* **196**, 705-11 (2002).
207. Kim, K., Lee, C.K., Sayers, T.J., Muegge, K. & Durum, S.K. The trophic action of IL-7 on pro-T cells: inhibition of apoptosis of pro-T1, -T2, and -T3 cells correlates with Bcl-2 and Bax levels and is independent of Fas and p53 pathways. *J Immunol* **160**, 5735-41 (1998).
208. He, Y.W. & Malek, T.R. Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J Exp Med* **184**, 289-93 (1996).
209. Levin, S.D. et al. Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism. *J Immunol* **162**, 677-83 (1999).
210. Grabstein, K.H. et al. Inhibition of murine B and T lymphopoiesis in vivo by an anti-interleukin 7 monoclonal antibody. *J Exp Med* **178**, 257-64 (1993).
211. Iwasaki-Arai, J., Iwasaki, H., Miyamoto, T., Watanabe, S. & Akashi, K. Enforced granulocyte/macrophage colony-stimulating factor signals do not support lymphopoiesis, but instruct lymphoid to myelomonocytic lineage conversion. *J Exp Med* **197**, 1311-22 (2003).

212. Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S.J. & MacDonald, H.R. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* **5**, 247-53 (2004).
213. Radtke, F. et al. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547-58 (1999).
214. Pui, J.C. et al. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* **11**, 299-308 (1999).
215. Carvalho, T.L., Mota-Santos, T., Cumano, A., Demengeot, J. & Vieira, P. Arrested B lymphopoiesis and persistence of activated B cells in adult interleukin 7(-/-) mice. *J Exp Med* **194**, 1141-50 (2001).
216. Corcoran, A.E. et al. The interleukin-7 receptor alpha chain transmits distinct signals for proliferation and differentiation during B lymphopoiesis. *Embo J* **15**, 1924-32 (1996).
217. Busslinger, M. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* **22**, 55-79 (2004).
218. Dias, S., Silva, H., Jr., Cumano, A. & Vieira, P. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J Exp Med* **201**, 971-9 (2005).
219. Kikuchi, K., Lai, A.Y., Hsu, C.L. & Kondo, M. IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *J Exp Med* **201**, 1197-203 (2005).
220. Kee, B.L. & Murre, C. Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J Exp Med* **188**, 699-713 (1998).
221. Metcalf, D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* **67**, 257-67 (1986).
222. Richards, M.K., Liu, F., Iwasaki, H., Akashi, K. & Link, D.C. Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. *Blood* **102**, 3562-8 (2003).
223. Socolovsky, M., Lodish, H.F. & Daley, G.Q. Control of hematopoietic differentiation: lack of specificity in signaling by cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6573-5 (1998).
224. Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T. & Skoultschi, A.I. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev* **13**, 1398-411 (1999).
225. Zhang, P. et al. PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood* **96**, 2641-8 (2000).
226. Zon, L.I., Youssoufian, H., Mather, C., Lodish, H.F. & Orkin, S.H. Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10638-41 (1991).
227. Matsumura, I. et al. Biologic significance of GATA-1 activities in Ras-mediated megakaryocytic differentiation of hematopoietic cell lines. *Blood* **96**, 2440-50 (2000).
228. Zhang, P. et al. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8705-10 (1999).
229. Lieschke, G.J. et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* **84**, 1737-46 (1994).

230. Liu, F., Wu, H.Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T. & Link, D.C. Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* **5**, 491-501 (1996).
231. Liu, F., Poursine-Laurent, J. & Link, D.C. The granulocyte colony-stimulating factor receptor is required for the mobilization of murine hematopoietic progenitors into peripheral blood by cyclophosphamide or interleukin-8 but not flt-3 ligand. *Blood* **90**, 2522-8 (1997).
232. Seymour, J.F. et al. Mice lacking both granulocyte colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF have impaired reproductive capacity, perturbed neonatal granulopoiesis, lung disease, amyloidosis, and reduced long-term survival. *Blood* **90**, 3037-49 (1997).
233. Ohara, A. et al. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hemopoietic cells in serum-free culture. *Exp Hematol* **15**, 695-9 (1987).
234. Dahl, R. et al. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol* **4**, 1029-36 (2003).
235. Stanley, E.R. The macrophage colony-stimulating factor, CSF-1. *Methods Enzymol* **116**, 564-87 (1985).
236. Zhang, D.E. et al. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 569-74 (1997).
237. Radomska, H.S. et al. CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* **18**, 4301-14 (1998).
238. Anderson, K.L., Smith, K.A., Pio, F., Torbett, B.E. & Maki, R.A. Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. *Blood* **92**, 1576-85 (1998).
239. Wang, X., Scott, E., Sawyers, C.L. & Friedman, A.D. C/EBPalpha bypasses granulocyte colony-stimulating factor signals to rapidly induce PU.1 gene expression, stimulate granulocytic differentiation, and limit proliferation in 32D cl3 myeloblasts. *Blood* **94**, 560-71 (1999).
240. Zhang, D.E., Hetherington, C.J., Chen, H.M. & Tenen, D.G. The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol Cell Biol* **14**, 373-81 (1994).
241. Tamura, T., Nagamura-Inoue, T., Shmeltzer, Z., Kuwata, T. & Ozato, K. ICSP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity* **13**, 155-65 (2000).
242. Jacobsen, F.W., Veiby, O.P., Skjonsberg, C. & Jacobsen, S.E. Novel role of interleukin 7 in myelopoiesis: stimulation of primitive murine hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* **178**, 1777-82 (1993).
243. Rennick, D. et al. Interleukin-6 interacts with interleukin-4 and other hematopoietic growth factors to selectively enhance the growth of megakaryocytic, erythroid, myeloid, and multipotential progenitor cells. *Blood* **73**, 1828-35 (1989).

244. Faltynek, C.R. et al. Administration of human recombinant IL-7 to normal and irradiated mice increases the numbers of lymphocytes and some immature cells of the myeloid lineage. *J Immunol* **149**, 1276-82 (1992).
245. Parrish-Novak, J. et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* **408**, 57-63 (2000).
246. Ozaki, K., Kikly, K., Michalovich, D., Young, P.R. & Leonard, W.J. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11439-44 (2000).
247. Cosman, D. The hematopoietin receptor superfamily. *Cytokine* **5**, 95-106 (1993).
248. Murakami, M. et al. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11349-53 (1991).
249. Asao, H. et al. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* **167**, 1-5 (2001).
250. Habib, T., Senadheera, S., Weinberg, K. & Kaushansky, K. The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3. *Biochemistry* **41**, 8725-31 (2002).
251. Parrish-Novak, J., Foster, D.C., Holly, R.D. & Clegg, C.H. Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J Leukoc Biol* **72**, 856-63 (2002).
252. Alves, N.L., Arosa, F.A. & van Lier, R.A. IL-21 Sustains CD28 Expression on IL-15-Activated Human Naive CD8+ T Cells. *J Immunol* **175**, 755-62 (2005).
253. Jin, H., Carrio, R., Yu, A. & Malek, T.R. Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. *J Immunol* **173**, 657-65 (2004).
254. Brandt, K., Bulfone-Paus, S., Foster, D.C. & Ruckert, R. Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* **102**, 4090-8 (2003).
255. Brandt, K. et al. Interleukin-21 inhibits dendritic cell-mediated T cell activation and induction of contact hypersensitivity in vivo. *J Invest Dermatol* **121**, 1379-82 (2003).
256. Collins, M., Whitters, M.J. & Young, D.A. IL-21 and IL-21 receptor: a new cytokine pathway modulates innate and adaptive immunity. *Immunol Res* **28**, 131-40 (2003).
257. Pelletier, M., Bouchard, A. & Girard, D. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol* **173**, 7521-30 (2004).
258. Chtanova, T. et al. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol* **173**, 68-78 (2004).
259. Wurster, A.L. et al. Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells. *J Exp Med* **196**, 969-77 (2002).
260. Mehta, D.S., Wurster, A.L., Weinmann, A.S. & Grusby, M.J. NFATc2 and T-bet contribute to T-helper-cell-subset-specific regulation of IL-21 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2016-21 (2005).

261. Mehta, D.S., Wurster, A.L. & Grusby, M.J. Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. *Immunol Rev* **202**, 84-95 (2004).
262. van Leeuwen, E.M. et al. Proliferation requirements of cytomegalovirus-specific, effector-type human CD8+ T cells. *J Immunol* **169**, 5838-43 (2002).
263. Khaled, A.R. & Durum, S.K. Lymphocyte: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nat Rev Immunol* **2**, 817-30 (2002).
264. Di Carlo, E. et al. IL-21 induces tumor rejection by specific CTL and IFN-gamma-dependent CXC chemokines in syngeneic mice. *J Immunol* **172**, 1540-7 (2004).
265. Ma, H.L. et al. IL-21 activates both innate and adaptive immunity to generate potent antitumor responses that require perforin but are independent of IFN-gamma. *J Immunol* **171**, 608-15 (2003).
266. Mehta, D.S. et al. IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells. *J Immunol* **170**, 4111-8 (2003).
267. Ozaki, K. et al. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* **298**, 1630-4 (2002).
268. Pene, J. et al. Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *J Immunol* **172**, 5154-7 (2004).
269. Suto, A. et al. Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C(epsilon) transcription of IL-4-stimulated B cells. *Blood* **100**, 4565-73 (2002).
270. Ozaki, K. et al. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol* **173**, 5361-71 (2004).
271. Strengell, M. et al. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells. *J Immunol* **170**, 5464-9 (2003).
272. Carson, W.E. et al. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest* **99**, 937-43 (1997).
273. Brady, J., Hayakawa, Y., Smyth, M.J. & Nutt, S.L. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol* **172**, 2048-58 (2004).
274. Bennett, F. et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol* **170**, 711-8 (2003).
275. Ugai, S. et al. Expression of the interleukin-21 gene in murine colon carcinoma cells generates systemic immunity in the inoculated hosts. *Cancer Gene Ther* **10**, 187-92 (2003).
276. Kishida, T. et al. Interleukin (IL)-21 and IL-15 genetic transfer synergistically augments therapeutic antitumor immunity and promotes regression of metastatic lymphoma. *Mol Ther* **8**, 552-8 (2003).
277. Moroz, A. et al. IL-21 enhances and sustains CD8+ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21. *J Immunol* **173**, 900-9 (2004).
278. King, C., Ilic, A., Koelsch, K. & Sarvetnick, N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* **117**, 265-77 (2004).

279. Vollmer, T.L. et al. Differential effects of IL-21 during initiation and progression of autoimmunity against neuroantigen. *J Immunol* **174**, 2696-701 (2005).
280. Pircher, H. et al. T cell tolerance to Mlsa encoded antigens in T cell receptor V beta 8.1 chain transgenic mice. *Embo J* **8**, 719-27 (1989).
281. Nishimura, H. et al. Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo. *J Exp Med* **191**, 157-70 (2000).
282. Marks-Konczalik, J. et al. IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11445-50 (2000).
283. Umemura, M., Nishimura, H., Hirose, K., Matsuguchi, T. & Yoshikai, Y. Overexpression of IL-15 in vivo enhances protection against Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection via augmentation of NK and T cytotoxic 1 responses. *J Immunol* **167**, 946-56 (2001).
284. Ichii, H. et al. Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* **3**, 558-63 (2002).
285. Ichii, H., Sakamoto, A., Kuroda, Y. & Tokuhisa, T. Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8+ T cells. *J Immunol* **173**, 883-91 (2004).
286. Allman, D. et al. BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood* **87**, 5257-68 (1996).
287. Fukuda, T. et al. The murine BCL6 gene is induced in activated lymphocytes as an immediate early gene. *Oncogene* **11**, 1657-63 (1995).
288. Cattoretti, G. et al. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* **86**, 45-53 (1995).
289. Chaffin, K.E. et al. Dissection of thymocyte signaling pathways by in vivo expression of pertussis toxin ADP-ribosyltransferase. *Embo J* **9**, 3821-9 (1990).
290. Scheeren, F.A. et al. STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nat Immunol* **6**, 303-13 (2005).
291. Tanchot, C. et al. Conversion of naive T cells to a memory-like phenotype in lymphopenic hosts is not related to a homeostatic mechanism that fills the peripheral naive T cell pool. *J Immunol* **168**, 5042-6 (2002).
292. Mackall, C.L., Granger, L., Sheard, M.A., Cepeda, R. & Gress, R.E. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* **82**, 2585-94 (1993).
293. Tanchot, C. & Rocha, B. The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8+ T cell pools. *Eur J Immunol* **25**, 2127-36 (1995).
294. Mackall, C.L., Hakim, F.T. & Gress, R.E. Restoration of T-cell homeostasis after T-cell depletion. *Semin Immunol* **9**, 339-46 (1997).
295. Seddon, B. & Zamoyska, R. TCR and IL-7 receptor signals can operate independently or synergize to promote lymphopenia-induced expansion of naive T cells. *J Immunol* **169**, 3752-9 (2002).

296. Park, J.H. et al. Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* **21**, 289-302 (2004).
297. Judge, A.D., Zhang, X., Fujii, H., Surh, C.D. & Sprent, J. Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J Exp Med* **196**, 935-46 (2002).
298. Kamimura, D. et al. Evidence of a novel IL-2/15R beta-targeted cytokine involved in homeostatic proliferation of memory CD8+ T cells. *J Immunol* **173**, 6041-9 (2004).
299. Mertsching, E., Grawunder, U., Meyer, V., Rolink, T. & Ceredig, R. Phenotypic and functional analysis of B lymphopoiesis in interleukin-7-transgenic mice: expansion of pro/pre-B cell number and persistence of B lymphocyte development in lymph nodes and spleen. *Eur J Immunol* **26**, 28-33 (1996).
300. Valenzona, H.O., Pointer, R., Ceredig, R. & Osmond, D.G. Prelymphomatous B cell hyperplasia in the bone marrow of interleukin-7 transgenic mice: precursor B cell dynamics, microenvironmental organization and osteolysis. *Exp Hematol* **24**, 1521-9 (1996).
301. Hara, H. & Ogawa, M. Erythropoietic precursors in mice with phenylhydrazine-induced anemia. *Am J Hematol* **1**, 453-8 (1976).
302. Broudy, V.C., Lin, N.L., Priestley, G.V., Nocka, K. & Wolf, N.S. Interaction of stem cell factor and its receptor c-kit mediates lodgment and acute expansion of hematopoietic cells in the murine spleen. *Blood* **88**, 75-81 (1996).
303. Obinata, M. & Yanai, N. Cellular and molecular regulation of an erythropoietic inductive microenvironment (EIM). *Cell Struct Funct* **24**, 171-9 (1999).
304. Akashi, K., Kondo, M., von Freeden-Jeffry, U., Murray, R. & Weissman, I.L. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* **89**, 1033-41 (1997).
305. van Dijk, T.B. et al. Cloning and characterization of the human interleukin-3 (IL-3)/IL-5/ granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor betac gene: regulation by Ets family members. *Blood* **92**, 3636-46 (1998).
306. Akagawa, E., Muto, A., Arai, K. & Watanabe, S. Analysis of the 5' promoters for human IL-3 and GM-CSF receptor alpha genes. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 600-8 (2003).
307. O'Riordan, M. & Grosschedl, R. Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* **11**, 21-31 (1999).
308. Maitra, S. & Atchison, M. BSAP can repress enhancer activity by targeting PU.1 function. *Mol Cell Biol* **20**, 1911-22 (2000).
309. Chen, H. et al. PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene* **11**, 1549-60 (1995).
310. Reddy, V.A. et al. Granulocyte inducer C/EBPalpha inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood* **100**, 483-90 (2002).

