

Université de Montréal

***L'IL-7 et les cellules dendritiques dans le développement  
et l'homéostasie des lymphocytes T***

*Par*

Moutuaata Mohamed Moutuou

Département de Microbiologie, infectiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D  
en Microbiologie et immunologie

Aout 2020

© Moutuaata Mohamed Moutuou, 2020

Université de Montréal

Département de Microbiologie, infectiologie et immunologie Faculté de médecine

*Thèse intitulée*

***L'IL7 et les cellules dendritiques dans le développement et  
l'homéostasie des lymphocytes T***

*Présenté par*

**Moutuaata Mohamed Moutuou**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Dr Jacques Thibodeau**

Président-rapporteur

**Dr Martin Guimond**

Directeur de recherche

**Dr Ali Ahmad**

Membre du jury

**Dr Ilangumaran Subburaj**

Examineur externe

**Dr Hugo Wurtele**

Représentant de la doyenne

## Résumé

Les cellules dendritiques (CD) et l'interleukine-7 (IL-7) sont deux facteurs essentiels au développement et à l'homéostasie des lymphocytes T. Une anomalie de la production ou de la signalisation de l'IL-7 est associée à un défaut de la thymopoïèse en plus d'une profonde lymphopénie. Parallèlement, la déficience des CD, entraîne une rupture de la tolérance au soi menant au développement de maladies auto-immunes et une altération de l'homéostasie des Lymphocyte T. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés globalement à la contribution de l'IL-7 et des CD dans la reconstitution et l'homéostasie des lymphocytes dans deux contextes thérapeutiques différents.

Premièrement, il a été démontré que le traitement avec l'imatinib (médicament utilisé pour traiter la leucémie myéloïde chronique (LMC)) induisait une diminution du nombre de lymphocytes T chez les patients atteints de LMC. À partir de notre étude *in vitro* sur des cellules mononuclées du sang périphérique (peripheral blood mononuclear cells) (PBMC) humaines cultivées en présence d'imatinib avant d'être stimulées par l'IL-7 à différentes concentrations, nous avons mis en évidence une perturbation de la signalisation de l'IL-7 dans les lymphocytes T suite à une interférence avec l'imatinib. À l'aide de notre modèle murin traité à l'imatinib, nous avons également montré *in vivo*, une altération de l'homéostasie des lymphocyte T. La modulation négative de l'homéostasie des LT par l'imatinib est également accompagnée d'une diminution dramatique de la proportion des CD, ce qui pourrait également faire décliner le pool des lymphocyte T.

Deuxièmement, dans un contexte de greffe de moelle osseuse (MO) syngénique, nous avons analysé la contribution de l'IL-7 produite par les CD, dans la thymopoïèse et l'homéostasie des lymphocyte T. Pour évaluer la contribution de l'IL-7 produite par les cellules hématopoïétiques dans la reconstitution et l'homéostasie lymphocytaire T, nous avons généré des chimères de MO avec une production d'IL-7 exclusivement limitée aux cellules stromales, par greffe de MO IL-7<sup>-/-</sup> dans des souris Rag<sup>-/-</sup>. Les souris Rag<sup>-/-</sup> transplantées avec des cellules de MO IL-7<sup>-/-</sup> développent une maladie auto-immune systémique létale à 4-5 semaines post greffe. Nos résultats suggèrent fortement une contribution cruciale de l'IL-7 produite par les CSH (Cellules Souches Hématopoïétiques) dans la reconstitution immunitaire après greffe de MO.

L'ensemble de nos travaux contribue à élargir la compréhension de la biologie de l'axe IL-7/ IL-7R $\alpha$  et des CD dans le développement et l'homéostasie des lymphocytes T.

**Mots-clés :** IL-7, Lymphopénie, LMC, reconstitution immunitaire, Auto-immunité, Cellules dendritiques, Thymus, Lymphocytes T, Rag<sup>-/-</sup>, IL-7<sup>-/-</sup>.

## Abstract

Dendritic cells (DCs) and interleukin-7 (IL-7) are two factors essential for the development and homeostasis of T lymphocytes. An abnormality in the production or signaling of IL-7 is associated with a defective thymopoiesis and severe lymphopenia. DCs deficiency leads to a breakdown in self-tolerance leading to the development of autoimmune diseases and impaired T cells homeostasis. In this thesis, we have focused on the contribution of IL-7 and DCs in the reconstitution and homeostasis of lymphocytes in two different therapeutic contexts.

Firstly, imatinib (drug used to treat chronic myeloid leukemia (CML)) has been shown to induce a decrease of T lymphocytes number in patients with CML. From our *in vitro* study on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cultured in the presence of imatinib before stimulation by IL-7 at different concentrations, we demonstrated a disruption of IL-7 signaling in T cells following interference with imatinib. Using our imatinib-treated mouse model, we also showed *in vivo* impaired T cells homeostasis. The negative modulation of T lymphocytes homeostasis by imatinib is also accompanied by a dramatic decrease in the proportion of DCs, which could also decline T cells pool.

Secondly, we used murine syngeneic bone marrow transplantation (BMT) models to study the contribution of IL-7 produced by DCs in thymopoiesis and T cells homeostasis. To assess the role of IL-7 produced by DCs in T cell reconstitution and homeostasis, we generated BM chimeras with IL-7 production exclusively limited to stromal cells, by BMT of IL-7<sup>-/-</sup> into Rag<sup>-/-</sup> mice. Rag<sup>-/-</sup> mice transplanted with IL-7<sup>-/-</sup> BM cells develop a lethal systemic autoimmune disease post-transplant at 4-5 weeks post-BMT. Our results strongly suggest a major contribution of Hematopoietic stem cells (HSC)-produced IL-7 in immune reconstitution after BM transplantation.

Our work contributes to expanding our understanding of the biology of the IL-7 / IL-7R $\alpha$  axis and DCs in T cell development and homeostasis.

**Keywords** : IL-7, Lymphopenia, CML, immune reconstitution, Autoimmunity, Dendritic cells, Thymus, T lymphocytes, Rag<sup>-/-</sup>, IL7<sup>-/-</sup>



# Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>i</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>5</b>
<b>Liste des sigles et abréviations .....</b>	<b>6</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>21</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction .....</b>	<b>21</b>
<b>Section 1 : Leucémie myéloïde Chronique .....</b>	<b>22</b>
<b>1. Description générale .....</b>	<b>22</b>
1.1. Définition .....	22
1.2. Caractéristiques cliniques .....	22
1.3. BCR-ABL : rôle central dans la pathogenèse de la LMC .....	23
<b>2. Voies de signalisation activées par BCR/ABL dans la leucémogénèse .....</b>	<b>25</b>
2.1. Voies de transduction PI3K / AKT .....	27
2.2. Voie JAK / STAT .....	27
2.3. Voies de transduction Ras / MEK / ERK .....	28
<b>3. Thérapies pour la LMC.....</b>	<b>29</b>
3.1. Traitements non spécifiques .....	29
3.2. Traitements ciblés : Inhibiteurs pharmacologiques de BCR-ABL Kinase : ITK (Inhibiteur de tyrosine kinase) .....	30
3.2.1. imatinib.....	31
3.2.2. Autres inhibiteurs de tyrosine kinase.....	33
3.3. La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) .....	34
<b>Section 2 : Reconstitution et homéostasie lymphocytaire T.....</b>	<b>36</b>
<b>1. Différenciation thymique.....</b>	<b>37</b>
1.1. Thymus : organisation anatomique et composition.....	37
1.1.1. Cortex.....	40
1.1.2. Médulla.....	41
1.2. Différents stades de maturation des lymphocytes T .....	42
1.2.1. De la moelle osseuse au thymus.....	42
1.2.2. DN1–DN2.....	45
1.2.3. DN2–DN3.....	45
1.2.4. DN3–DP .....	47
1.2.5. DP–SP .....	48
<b>2. La mise en place de la tolérance centrale dans le thymus.....</b>	<b>49</b>

2.1. Sélection positive.....	51
2.2. Sélection négative .....	52
2.2.1. Rôle des mTEC dans la sélection négative .....	54
2.2.2. Les peptides du soi impliqués dans la sélection négative des lymphocytes T .....	56
2.2.3 Rôle des CD dans la sélection négative.....	57
2.2.4. Les mTEC et les CD dans la présentation autonome versus présentation indirecte pour la sélection négative .....	61
2.2.5. Rôle de la costimulation dans la sélection négative .....	62
2.2.6. La signalisation du TCR dans la sélection négative.....	63
2.3. Tolérance centrale : délétion versus différenciation en Treg.....	65
2.3.1. À la découverte des Treg .....	65
2.3.2. La différenciation des nTreg.....	67
<b>3. L'IL-7 : Cytokine indispensable pour la thymopoïèse et l'homéostasie des lymphocytes T en périphérie .....</b>	<b>70</b>
3.1. Généralités.....	70
3.2. Signalisation de l'IL-7 .....	72
3.3. Rôle de l'IL-7 dans le thymus .....	74
<b>4. Homéostasie des lymphocytes T .....</b>	<b>74</b>
4.1. Les lymphocytes T naïfs .....	76
4.2. Les lymphocytes T mémoires.....	77
4.3 Lymphopénie et PH : un terrain fertile pour l'auto-immunité .....	78
<b>5. Les Treg dans la tolérance périphérique.....</b>	<b>79</b>
5.1. Les nTreg versus les iTreg.....	79
5.2. Mécanismes suppressifs des Treg.....	81
<b>6. Auto-immunité : rupture des mécanismes de la tolérance du système immunitaire et perturbation de l'homéostasie des lymphocytes T .....</b>	<b>84</b>
6.1. Généralités.....	84
6.2. Les lymphocytes T dans l'auto-immunité.....	85
6.2.1. Les lymphocytes T CD8 + dans l'auto-immunité.....	86
6.2.2. Les lymphocytes T CD4+ dans l'auto-immunité.....	87
<b>Hypothèses et objectifs.....</b>	<b>92</b>
<b>CHAPITRE 2 : Article 1 .....</b>	<b>94</b>
<b>Imatinib mesylate inhibits STAT5 phosphorylation in response to IL-7 and promotes T cell lymphopenia in chronic myelogenous leukemia patients.....</b>	<b>94</b>
RESUME.....	97
ABSTRACT.....	98
INTRODUCTION .....	99
MATERIALS AND METHODS.....	100
RESULTS AND DISCUSSION.....	102
ACKNOWLEDGMENTS .....	105
REFERENCES .....	106
FIGURES LEGENDS.....	110
<b>CHAPITRE 3: Article 2 .....</b>	<b>113</b>

<b>Fatal autoimmunity develops in RAG-knockout mice transplanted with IL-7<sup>-/-</sup> hematopoietic stem cell</b> .....	<b>113</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>115</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>117</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>118</b>
<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>120</b>
<b>RESULTS</b> .....	<b>124</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>129</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	<b>133</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>134</b>
<b>FIGURES LEGENDS</b> .....	<b>147</b>
<b>CHAPITRE 4 : Discussion et Perspectives</b> .....	<b>161</b>
<b>4. L'axe IL7/IL7R<math>\alpha</math> et les CD dans la reconstitution et l'homéostasie des lymphocytes T.</b> <b>161</b>	
4.1. Effet de l'imatinib sur l'homéostasie des lymphocytes T.....	162
4.1.1. L'axe IL7/IL7R $\alpha$ dans l'altération de l'homéostasie des lymphocytes T chez les patients atteints de LMC traités avec de l'imatinib .....	162
4.1.2. L'imatinib induit une altération de la signalisation de l'IL-7 au niveau des lymphocytes T .....	162
4.1.3. L'imatinib affecte la survie et non la capacité proliférative des lymphocytes T .....	164
4.2. Les CD : une cible et une source pour l'IL-7 .....	165
4.2.1. Altération des cellules dendritiques en présence d'imatinib .....	166
4.3. Les CD et l'IL-7 dans la reconstitution des lymphocytes T.....	167
4.3.1. Les CD : une source d'IL-7, quel rôle dans le développement des lymphocytes T ? .....	167
4.3.2. La greffe de MO IL-7 <sup>-/-</sup> dans les souris Rag <sup>-/-</sup> conduit à une maladie auto-immune systémique létale lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> dépendante.....	168
4.3.3. L'interleukine-7 dans la lymphopénie: un médiateur clé dans l'auto-immunité induite par les lymphocytes T .....	170
4.3.4. La production de l'IL-7 par les CD : un possible rôle compensatoire face à l'altération quantitative des TEC ? .....	171
4.3.5. Les CD : une source de cytokine essentielle pour la sélection thymique .....	174
4.3.6. L-IL-7 produite par les CD : fonction de costimulation dans la signalisation du TCR ? ....	175
4.3.7. Comment s'opèrerait la signalisation de l'IL-7 produite par les CD sur le thymocyte dans une médulla altérée ? .....	176
4.3.8. Un potentiel rôle du microbiote intestinal dans la pathogenèse MO IL-7 <sup>-/-</sup> → Rag <sup>-/-</sup> ?...180	
<b>CHAPITRE 5 : Conclusion</b> .....	<b>183</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>184</b>
<b>Publications annexes</b> .....	<b>227</b>
<b>Restoring T Cell Homeostasis After Allogeneic Stem Cell Transplantation; Principal Limitations and Future Challenges</b> <i>Frontiers in Immunology 2018</i> .....	<b>228</b>
<b>Studying Peripheral T Cell Homeostasis in Mice: A Concise Technical Review.</b> <i>Methods in Molecular Biology 2020</i> .....	<b>237</b>

## Liste des figures

Figure 1.1 : Formation du chromosome Philadelphie. ....	24
Figure 1.2 : Schéma des principales voies de signalisation activées par BCR-ABL. ....	26
Figure 1.3 : Effet compétitif de l'imatinib sur le site catalytique de l'ATP situé sur ABL. ....	32
Figure 1.4 : Interactions des cellules stromales au cours du développement des lymphocytes T. ....	39
Figure 1.5 : Étapes de la différenciation des lymphocytes T dans le thymus. ....	44
Figure 1.6 : Les CPA impliquées dans la sélection thymique. ....	49
Figure 1.7 : Sélection thymique des lymphocytes T selon l'affinité du TCR. ....	50
Figure 1.8 : Voies de signalisation impliquées dans la sélection négative. ....	63
Figure 1.9 : Voies de signalisation de l'IL-7. ....	72
Figure 1.10 : Facteurs qui influencent l'homéostasie des lymphocytes T. ....	76
Figure 1.11 : Effets immunosuppresseurs des lymphocytes T régulateurs. ....	81
Figure 1.12 : Maladies auto-immunes systémiques et spécifiques à un organe. ....	85
Figure 1.13 : Différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs en périphérie. ....	88
Figure 4.1 : Modèle du rôle de l'IL-7 produite par les CD dans la sélection négative des lymphocytes T autoréactifs. ....	176
Figure 4.2 : Modèle de la signalisation l'IL-7 produite par les CD en synergie avec le TCR au cours de la sélection négative des LT autoréactifs. ....	179
Figure 1 annexe : Reconstitution thymique suivie d'une atrophie sévère du thymus chez les chimères [WT 10% +IL-7 - / - 90%→ Rag - / -] et [IL-7 - / - 100%→ Rag - / -]. ....	226

## Liste des sigles et abréviations

A2A : Adenosine 2A receptor

ADN : acide désoxyribonucléique

AIRE : Autoimmune Regulator, régulateur de l'auto-immunité

APC : antigen presenting cell, cellule présentatrice d'antigène

AKT : Protéine kinase B

APECED : Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy

APS1 : Autoimmune Polyglandular Syndrome Type I

ARN : Acide ribonucléique

Bad: Bcl-2 antagonist of cell death

BAK : BCL2-antagonist/killer

Batf-3 : Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor 3

BAX : BCL2 Associated X

Bcl-2: B cell leukemia/lymphoma 2

BCR : Breakpoint Cluster Region

BDCA-3 : Blood dendritic cells antigen-3

Bid: BH3 interacting domain death agonist Bim Bcl-2 interacting mediator of cell death

BIM: Bcl-2 homology 3-only

CARD : caspase activation and recruitment domain

CBL : Casitas B-lineage lymphoma

CCR2 : C-C chemokine receptor type 2

CCR9 : C-C chemokine receptor type 9

CD : Cellule dendritique

CD40L: CD40 ligand

cDC: conventional Dendritic cell /Cellules dendritiques conventionnelles

Cdk2: Cyclin-dependent kinase 2

CLP: Progéniteur lymphoïde commun

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

cTEC: Cortical Thymic Epithelial Cells/cellule thymique épithéliale du cortex

CRK : CT10 (chicken. tumor virus no. 10) regulator of kinase

CRKL : CT10 (chicken. tumor virus no. 10) regulator of kinase like

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CTL : Cytotoxic T lymphocyte

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4

CTV : Cell trace violet

DC : Dendritic cell

DN : CD4-CD8- double négatif

DN1 : Thymocytes Double Négatifs CD44+CD25-

DN2 : Thymocytes Double Négatifs CD44+CD25+

DN3 : Thymocytes Double Négatifs CD44-CD25+

DN4 : Thymocytes Double Négatifs CD44-CD25-

DP : Thymocytes Double Positifs CD4+CD8+

ETP : Early Thymic Progenitor

DT1 : Diabète de type 1

EAE : Experimental autoimmune encephalomyelitis

EPCAM: Epithelial cell adhesion molecule

ERK : extracellular signal-regulated kinase

ETP: Cellules progénitrices thymiques / Early Thymic Progenitors

FasL: Fas ligand

FDA : Food and Drug Administration

Fezf2 : FEZ Family Zinc Finger 2

Flt3: Fms-like tyrosine kinase 3

Flt3-L: Fms-like tyrosine kinase-3 ligand

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

FOXP3: Forkhead Box P3

Gab2: GRB2-associated-binding protein 2

GALT : Gut-associated lymphoid tissue

GITR : Glucocorticoid- induced tumour necrosis factor receptor

Grb2 : Growth factor receptor bound protein 2

GTP : Guanosine triphosphate

GVHD: Graft Versus Host Disease/ maladie du greffon contre l'hôte

GVL Graft-versus-leukemia/Greffon contre la leucémie

HLA: Human leukocyte antigen

IEL: Intraepithelial lymphocytes, lymphocytes T intraépithéliaux

IBD : Inflammatory bowel disease

ICOS : Inducible co-stimulator

IFN $\gamma$  : Interféron Gamma

IL : Interleukine

IEC : Intestinal Epithelial Cells

IEL : Intraepithelial lymphocyte

IL-7R $\alpha$  : Interleukine-7 récepteur alpha

iNKT : invariant Natural Killer T

IPEX : Syndrome d'immunodérégulation, polyendocrinopathie, entéropathie auto-immune lié au chromosome X

ILC : Innate lymphoid cells

IPEX : immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked  
ITAM : immunoreceptor tyrosine-base activation motifs  
ITK : inhibiteurs de tyrosines kinases  
iTreg : Lymphocytes T régulateurs inductibles  
JAK : Janus kinase  
JNK : c-Jun NH2-terminal kinase  
KGF : Keratinocyte growth factor  
KO : knockout  
LCK : Lymphocyte Protein Tyrosine Kinase  
LAG 3 : inhibitory receptor Lymphocyte activation gene 3  
LAT : Linker for activation of T cells  
LCR : liquide cébrospinal  
MEK : MAP (Mitogen-Activated Protein) Kinase/ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase)  
MINK : Misshapen-like kinase  
MO : Moelle osseuse  
MLR : Mixed Lymphocyte Reaction, réaction lymphocytaire mixte  
mTEC : Medullary Thymic Epithelial Cells  
mTOR : Mammalian target of rapamycin  
NK : Natural Killer  
NKT : Natural Killer T  
NOD : Non-obese diabetic  
NOD.Scid : NOD ayant un syndrome combiné d'immunodéficience sévère  
NHEJ : Non- homologous end joining  
NLS : nuclear localization signal



NOR-1 : The neuron-derived orphan receptor 1

Nrp1 : Neuropilin-1

nTreg : Lymphocytes T régulateurs naturels

OVA : Ovalbumine

P27: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

PBS: Phosphate buffer saline

PCR : Polymerase Chain Reaction, amplification en chaîne par polymérase

PD-1 : Programmed cell death protein 1

PD-1: Program death-1

pDC : plasmactoid DC, DC plasmacytoïdes

PDL-1 : Programmed death-ligand 1

PI3K: Phosphoinositide 3 kinase

PH: Prolifération homéostatique

PHD1 : Plant-homeodomain 1

PHD2 : Plant-homeodomain 2

PR : polyarthrite rhumatoïde

pTreg: peripheral Treg/ Treg induit en périphérie

RAG: Recombination Associated Genes

Runx3: Runt Related Transcription Factor 3

Sirp $\alpha$ : Signal Regulatory Protein Alpha

STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription

TCR: T Cell Receptor, récepteur de cellule B

TFH: T Follicular Helper

TGF $\beta$ : Transforming Growth Factor Beta

Raf : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

Ras : Rat sarcoma

RSS : recombination signal sequences

SAND : Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1

SEP : Sclérose en plaques

SLE : Systemic lupus erythematosus

SNC : Système nerveux central

SOS : Son of Sevenless

STAT : Signal transducer and activator of transcription 5

TCR : T-cell receptor / Récepteur des LT

Th: Helper T cell

TLR: Toll-Like Receptor

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor Alpha

TRAIL: TNF-related apoptosis inducing ligand

Tr1 : Lymphocytes T régulateurs producteurs d'IL-10

TRA: Tissue-Restricted Antigen

Treg: Lymphocyte T régulateurs

TSA: Tissue-Specific Antigen

tTreg : Thymic Treg

UEA-1 : Ulex europaeus agglutinin-1

VDJ : variable diversity joining

WT : Type sauvage / wild type

ZAP70 : zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70kDa

*« Dans le domaine des idées, tout dépend de l'enthousiasme. Dans le monde réel, tout repose sur la persévérance. » Johann Wolfgang Von Goethe...*

## Remerciements

*Je remercie vivement mon directeur de recherche le Dr Martin Guimond. Merci Martin, de m'avoir accueillie dans ton laboratoire et de m'avoir fait bénéficier tout au long de ces travaux, de tes compétences et de ta rigueur scientifique. Ce fut une très belle opportunité qui m'a permis d'apprendre, d'évoluer et de m'épanouir dans le domaine de la recherche. Je ne te remercierai jamais assez pour ton encadrement, ton soutien, tes encouragements et ta bienveillance. Travailler à tes côtés fut une expérience plus qu'enrichissante qui me guidera durant toute ma carrière. Merci Martin et bonne chance pour la suite.*

*J'adresse également mes remerciements aux membres du jury de cette thèse, Dr Jacques Thibodeau (Président-rapporteur), Dr Ali Ahmad (Membre du jury), Dr Ilangumaran Subburaj (Examineur externe) et Dr Hugo Wurtele (Représentant du doyen) d'avoir accepté d'examiner cette thèse.*

*À mes anciens collègues de laboratoire, Dominique Leboeuf, Simon David-Gauthier, qui m'ont énormément soutenue au cours de ma première année de doctorat, je vous remercie. Merci à tous nos étudiants que j'ai eu le plaisir d'encadrer, Nico, Francis, Intesar et bien d'autres encore, merci pour votre aide et tous ces moments agréables passés ensemble au lab.*

*Je remercie Martine Dupuis, qui m'a beaucoup guidée dans mon apprentissage de la cytométrie en flux.*

*Un grand merci à Julie, Ianula, Marie-Laure et à tout le personnel de l'animalerie pour les soins et le suivi de nos animaux.*

*Merci à mes amis, pour votre soutien et vos encouragements durant toutes ces années. Carole et Christine, ce fut un plaisir nos soirées filles. Un merci particulier à toi Christine, pour ton amitié et ton soutien infailible, que tu m'as toujours témoignés le long de ces années. Un grand merci pour ta relecture de cette thèse. Ma mère a raison, tu es ma sœur et je dirais une sœur vraiment formidable.*

*Merci à mes frères et sœurs, d'être toujours là pour moi, aussi bien dans les moments de joie que dans les moments d'incertitude et de déprime. Merci pour votre soutien et vos encouragements permanents, vous êtes une source d'énergie et de bonheur pour moi, j'ai de la chance de vous avoir dans ma vie ! Comme dit maman : Andouyi kana ouhoundra kabouli.*

*Je remercie ma mère et mon père, pour tous vos efforts, investissements et sacrifices déployés pour m'assurer des bases solides dans ma scolarité et m'orienter à faire de bonnes études. Maman, je n'aurai jamais assez de mots pour t'exprimer ma gratitude pour ton amour inconditionnel et ton soutien indéfectible. Ton courage face à toute épreuve, ta ténacité et ta bravoure sont pour moi une source d'inspiration qui me guide chaque jour. Reçois mon amour, ma profonde reconnaissance et mon admiration.*

*Enfin, je remercie chaleureusement mon amour Tashdjian, tu as toujours cru en moi et en nous. Ton optimisme et ta détermination m'épateront toujours. Merci pour ton amour, ton soutien permanent, ta grande patience et ta loyauté tout le long de cette aventure. Un grand merci pour tes nombreuses relectures de cette thèse.*

# Chapitre 1 : Introduction

L'interleukine 7 (IL-7) est une cytokine produite majoritairement par les cellules stromales et à faibles quantités par les cellules dendritiques (CD). Alors qu'une déficience générale d'IL-7 ou de sa signalisation entraîne un défaut de la thymopoïèse et de l'homéostasie des lymphocytes T (LT), la contribution de l'IL-7 produite par les CD pour les LT est grandement méconnue. En plus de l'IL-7, les CD constituent l'un des facteurs indispensables au développement et au maintien des LT matures. La dérégulation quantitative mais également qualitative des CD est associée à des multiples conséquences incluant une perturbation sévère de la thymopoïèse, une altération de la tolérance favorisant l'auto-immunité et une diminution du pool des LT en périphérie.

L'un des objectifs de cette thèse consistait à analyser la signalisation de l'axe IL-7/IL7R $\alpha$  dans la lymphopénie sévère de LT observée chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) traités avec de l'imatinib. Le deuxième objectif de ces travaux était de comprendre le rôle de l'IL-7 produite par les CD dans la reconstitution et l'homéostasie des LT.

# **Section 1 : Leucémie myéloïde Chronique**

## **1. Description générale**

### **1.1. Définition**

La LMC fut décrite pour la première fois en 1845, par R. Virchow et John Hughes Bennett qui ont rapporté des cas similaires de splénomégalie (Geary, 2000). La LMC est un désordre néoplasique myéloprolifératif caractérisée par une tumeur maligne hématopoïétique clonale qui se manifeste au stade de la cellule souche. Ce trouble est à l'origine d'une augmentation du nombre de cellules myéloïdes, mais également des cellules érythroïdes, des plaquettes sanguines périphériques avec une hyperplasie myéloïde au niveau de la moelle osseuse (Sawyers, 1999). La LMC représente environ 15% des cas de leucémie diagnostiqués chez l'adulte avec une incidence de 1 à 2 cas pour 100 000 adultes, cette incidence augmente avec l'âge, avec une légère prédominance chez l'homme (An et al., 2010; Siegel et al., 2015; Jabbour and Kantarjian, 2018).

### **1.2. Caractéristiques cliniques**

En l'absence de traitement, la LMC se caractérise par une évolution clinique qui se manifeste en 3 phases successives :

- 1) La phase chronique d'une durée de 3 à 5 ans, est associée à une accumulation massive de progéniteurs myéloïdes et des cellules matures dans le sang.
- 2) La phase accélérée se traduit par une augmentation des cellules contenant le chromosome Philadelphie et une présence de blastes dans le sang.

3) La phase blastique: elle se manifeste par un arrêt de la différenciation des cellules hématopoïétiques à l'origine d'une accumulation massive de progéniteurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse, le sang et la rate. Cette accumulation de blastes est à l'origine de la transformation en leucémie aiguë.

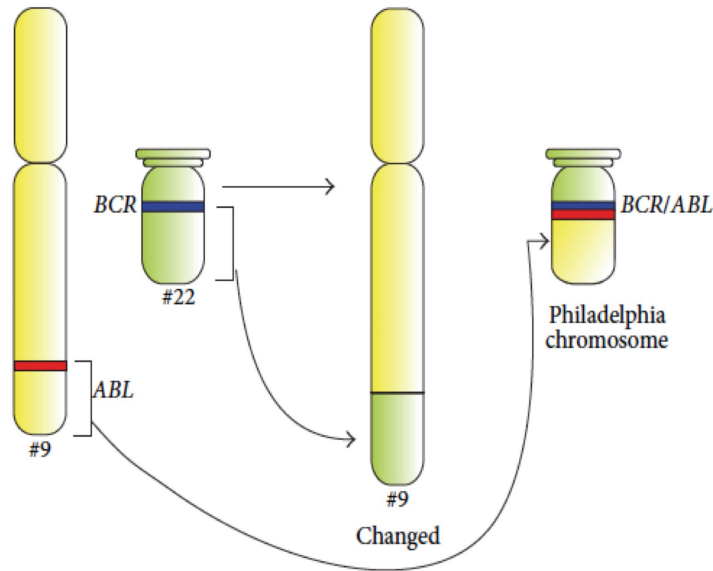
Au cours des phases primaires de la maladie, la moitié des patients LMC, sont asymptomatiques et se voient diagnostiqués au cours d'un examen sanguin de routine. Chez les patients symptomatiques, il est généralement observé : une fatigue avec des malaises, une anorexie, une perte de poids, une anémie, une hypersudation et un cas assez fréquent qui est la splénomégalie.

### **1.3. BCR-ABL : rôle central dans la pathogenèse de la LMC**

La LMC est causée par une prolifération anarchique de cellules hématopoïétiques suite à une anomalie chromosomique qui a lieu dans la cellule souche hématopoïétique. En 1960, Nowell et ses collègues ont identifié pour la première fois le chromosome Philadelphie (Ph<sup>+</sup>) portant le gène BCR-ABL devenu caractéristique de la LMC. Le chromosome de Philadelphie (Ph) est le résultat d'un raccourcissement du chromosome 22, généré par une translocation génétique t(22q; 9q) entre les chromosomes 9 contenant le gène ABL (Abelson) et le chromosome 22 où se localise le gène BCR (Breakpoint Cluster Region) (Nowell, 1962; Rowley, 1973; *Trela et al., 2014*) (Figure 1.1). Cette translocation entraîne la fusion du gène ABL du chromosome 9q34 avec le gène de la région de BCR sur le chromosome 22q11. Le gène BCR-ABL a été identifié dans plusieurs types cellulaires hématopoïétiques : non seulement les cellules souches mais aussi des cellules matures comme les lymphocytes B ainsi que les cellules érythroïdes, mégacaryocytaires et granulocytaires, ce qui démontre très fortement que cette fusion du gène



BCR-ABL a lieu initialement à un stade où la cellule hématopoïétique possède toute sa potentialité pour se différencier en plusieurs sous types de cellules matures (Fialkow et al., 1977; Kabarowski and Witte, 2000).

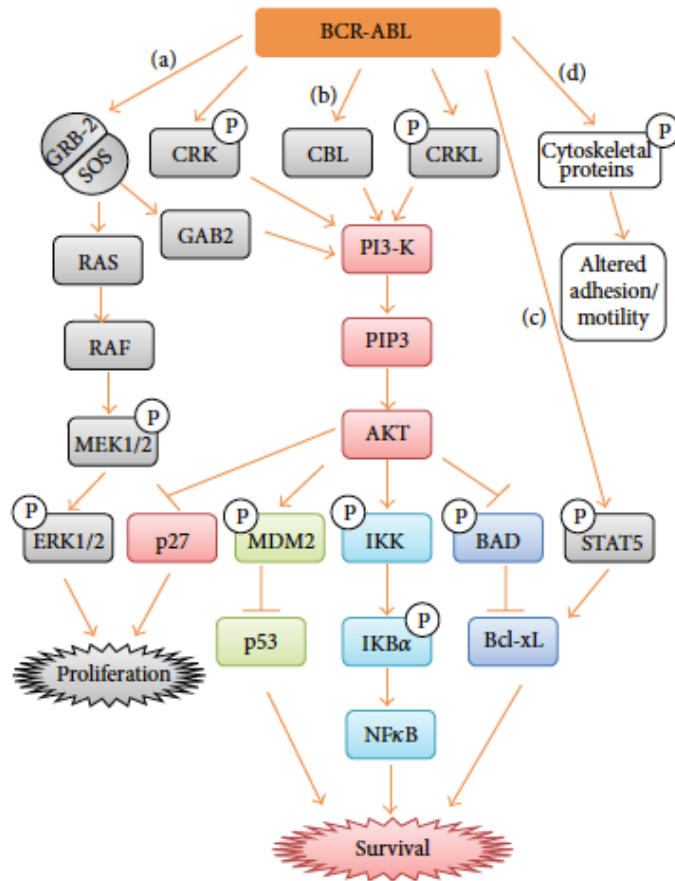


**Figure 1.1 : Formation du chromosome Philadelphie.**

Translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 aboutissant à la formation du gène de fusion BCR-ABL. Cette translocation forme un chromosome 9 anormalement plus long et un chromosome 22 plus court qui forment ensemble le chromosome Philadelphie contenant le gène de fusion BCR-ABL. *Tiré de Trela et al., 2014*

## **2. Voies de signalisation activées par BCR/ABL dans la leucémogénèse**

La conséquence moléculaire de la translocation t (22q ; 9q) est la génération d'un transcrit BCR-ABL traduit en une oncoprotéine BCR-ABL. La protéine de fusion BCR-ABL ainsi que toutes les isoformes générées suite à cette fusion, possèdent une activité tyrosine kinase constitutivement active impliquée dans plusieurs processus cellulaires notamment la prolifération et l'apoptose, à l'origine de la transformation maligne (Faderl et al., 1999). Plusieurs travaux ont démontré que la transformation maligne observée dans les cellules exprimant la protéine BCR-ABL est fortement associée à une activation aberrante de différentes voies de signalisation cellulaire. L'action de BCR-ABL passe par des interactions mettant en jeu des domaines spécifiques de BCR-ABL avec des complexes protéiques impliqués dans différentes cascades de signalisation, favorisant l'activation et la répression des gènes impliqués dans la genèse de la leucémie. Parmi les voies de transduction du signal en aval de la protéine de fusion BCR-ABL qui contribuent à cette transformation en cellules leucémiques, trois principales voies de signalisation sont impliquées : la voie JAK / STAT, la voie Raf / MEK / ERK et la voie PI3K / AKT (Figure 1.2) (Sattler and Salgia, 1997; Goldman and Melo, 2003; Steelman et al., 2004; Khajapeer and Baskaran, 2015).



**Figure 1.2 : Schéma des principales voies de signalisation activées par BCR-ABL.**

(a) BCR-ABL active GRB-2 / SOS qui active à son tour RAS. RAS active RAF. La RAF active stimule MEK1/2, qui active à son tour ERK1/2. L'activation de la voie Ras par BCR-ABL via les protéines adaptatrices GRB-2 / SOS favorise la prolifération des cellules leucémiques. (b) BCR-ABL phosphoryle des protéines adaptatrices telles que CRK et CRKL conduisant à l'activation de PI3-K. PI3-K phosphoryle PIP2 en PIP3 qui active à son tour AKT. L'AKT inhibe p27 conduisant à la prolifération des cellules leucémiques. L'AKT inhibe p-BAD. L'activation de NFκB et l'inhibition de p53 et de BAD par AKT favorisent la survie des cellules leucémiques. (c) Le BCR-ABL phosphoryle STAT5, ce qui favorise la survie des cellules leucémiques. (d) Les protéines du cytosquelette phosphorylées par BCR-ABL entraînent une motilité cellulaire accrue et une adhésion réduite à la matrice extracellulaire de la moelle osseuse. Tiré de Khajapeer and Baskaran, 2015.

## **2.1. Voies de transduction PI3K / AKT**

La mobilisation de la voie PI3K-AKT par la protéine BCR-ABL constitue un facteur essentiel dans le développement de la LMC en favorisant la survie cellulaire et l'inhibition de l'apoptose. L'activation de la voie PI3K/ AKT par BCR-ABL s'effectue par l'intermédiaire de protéines adaptatrices telles que Crk/Crk1 et Cbl, Grb2/Gab2 dont une fois phosphorylées, elles induisent l'activation de la voie PI3K/ AKT (Million and Van Etten, 2000; Sattler and Salgia, 1998; Sattler et al., 2002). Une fois activée, la PI3K phosphoryle l'AKT, qui phosphoryle ensuite des substrats en aval impliqués dans la machinerie apoptotique tels que Bad, caspase 9, favorisant une survie prolongée des cellules transformées (Sattler and Salgia, 1998). L'activation de la PI3K et l'activation de l'AKT sont nécessaires pour la transformation BCR-ABL des cellules de la lignée tant myéloïde que lymphoïde.

## **2.2. Voie JAK / STAT**

Dans la LMC, la voie de transduction JAK / STAT est d'une contribution majeure dans la survie et l'inhibition de l'apoptose des cellules leucémiques. Dans plusieurs lignées cellulaires exprimant BCR-ABL, une activation constitutive de la voie de signalisation JAK / STAT a été démontrée (Chai et al., 1997). Les JAKs représentent une famille de tyrosines kinases cytoplasmiques de 4 types (JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2) associées à de nombreux récepteurs de cytokines et ayant un rôle crucial dans l'hématopoïèse. La stimulation d'une cytokine sur son récepteur enclenche la stimulation de JAKs qui vont via leur activité kinase, phosphoryler différents STATs sur un résidu de tyrosine, ce qui entraîne une dimérisation avant de transloquer

dans le noyau. Huit types de STAT ont été identifiés chez les mammifères (STAT1 $\alpha$ , STAT1 $\beta$ , STAT2, STAT3, STAT3 $\beta$ , STAT4, STAT5A, STAT5B, and STAT6). La phosphorylation de STAT permet la liaison à des promoteurs des gènes cibles, ce qui induit leur transcription. BCR-ABL active JAK2, ce qui induit une phosphorylation constitutive sur les résidus tyrosines de STAT1 et STAT5 (Ilaria and Van Etten, 1996). La protéine de fusion BCR-ABL se sert de cette voie anti-apoptotique pour soutenir l'expression des gènes favorisant la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. La contribution de STAT5 dans la LMC est notamment démontrée via l'incapacité à induire la LMC chez la souris déficiente en STAT5 (Ye et al., 2006). L'utilisation d'inhibiteur de STAT5 dans des cellules LMC diminuant la phosphorylation de la tyrosine de STAT5, conduit à un arrêt de la prolifération et favorise l'apoptose (Nelson et al., 2011).

### **2.3. Voies de transduction Ras / MEK / ERK**

Dans les cellules hématopoïétiques transformées par BCR-ABL, l'activation constitutive de Ras est associée à une inhibition de l'apoptose (Cortez et al., 1995). Dans la LMC, l'implication de Ras est initiée suite à la phosphorylation de BCR au niveau de la tyrosine 177 favorisant la liaison de la protéine adaptatrice Grb2 via son domaine SH2 à BCR-ABL (Pendergast et al., 1993) (Li et al., 2001). Cette interaction induit une modification de la protéine Ras en une forme active (Ras-GTP) via le recrutement du facteur SOS (Son Of Sevenless) (Buday and Downward, 1993) (Pendergast et al., 1993). L'activation de Ras conduit à l'activation de la voie MAPK à l'origine d'une régulation de la survie, prolifération, différenciation, favorable à l'induction de la leucémogénèse (Shet et al., 2002).

### **3. Thérapies pour la LMC**

Face à la gestion de la LMC, initialement les traitements standards reposaient principalement sur la chimiothérapie (busulfan, hydroxyurée), l'interféron- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) puis la greffe de cellules souches allogéniques et enfin des traitements plus innovateurs : les inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK) (Pavlovsky et al., 2009; Santos et al., 2011)

#### **3.1. Traitements non spécifiques**

Le traitement standard chez les patients LMC reposait sur des traitements non ciblés tels que la radiothérapie, l'arsenic ou encore la splénectomie. Entre 1953 à 1970 ont émergé des traitements faisant appels à la chimiothérapie par l'utilisation de l'hydroxyurée et le busulfan.

Le busulfan est un agent alkylant agissant au niveau des cellules souches, introduit en 1953 pour le traitement des symptômes liés à la LMC. La durée moyenne de survie des patients atteints de LMC traités par le busulfan variait entre 35 à 47 mois. Le busulfan est resté le traitement de choix pendant plus de 20 ans et est toujours utilisé dans le cadre de la greffe allogénique.

L'hydroxyurée est un inhibiteur de la ribonucléotide réductase, devenu de plus en plus populaire en raison de son action rapide et de son faible niveau d'effets indésirables. Des études comparatives ont décrit une meilleure efficacité de l'hydroxyurée en montrant une meilleure médiane de survie pour les patients traités par l'hydroxyurée comparativement à ceux traités avec le busulfan. Cependant, ces thérapies n'ont pas montré un avantage de survie ni dans la progression de la maladie vers la phase blastique (Galton, 1953).

D'autres stratégies thérapeutiques ont marqué l'histoire des traitements de la LMC avec l'apparition en 1980 de l'IFN- $\alpha$  qui est un immuno-modulateur non spécifique. Les interférons sont des glycoprotéines ayant des actions antivirales, immunomodulatrices, antiprolifératives et anti-angiogéniques. Elles sont produites en réponse à une stimulation antigénique survenant lors d'infections virales et de maladies malignes. Depuis les années 1980, l'IFN- $\alpha$  était de plus en plus utilisée dans le traitement de la LMC.

Dans les traitements de la LMC, la greffe de moelle osseuse allogénique est considérée comme un traitement curatif avec une utilisation restreinte selon l'âge et la capacité de trouver un donneur compatible.

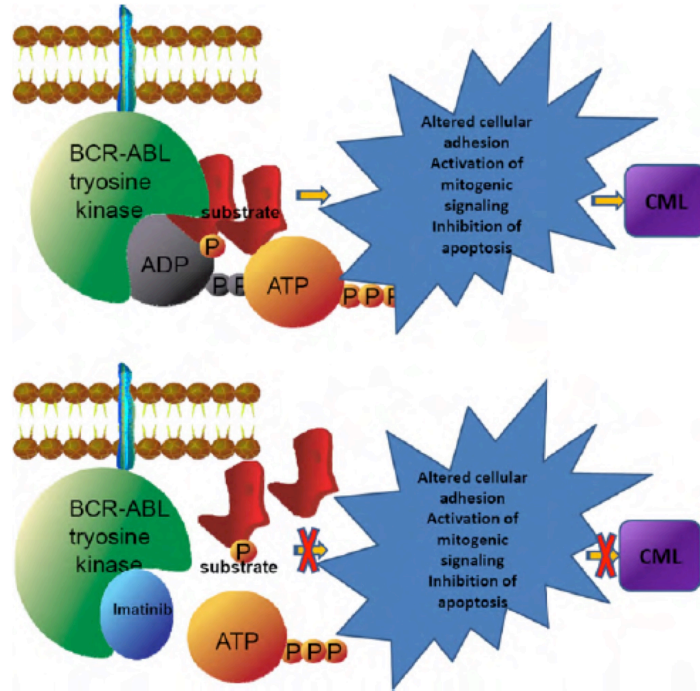
### **3.2. Traitements ciblés : Inhibiteurs pharmacologiques de BCR-ABL Kinase : ITK (Inhibiteur de tyrosine kinase)**

Le développement des traitements par inhibiteur de tyrosine kinase a transformé la façon de traiter la LMC. En effet, grâce aux ITK, les patients peuvent survivre à long terme sans nécessité de greffe de CSH allogénique. Il existe 4 traitements approuvés par la FDA pour la LMC en phase chronique qui sont des inhibiteurs de la tyrosine kinase notamment l'imatinib de première génération puis le dasatinib, le nilotinib et le bosutinib de deuxième génération.

### **3.2.1. imatinib**

L'imatinib est devenu le traitement pharmacologique révolutionnaire à partir de 2001, qui fut le premier inhibiteur de tyrosine kinase approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) aux États-Unis pour traiter la LMC. L'imatinib a la propriété d'inhiber l'activité tyrosine kinase de la protéine BCR-ABL en se fixant au niveau du site catalytique d'ABL où se lie l'ATP, ce qui empêche la phosphorylation des substrats protéiques qui sont directement ou indirectement phosphorylés par l'activité kinase de BCR-ABL (Figure 1.3). La conséquence majeure de l'interaction imatinib/site catalytique d'ABL, est l'inhibition de la survie/prolifération des cellules leucémiques en modifiant la fonction de divers gènes impliqués dans le cycle et l'adhésion cellulaire, l'organisation du cytosquelette et l'apoptose. (Schindler et al., 2000; Savage and Antman, 2002; Santos et al., 2011; Sacha, 2014)





**Figure 1.3 : Effet compétitif de l'imatinib sur le site catalytique de l'ATP situé sur ABL.**

a) L'ATP se fixe sur son site catalytique situé sur BCR-ABL pour phosphoryler les substrats permettant d'activer des effecteurs en faveur de la transformation maligne dans la LMC.

b) L'imatinib se fixe sur le site catalytique de l'ATP, ce qui inhibe l'activité kinase de l'ATP et empêche par conséquent l'activation des effecteurs en faveur de la transformation maligne à l'origine de la LMC.

*Reprinted with permission from Elsevier: Leukemia Research (An et al., 2010), Copyright © 2010 Elsevier Ltd. License number : 4906690294197*

Depuis l'introduction de l'imatinib à dose quotidienne de 300 mg, une amélioration considérable de la survie des patients atteints de LMC a été observée (Jabbour and Kantarjian, 2018). Les données cliniques démontrent des taux élevés de réponses cytogénétiques et hématologiques complètes dans la majorité des patients atteints de LMC en phase chronique (Druker et al., 2001) (Sawyers et al., 2002; Kantarjian et al., 2002; Kantarjian et al., 2012). Chez les patients en phase

de crise blastique, l'imatinib s'est révélé efficace dans le traitement à court terme, en revanche pour le long terme, l'efficacité est réduite (Palandri et al., 2008; Kantarjian et al., 2002; Bonifacio et al., 2019).

### **3.2.2. Autres inhibiteurs de tyrosine kinase**

Bien que l'approbation de l'imatinib en 2001 ait révolutionné la gestion de la LMC, il a cependant été observé que près d'un tiers des patients sont résistants ou intolérants au traitement par l'imatinib. Ces cas de résistance impliquent de nombreux mécanismes, notamment des mutations sur des sites d'ABL (Hochhaus et al., 2002; Shah et al., 2004). Face à cette résistance/intolérance, des nouveaux inhibiteurs de la tyrosine kinase ont été mis au point comprenant le dasatinib, bosutinib, nilotinib qui constituent les inhibiteurs de tyrosine kinase de deuxième génération et puis le ponatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase de troisième génération (Hochhaus et al., 2008; Stein and Smith, 2010; Pavey et al., 2012; Jabbour et al., 2014; Cortes et al., 2013; Sanford et al., 2015). Ces nouveaux inhibiteurs de tyrosine kinase ont démontré leur efficacité à induire des réponses hématologiques et cytogénétiques chez les patients montrant une inefficacité ou une résistance face à l'imatinib (Tokarski et al., 2006; Cortes et al., 2016; Saglio et al., 2010; Hochhaus et al., 2016; Cortes et al., 2012; Cortes et al., 2018).

Malgré les bons résultats obtenus par l'utilisation de l'imatinib et des autres inhibiteurs de tyrosine kinase, certains patients atteints de LMC ont une faible réponse au traitement ou présentent des formes de LMC réfractaires aux traitements. Pour ces patients, la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allo-HSCT) constitue l'option thérapeutique la mieux adaptée. Toutefois, compte tenu des risques élevés associés à la greffe de cellules souches, le recours à l'allo-HSCT comme traitement initial reste limité.

### **3.3. La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)**

Au début des années 1980, la transplantation de CSH est considérée comme une thérapie révolutionnaire pour traiter les déficits hématologiques incluant : les immunodéficiences majeures ainsi que les hémopathies malignes, dont les leucémies, les lymphomes et les myélomes multiples. Dans les années 1990, la thérapie est ensuite considérée comme le traitement curatif idéal pour la plupart des patients LMC en phase chronique. Avec l'introduction de l'imatinib et les autres inhibiteurs de tyrosine kinase, l'évolution clinique de la LMC a été largement modifiée. Cependant, avec la mise en évidence de problèmes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase qui apparaissaient chez certains patients, la transplantation allogénique de CSH demeure une option clinique pour ces patients.

La greffe allogénique implique un donneur de CSH qui diffère du receveur mais appartenant à la même espèce contrairement à une greffe autologue dont les cellules souches qui proviennent du patient lui-même. Avant la transplantation, le patient reçoit tout comme dans la greffe autologue, un traitement de conditionnement myéloablatif par l'administration de doses de chimiothérapie combinées à des immunosuppresseurs, ceci dans le but de détruire les cellules tumorales. Par conséquent, le système hématopoïétique du patient est aussi détruit, ce qui entraîne la prise du greffon en évitant le rejet de greffe. Dans cette alternative, sauf le cas de vrais jumeaux, mais compte tenu de la différence du système du complexe majeur d'histocompatibilité humain (HLA) entre les individus, l'histocompatibilité entre donneur et patient est un facteur central pour permettre la greffe de CSH et d'éviter la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD).

Après la greffe de MO, le système immunitaire du patient est graduellement remplacé par celui du donneur. Par cette approche, l'allogreffe exerce une activité anti-tumorale désigné par l'effet du greffon contre la leucémie (GVL) qui implique une reconnaissance puis une destruction des

cellules tumorales résiduelles de l'hôte par les LT du donneur contenus dans le greffon (Horowitz et al., 1990). Cependant, les LT du donneur peuvent aussi réagir contre les cellules saines du patient : c'est l'effet GVHD, une complication majeure et parfois fatale.

## **Section 2 : Reconstitution et homéostasie lymphocytaire T**

La régénération des LT après une déplétion peut se produire par deux façons : la thymopoïèse et/ou par la prolifération homéostatique des lymphocytes matures contenus dans le greffon (Mackall et al., 1997). La voie thymo-dépendante est fortement liée à l'âge du sujet et le type de greffe et reste plus favorable chez les jeunes sujets. Chez l'adulte, la reconstitution thymo-dépendante reste compromise à cause de l'involution thymique liée à l'âge mais aussi à cause des effets cytotoxiques de la chimiothérapie, ce qui entraîne un dysfonctionnement thymique prolongé altérant la thymopoïèse. Par conséquent, chez l'adulte, la régénération des LT se produit principalement par la prolifération homéostatique (PH) des lymphocytes matures contenus dans la greffe. Ces deux voies de reconstitution des LT requièrent deux facteurs essentiels, à savoir la signalisation du TCR par interaction avec les CD mais également l'IL-7 essentielle au développement, à la survie et à l'homéostasie des LT (Guimond et al., 2005).

# 1. Différenciation thymique

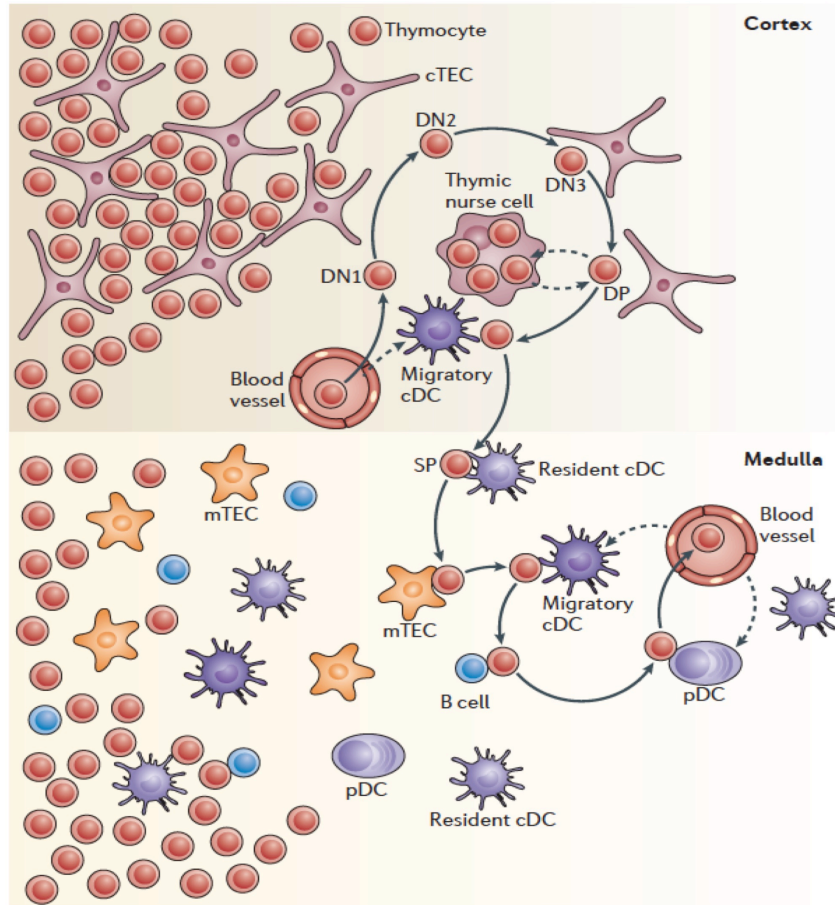
## 1.1. Thymus : organisation anatomique et composition

Le thymus est un organe lymphoïde primaire dont la fonction principale est de soutenir le développement des LT (Miller, 1961; Miller, 2019). Le rôle critique du thymus dans le développement des LT a été mis en évidence pour la première fois par les travaux de J. Miller suite à des expériences de thymectomie néonatale chez la souris. J. Miller a démontré que ces souris présentaient une profonde déficience en LT dans le sang et dans les tissus lymphoïdes (Miller, 1961; Miller, 2002). L'absence de LT observée dans les cas d'athymie congénitale a permis de confirmer chez la souris, le rôle du thymus dans la production LT.

Le thymus est situé dans la cage thoracique, en arrière du sternum et contrairement à la plupart des organes qui voient leur taille augmenter avec l'âge, le thymus reste un organe particulier qui subit une involution graduelle à partir de la puberté. Sur le plan anatomique, le thymus est divisé en deux zones distinctes parfaitement définies : une couche externe qui forme le cortex et une région interne appelée : la médulla. Ces deux régions contiennent divers types de cellules, notamment les thymocytes en développement, des cellules mésenchymateuses, des macrophages, les CD, des LB et un compartiment de cellules stromales hautement spécialisé, constitué de cellules épithéliales thymiques du cortex (cTEC) et de la médulla (mTEC) nécessaire pour supporter la thymopoïèse (Anderson et al., 2007; Takahama, 2006) (Figure 1.4). Le développement des thymocytes est un enchaînement d'évènements qui requièrent une contribution continue des cellules stromales thymiques via des interactions cellule-cellule et une production indispensable de divers signaux requis pour l'engagement lymphocytaire T, la

migration, la survie, la prolifération et la sélection des thymocytes en développement (Anderson et al., 1996; Takahama, 2006; Petrie and Zuniga-Pflucker, 2007). L'importance des TEC pour le développement des LT est d'autant plus démontrée par les déficits immunitaires et l'auto-immunité qui peuvent survenir à la suite d'un développement anormal des TEC (Akiyama et al., 2005; Burkly et al., 1995). En effet dans plusieurs modèles de souris portant des mutations de différents facteurs requis pour le développement des TEC, une atrophie du thymus est observée ainsi qu'une réduction importante du nombre de LT à la périphérie (Su et al., 2003; Naquet et al., 1999).

De façon réciproque, le développement et l'homéostasie des cTEC et mTEC nécessitent des signaux instructifs fournis par les interactions avec les lymphocytes en développement (Shores et al., 1991; Surh et al., 1992; Klug et al., 2002; Irla et al., 2008).



**Figure 1.4 : Interactions des cellules stromales au cours du développement des lymphocytes T.**

Deux régions distinctes : le cortex et la médulla. Ces deux régions contiennent divers types de CPA : cDC résidentes et migratoires, cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) et les lymphocytes B et des cellules épithéliales thymiques du cortex (cTEC) et de la médulla (mTEC) nécessaires pour supporter la thymopoïèse. Le développement des thymocytes implique des étapes successives de maturation des thymocytes allant de DN, DP, SP CD4<sup>+</sup> et SP CD8<sup>+</sup>. Au cours de leur différenciation, les thymocytes interagissent avec les cellules stromales thymiques. *Reprinted with permission from Springer Nature: Nature Reviews Immunology (Klein et al., 2014), Copyright © 2014. License number : 4906570242033*



### **1.1.1. Cortex**

Le cortex représente la couche externe du thymus et constitue une charpente de base pour soutenir les stades précoces de la thymopoïèse. Le cortex thymique est formé de cellules épithéliales spécialisées (cTEC) qui supportent les étapes primaires de la thymopoïèse. Plusieurs études ont permis d'identifier une série de marqueurs permettant d'identifier les cTEC au sein des TEC. Les cTEC expriment EPCAM (CD306), Ly51, Cytokératine 8, CD205 et également le CMH II (Danzl et al., 2014). Ces cellules sont essentielles à la sélection positive des thymocytes.

Les cTEC produisent plusieurs facteurs impliqués dans la maturation des thymocytes tels que des chimiokines et des ligands de chimiokines qui attirent les progéniteurs lymphoïdes dans le thymus. Deux de ces facteurs à savoir l'expression du ligand de Notch1 delta like 4 (DL4) et l'interleukine-7 (IL-7) jouent un rôle indispensable non seulement dans l'engagement des précurseurs vers les LT mais également dans le développement et la prolifération des LT (Anderson et al., 2001; Fiorini et al., 2008; Koch et al., 2008; Thompson and Zuniga-Pflucker, 2011; Ribeiro et al., 2013).

## 1.1.2. Médulla

La médulla est composée de cellules non hématopoïétiques qui sont essentiellement des cellules épithéliales thymiques (mTEC) ainsi que des lymphocytes B (LB), des CD et des macrophages. Dans la médulla, les mTEC et les CD sont les cellules impliquées dans la tolérance centrale (**Voir section 2.2**).

### 1.1.2.1 Les mTEC

Les mTEC occupent un rôle crucial dans la mise en place de la tolérance centrale. Ces cellules expriment une myriade d'antigènes du soi restreints à certains tissus/organes en périphérie (TRA : tissue-restricted antigen) contrôlés par l'expression du facteur AIRE. (Anderson et al., 2002). D'un point de vue phénotypique et fonctionnel, les mTEC constituent une population cellulaire hétérogène qui représente 1% des cellules totales thymiques (Gray et al., 2008). Les mTEC expriment une combinaison de marqueurs qui diffère de celle des cTEC : tels que la lectine *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1), la cytokératine-5, 14, MTS10 et ERTR5, le CMHII, CD80 et le facteur de transcription Aire (Farr and Anderson, 1985; Derbinski et al., 2001; Lopes et al., 2015; Danzl et al., 2014). Selon l'expression de ces différents marqueurs, il est possible d'identifier différents stades de maturation des mTEC. Ainsi, deux sous-types de mTEC sont définis selon leur stade de différenciation : les mTEC immatures exprimant faiblement ou pas le CMH II, CD80 et le facteur Aire et les mTEC matures qui expriment fortement ces marqueurs. Plus loin, nous discuterons de l'implication de ces deux populations de mTEC dans le développement thymique.

### **1.1.2.2. Les cellules dendritiques**

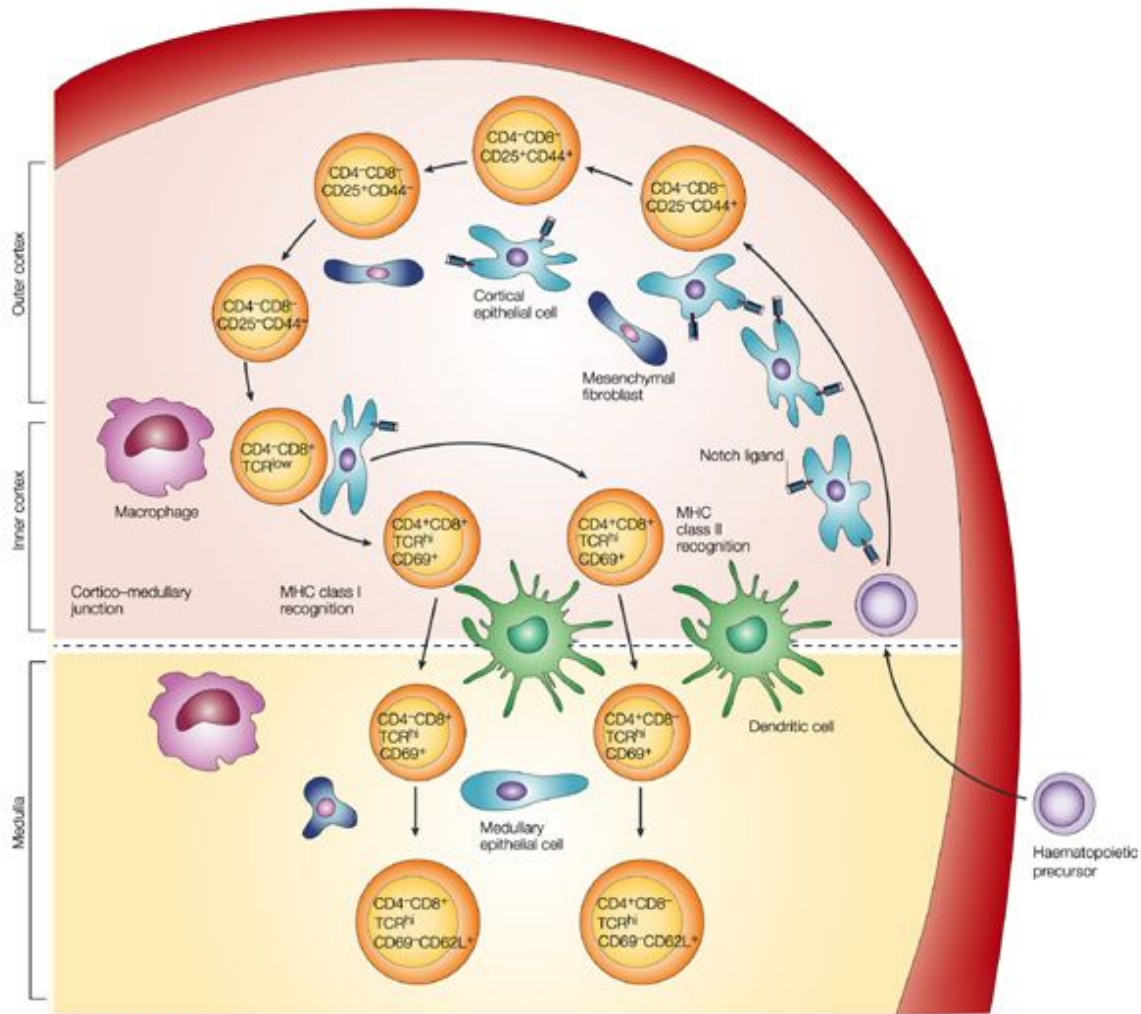
Les CD thymiques représentent au plus 0,5% des cellules présentes dans le thymus (Wu and Shortman, 2005). La majorité des CD thymiques sont localisées dans la médulla ou à la jonction cortico-médullaire du thymus (Ardavin et al., 1993). Les CD thymiques expriment de manière constitutive les marqueurs CD45, CMH-II et CD11c. Comme pour les CD retrouvées en périphérie, les CD thymiques constituent une population cellulaire hétérogène composée de trois sous-ensembles distincts. Deux types de CD sont dits conventionnels puisqu'elles expriment fortement le CD11c, tandis que le troisième sous-type de CD exprime faiblement le CD11c et a été nommé CD plasmacytoïdes (pDC). Alors que les CD CD8 $\alpha^+$  représentent environ 50% des CD thymiques, les CD Sirp $\alpha^+$  et pDCs représentent 20% et 30% des CD thymiques (Wu and Shortman, 2005). Le rôle des CD dans la différenciation des lymphocytes T sera discuté dans la partie suivante : sélection négative.

## **1.2. Différents stades de maturation des lymphocytes T**

### **1.2.1. De la moelle osseuse au thymus**

Toutes les lignées de cellules sanguines sont dérivées de cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui se trouvent dans le foie fœtal ou la moelle osseuse après la naissance. Les CSH sont des cellules multipotentes capables d'auto-renouvellement, qui permettent de générer l'ensemble des cellules matures du système hématopoïétique. Contrairement aux autres types de cellules hématopoïétiques, l'ontogenèse des LT reste un processus particulier qui s'opère dans le thymus. La différenciation des LT implique la migration d'un progéniteur thymique (ETP : *Early Thymic Progenitors*) de la moelle osseuse vers le thymus. Au niveau du thymus,

le thymocyte migre vers le cortex avant de rentrer dans la médulla et générer des LT matures libérés en périphérie par la suite (Kyewski, 1987; Lind et al., 2001). Sachant qu'un ETP peut se différencier en LT, LB, cellules NK et CD CD8 $\alpha^+$  (Shortman et al., 1998; Michie et al., 2000; Lu et al., 2005), certains travaux ont cherché à comprendre les signaux que reçoit un ETP pour s'engager spécifiquement vers le lignage T. Les travaux de J-C Zúñiga-Pflücker effectués à l'aide de lignée OP9 / OP9-DL1 ont montré que la signalisation fournie par Notch était nécessaire pour l'engagement de l'ETP vers le lignage T (Schmitt and Zuniga-Pflucker, 2002; Schmitt et al., 2004).



Nature Reviews | Immunology

**Figure 1.5 : Étapes de la différenciation des lymphocytes T dans le thymus.**

Un progéniteur hématopoïétique provient de la moelle osseuse et migre dans le thymus. Dans le thymus : le progéniteur hématopoïétique passe par différents stades de différenciation basés sur l'expression de marqueurs de surface cellulaire CD44 et CD25, CD4, CD8, ainsi que le niveau de l'expression du TCR. DN : double-négatifs; DP : double-positifs; SP : simple-positifs. Dans ce processus de maturation, les signaux fournis par le microenvironnement thymique comme Notch sont essentiels pour la différenciation des thymocytes, qui aboutit à la génération de LT CD4<sup>+</sup> et de LT CD8<sup>+</sup> matures. *Reprinted with permission from Springer Nature: Nature Reviews Immunology (Zúñiga-Pflücker, 2004), Copyright © 2004, Springer Nature. License number: 4906590425440*

### 1.2.2. DN1–DN2

Dans le thymus, les ETP qui proviennent de la moelle osseuse doivent passer par plusieurs étapes successives de développement pour générer des LT matures (Figure 1.5). Après la migration dans le thymus, les ETP constituent une population de cellules doubles négatives (DN) caractérisées par l'absence des corécepteurs CD4 et CD8. Cette population de DN représente entre 1 et 5% des thymocytes totaux. Au sein des DN, 4 stades de maturation allant de DN1 à DN2 ont été définis en se basant sur l'expression des marqueurs CD25 et CD44 (Godfrey et al., 1993). Les DN1 sont CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> étant le stade initial des ETP. Le stade DN 1 est encore non spécifique à la lignée T, puisqu'ils peuvent encore générer des LB, cellules NK et CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> (Bhandoola et al., 2007). Les DN1 se différencient en DN2 CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> qui représentent un stade partiellement engagé dans le lignage T.

### 1.2.3. DN2–DN3

Au cours de la transition du stade DN2 CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> à DN3 CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>, la machinerie moléculaire nécessaire au réarrangement des gènes V, D et J codant pour la chaîne  $\beta$  du TCR se met en place. Il est également démontré que le réarrangement au niveau du locus TCR-  $\gamma$  se produisait également entre le DN2 CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et le DN3 CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> (Godfrey et al., 1994).

Le TCR est un hétérodimère composé de deux polypeptides à l'origine de deux combinaisons possibles : un TCR  $\alpha \beta$  ou  $\gamma \delta$ . Il est bien connu que le répertoire des LT dans le thymus et à la périphérie, est composé majoritairement de LT  $\alpha \beta$ . Les gènes codants pour le TCR sont composés d'une région variable et d'une région constante. La région variable de chaque sous-

unité est assemblée à partir de trois séquences : variable (V), de diversité (D) et de jonction (J) pour les chaînes  $\beta$  et  $\delta$  et seulement V et J pour les chaînes  $\alpha$  et  $\gamma$ . Des mécanismes mettant en jeu des réarrangements génomiques au niveau des régions VDJ et VJ sont à l'origine de la diversité des LT face à la reconnaissance spécifique d'un antigène donné. (Davis and Bjorkman, 1988). Chaque segment V, D, J est encadré par des séquences de signal de recombinaison (RSS) qui constituent des sites de clivage et de recombinaison qui permettent différentes possibilités d'assemblage des segments VDJ ou VJ. Les travaux de l'équipe de Baltimore ont permis d'identifier les gènes RAG1 et RAG2 codant pour les protéines Rag impliquées dans le processus de recombinaison VDJ, (Schatz et al., 1989; Oettinger et al., 1990). La recombinaison s'effectue entre la région 3' des segments V toujours flanqués par une séquence RSS 12 et la région 5' des segments J débutant par une séquence RSS 23. Rag1 et Rag2 se lient aux séquences RSS et induisent des clivages pour éliminer la région située entre les deux RSS. Tout d'abord, l'enzyme Rag1 cible les nanomètres à côté des segments V et J et Rag2 vient stabiliser le complexe. Les protéines Rag1 et Rag2 sont soutenues par des protéines HMGB1 et HMGB2 qui augmentent la stabilité du complexe pour permettre le clivage. La dernière phase implique un processus de ligation de l'ADN afin de relier les extrémités d'ADN au niveau des sites de clivage. Ce processus fait intervenir un réseau de complexes protéiques « NHEJ » comprenant les protéines Ku70, Artemis, l'ADN ligase IV et l'ADN-PKcs (Schatz and Ji, 2011; de Villartay et al., 2003).

Le rôle crucial de Rag1 et Rag2 dans la lymphopoïèse est bien illustré par les souris mutantes Rag1 ou Rag2 qui sont dépourvues de LT et de LB (Shinkai et al., 1992; Mombaerts et al., 1993). Chez l'humain, des mutations nulles sur les deux allèles de RAG1 et/ou RAG2

conduisent au phénotype T-B-SCID tandis que des mutations faux-sens sur au moins un allèle sont responsables d'un syndrome nommé syndrome d'Omenn (Villa et al., 2001).

Seuls les DN3 ayant réarrangé avec succès le locus du gène TCR $\beta$  et exprimant une chaîne fonctionnelle de TCR $\beta$  sont sélectionnés suite à un processus appelé « sélection  $\beta$  », tandis que les cellules qui ne parviennent pas à un réarrangement du TCR $\beta$  meurent à ce stade (Dudley et al., 1994). La chaîne  $\beta$  des DN3 sélectionnée s'apparie ensuite avec la chaîne de substitution, pré-T $\alpha$ , pour former le pré-TCR, qui s'associe avec les composantes de la molécule CD3 (les chaînes epsilon ( $\epsilon$ ), gamma ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ) et zêta ( $\zeta$ )) (Saint-Ruf et al., 2009; Michie and Zuniga-Pflucker, 2002). La signalisation passant par ce complexe permet la poursuite de la différenciation, en plus d'empêcher tout réarrangement de la chaîne  $\beta$  au niveau de l'allèle opposé (exclusion allélique) (von Boehmer et al., 1998; Khor and Sleckman, 2002).

#### **1.2.4. DN3–DP**

Les signaux générés par cet assemblage du pré-TCR avec le complexe CD3 induisent une différenciation en thymocytes de stade DN4 caractérisé par la perte du marqueur CD25 et une absence de l'expression du marqueur CD44 (Godfrey et al., 1993). Ces cellules commencent à exprimer les corécepteurs CD4/CD8 lors de leur transition DN4 vers le stade double positif (DP), à ce moment s'effectue la recombinaison du locus de la chaîne  $\alpha$  du TCR (Petrie et al., 1990; Shortman et al., 1990; Petrie and Zuniga-Pflucker, 2007). Un réarrangement fonctionnel de la chaîne  $\alpha$  va permettre l'appariement à la chaîne  $\beta$  du TCR et son expression à la surface des cellules DP. Suite au réarrangement, les cellules subissent une sélection positive afin d'éliminer les thymocytes qui expriment un TCR non fonctionnel (Starr et al., 2003).

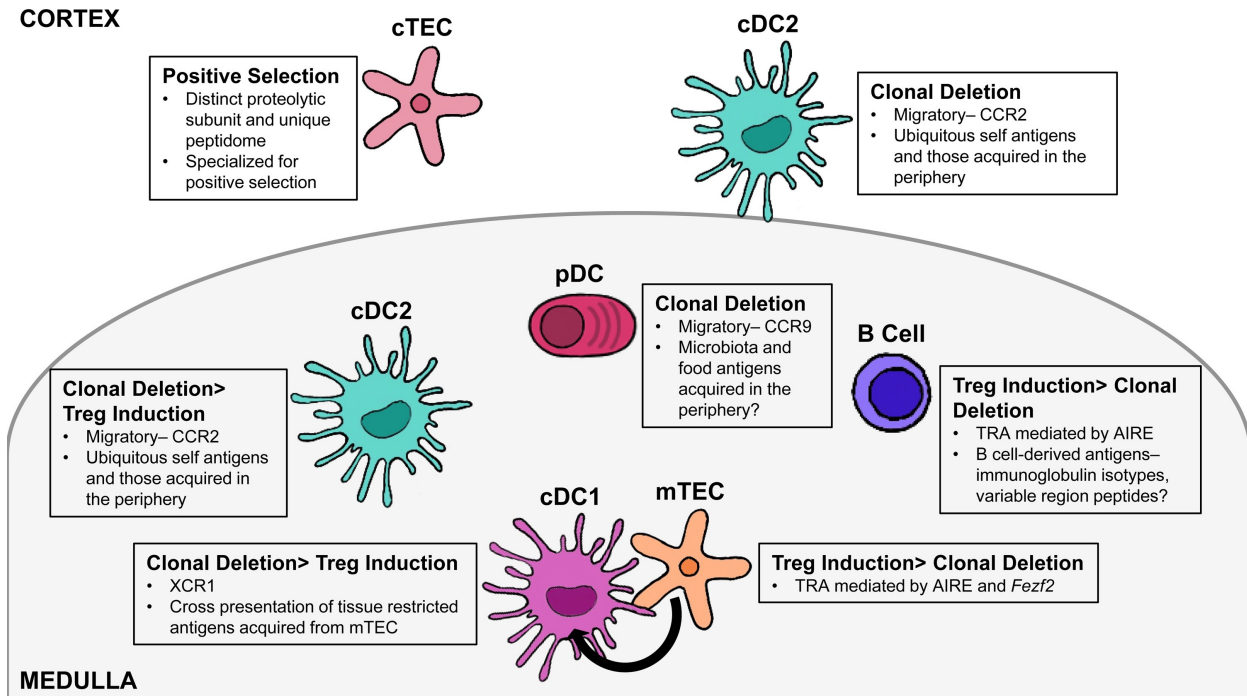


### 1.2.5. DP–SP

Après le stade DP, les thymocytes se différencient en cellules simples positives (SP) CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (Starr et al., 2003). Selon l'intensité de la signalisation du TCR en réponse à la liaison au CMH de classe II, l'expression du facteur de transcription ThPOK peut-être induite. Cette protéine essentielle pour la spécificité CD4, réduit l'expression du Runx3 qui joue un rôle important dans l'engagement vers la ligné CD8 (Egawa and Littman, 2008; Luckey et al., 2014). Si, toutefois, un thymocyte en développement ne se lie pas fortement au CMH de classe II, les niveaux de ThPOK seront insuffisants et l'expression de Runx3 favorisera la différenciation en thymocyte CD8<sup>+</sup>. Les SP sont ensuite soumis à une audition pour la mise en place de la tolérance centrale (ce dernier point sera détaillé dans la section suivante).

## 2. La mise en place de la tolérance centrale dans le thymus

La diversité et la tolérance au soi du répertoire des LT sont régulées en grande partie dans le thymus et orchestrées par différents types cellulaires. (Figure 1.6)

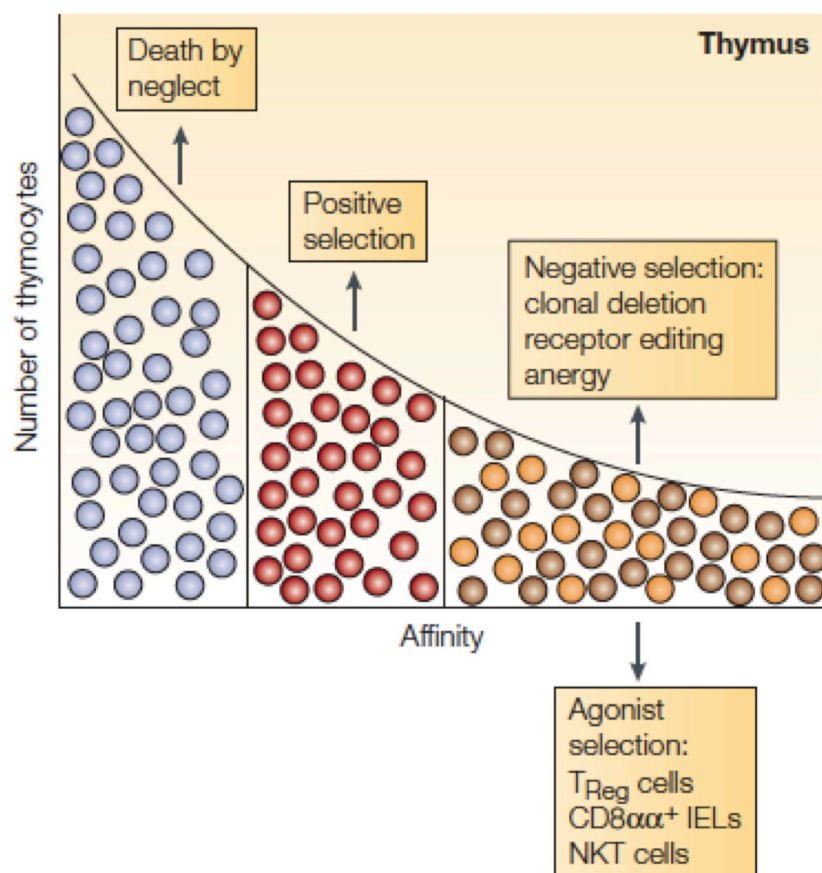


**Figure 1.6 : Les CPA impliquées dans la sélection thymique.**

La sélection positive qui se déroule dans le cortex est sous l'action des cTEC. La sélection négative (délétion clonale) / induction de Treg a lieu dans la médulla sous l'action de plusieurs CPA. Reprinted with permission from Elsevier: Seminars in Cell & Developmental Biology (Breed et al., 2018). Copyright © 2017 Elsevier Ltd. License number: 4906591507201

Au cours de la sélection négative, le TCR interagit avec les complexes peptides du soi/ CMH pour éliminer les thymocytes autoréactifs. Dans le thymus, le TCR est capable de discriminer des différences subtiles aussi bien dans la conformation que dans la composition du complexe

peptide/CMH et cette discrimination détermine le destin d'un thymocyte (Figure 1.7). Le processus de sélection négative survient dans la médulla, et vise à éliminer les thymocytes qui ont une forte avidité pour les complexes peptide–CMH présentés par les CD et les mTEC.



**Figure 1.7 : Sélection thymique des lymphocytes T selon l'affinité du TCR.**

L'affinité du TCR pour le complexe CMH/peptide du soi est le paramètre crucial qui détermine le développement du thymus. Les progéniteurs qui n'ont aucune affinité ou ont une très faible affinité meurent par négligence. Les thymocytes ayant un TCR capable de reconnaître le complexe CMH/peptide du soi, survivent pour continuer leur différenciation, ce processus est la sélection positive. Pour les thymocytes ayant une forte affinité pour les complexes peptide du soi-CMH : plusieurs possibilités se présentent : la délétion clonale ou sélection négative ou l'édition des récepteurs, l'anergie ou la différenciation en d'autres lignées : les Treg, IEL, NKT, CD8 $\alpha\alpha$ . *Reprinted with permission from Springer Nature: Nature Reviews Immunology (Hogquist et al., 2005), Copyright © 2005, Springer Nature. License number: 4906590425440*

## 2.1. Sélection positive

Comme décrit dans la partie précédente, les DP expriment à leur surface des TCR qui ont subi plusieurs remaniements à l'origine d'une grande diversité de TCR, à ce stade il devient primordial de sélectionner les thymocytes ayant un TCR « fonctionnel » donc capable de reconnaître le complexe CMH/peptide du soi. La sélection positive se présente donc comme le processus qui établit la spécificité de restriction du CMH des LT (Bevan, 1977; Zinkernagel et al., 1978). Dans ce processus, les thymocytes ayant un TCR capable de reconnaître avec une affinité modérée le complexe CMH/peptide présenté par les cTEC, sont positivement sélectionnés (Figure 1.7). En revanche les thymocytes ayant un TCR ne pouvant pas reconnaître le complexe CMH/peptide du soi sont amenés à subir une mort cellulaire programmée : la mort par négligence (Benoist and Mathis, 1989a). Chez la souris, alors que chaque jour environ 50 millions de thymocytes CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> double positifs (DP) sont auditionnés pour la sélection positive, seuls 3% à 5% des DP sont sélectionnés positivement pour continuer leur maturation, 90-95 % de ces précurseurs sont soumis à la mort par négligence, car ils expriment des TCR considérés comme non fonctionnels (Klein et al., 2009; Merckenschlager et al., 1997).

Il est admis que parmi les différents types de cellules localisées dans le cortex (hématopoïétiques et non hématopoïétiques), les cellules épithéliales corticales thymiques (cTEC) constituent la population spécifique et unique pour soutenir les étapes précoces de la thymopoïèse mais également la sélection positive. (Benoist and Mathis, 1989b; Anderson et al., 1994; Ernst et al., 1996; Laufer et al., 1996).

La sélection positive requiert des peptides du soi spécifiques associés au CMH présentés par les cTEC. Les peptides du soi présentés aux thymocytes lors de la sélection positive sont

générés par une machinerie spécifique aux cTEC : le thymoprotéasome. Le thymoprotéasome est une forme spécifique de protéasome spécialisée dans la production des antigènes thymiques présentés pour la sélection positive des LT CD8<sup>+</sup> (Xing et al., 2013; Murata et al., 2007). Pour la sélection des LT CD4<sup>+</sup> qui requière des peptides du soi associés au CMH II, ces peptides du soi sont générés par un autre processus impliquant des mécanismes d'autophagie en association avec des protéases lysosomales : la cathepsine L et Prss16 ou sérine protéase spécifique du thymus, (Tssp) lesquelles de concert contribuent à assurer la sélection positive des LT CD4<sup>+</sup> (Honey and Rudensky, 2003; Viret et al., 2011).

## **2.2. Sélection négative**

Bien que la médulla soit le lieu de prédilection où se déroule la sélection négative, il semblerait que la sélection négative peut dans certains cas survenir dans le cortex (Kisielow et al., 1988; McCaughtry et al., 2008; Stritesky et al., 2013; Breed et al., 2019).

Dans la médulla, la qualité des signaux fournis au TCR via les interactions TCR/peptide du soi /CMH détermine la mise en place de la tolérance centrale (Figure 1.7). Les thymocytes ayant une affinité trop forte pour les complexes CMH/peptide du soi sont soit éliminés via la sélection négative, soit redirigés vers une différenciation en d'autres lignées telles les Treg, IEL, NKT, CD8 $\alpha$  (Figure 1.7). En effet, ces thymocytes ayant un TCR de haute affinité pour le soi pourraient, une fois sortis du thymus, causer des effets néfastes pour l'organisme. De nombreux travaux ont mis en évidence la théorie de la délétion clonale initialement postulée par Brunet (Burnet, 1976). Ces travaux ont été menés en grand parti dans des modèles murins transgéniques qui possédaient un TCR spécifique à un superantigène ou à un antigène du soi

connu. Les observations dans ces études ont démontré une élimination de ces LT autoréactifs (Kappler et al., 1987; MacDonald et al., 1988; Kisielow et al., 1988).

L'établissement de la tolérance au soi dans le thymus est régulé par divers types cellulaires comprenant les mTEC, les CD, macrophages et les LB thymiques (Kyewski and Klein, 2006; Lopes et al., 2015). Le rôle précis occupé par chacun des types de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dans la mise en place et le contrôle de la tolérance du soi a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche. Les macrophages thymiques seraient importants dans l'élimination des cellules apoptotiques (Surh and Sprent, 1994). Le rôle des LB thymiques est encore controversé et seulement quelques études ont montré une implication des LB dans la sélection négative des thymocytes qui possédaient des TCR restreints à certains tissus (Kleindienst et al., 2000; Frommer and Waisman, 2010; Perera et al., 2013; Perera et al., 2016; Yamano et al., 2015). La contribution des mTEC et CD dans la sélection négative a fait l'objet de plusieurs études (Klein et al., 2011; Breed et al., 2018). Pour la mise en place de la tolérance centrale, les thymocytes analysent des antigènes du soi qui leurs sont présentés par les différentes CPA thymiques. Ceci mène aux questions suivantes : quelle est la contribution de chacune de ces CPA (ici nous décrivons les CD et les mTEC), quelle est la nature de ces autoantigènes et comment sont-ils présentés aux thymocytes ? Quelle est la nature des interactions et de la signalisation transmise après l'engagement du TCR de haute affinité ?

### 2.2.1. Rôle des mTEC dans la sélection négative

Les mTEC occupent un rôle crucial dans la tolérance au soi via la sélection négative et la génération de Treg (Klein et al., 2014). La plus grande spécificité retrouvée au sein des mTEC repose sur l'expression d'antigènes du soi restreints à certains tissus/organes en périphérie (TRA : tissue-restricted antigen) (Derbinski et al., 2001).

Les analyses transcriptomiques des mTEC matures ont démontré l'expression d'environ 19 293 gènes ce qui équivaut à environ 85% du génome de la souris. Cette expression d'antigènes du soi spécifiques est régulée par le facteur de transcription Aire qui régule l'expression de plus de 3980 gènes via un complexe de transcription qui lui est spécifique (Anderson et al., 2002; Liston et al., 2003; Mathis and Benoist, 2009; Sansom et al., 2014). Plus récemment, le facteur de transcription Fezf2 a été identifié dans la régulation des gènes de TRA dans les mTEC et ce mécanisme semble être indépendant de Aire (Takaba et al., 2015).

Comme mentionné plus haut, deux sous populations de mTEC ont été identifiées selon l'expression des marqueurs CMH II et CD80. Alors que les mTEC<sup>High</sup> matures expriment fortement le CD80 et le CMH de classe II, les mTEC<sup>low</sup> immatures expriment plus faiblement le CMHII et CD80 (Gray et al., 2006; Lopes et al., 2015; Abramson and Anderson, 2017). L'expression du facteur de transcription Aire est prédominante au sein des mTEC matures, cependant cette expression serait limitée à une petite sous-population de mTEC matures dont seules 1 à 3% expriment un antigène du soi spécifique (Derbinski et al., 2008). Pour le facteur Fezf2, son expression est détectée dans 30% de la population de mTEC<sup>low</sup> et dans la quasi-totalité de la population de mTEC<sup>high</sup> (Takaba et al., 2015).

En 2002, Ramsey et ses collègues ont montré le rôle crucial du facteur Aire dans la prévention de l'auto-immunité à l'aide de souris mutantes pour le gène Aire. Ces travaux ont démontré

que malgré un développement embryonnaire normal, les souris Aire<sup>-/-</sup> avaient un répertoire de LT anormal et développaient une maladie auto-immune systémique avec une infiltration lymphocytaire dans plusieurs organes et une production d'autoanticorps. (Ramsey et al., 2002). Une corrélation directe entre la déficience de facteur Aire et une altération de la sélection négative des thymocytes a été démontrée (Liston et al., 2003; Anderson et al., 2002). Par exemple, les souris LT 3A9 Aire<sup>-/-</sup> ayant un TCR spécifique à un antigène du soi de haute affinité, démontrent une inefficacité de la délétion des LT autoréactifs (Liston et al., 2003; Anderson et al., 2002).

Chez l'humain la mutation du facteur Aire est responsable du développement du syndrome de la polyendocrinopathie auto-immune humaine (APS-1), également appelé syndrome auto-immunitaire polyendocrinopathie candidose dystrophie ectodermique (APECED) touchant plusieurs organes (Finnish-German, 1997; Mathis and Benoist, 2009). Ces observations démontrent que la déficience ou une anomalie fonctionnelle de Aire entraîne la non-expression de nombreux TRA dans le thymus lors de la sélection clonale. Cela conduit à l'émergence de LT autoréactifs en périphérie à l'origine de réactions auto-immunes. En ce qui concerne le facteur Fezf2, une déficience de son expression dans les mTEC conduit à un profil auto-immun avec infiltration des poumons, du foie, des reins, de l'estomac, de l'intestin grêle, des glandes salivaires, du cerveau et des testicules, donc un profil qui diffère des cibles principales associées à la déficience en Aire (Takaba et al., 2015).

La fonctionnalité du facteur Aire dans le contrôle de l'expression des TRA par les mTEC, sera décrite assez brièvement dans cette thèse.

Aire est codé par un gène situé sur le chromosome 21 au niveau de la région q22.3 et chez la souris, il est situé sur le chromosome 10. L'expression de Aire a été observée principalement



dans le thymus, cependant Aire est détectée également dans divers tissus et types de cellules en dehors du thymus (Zhao et al., 2018). D'un point de vue structurel, Aire est composé principalement d'un domaine CARD, une séquence NLS, un domaine SAND ayant une forme atypique, impliqué dans la liaison à l'ADN, à d'autres protéines et des domaines PHD1 et PHD2 (Kumar et al., 2001; Passos et al., 2018). Bien qu'Aire possède des domaines de liaison communs à de nombreux facteurs de transcription, Aire n'opère pas comme un facteur de transcription classique en se liant à des promoteurs pour induire la transcription. Aire ne comporte pas de motif de liaison direct à l'ADN et par conséquent, il ne se lie pas directement aux séquences génomiques codant pour les antigènes restreints. En revanche, Aire peut interagir avec des régions de la chromatine relativement inactives via son domaine PHD1 qui se lie aux molécules d'histone 3 avec une lysine non méthylée en position 4 (H3K4) (Org et al., 2008; Koh et al., 2010; Anderson and Su, 2016). De telles interactions favorisent l'accessibilité de l'ADN face à la machinerie transcriptionnelle et la mobilisation des histones avec l'ARN polymérase II pour l'initiation de l'expression du TRA dans les mTEC.

### **2.2.2. Les peptides du soi impliqués dans la sélection négative des lymphocytes T**

Les autoantigènes impliqués dans la sélection négative, sont des TRA exprimés par les mTEC sous l'activité transcriptionnelle du facteur Aire. Il y a également les autoantigènes qui sont importés de la périphérie par les CD (Atibalentja et al., 2009; Klein et al., 2014). Ces peptides du soi exprimés dans la médulla, doivent être présentés aux thymocytes en développement par

les molécules de CMH présentes à la surface des différentes CPA de la médulla (essentiellement les CD et les mTEC). Les mTEC possèdent un immunoprotéasome qui permet de traiter les antigènes intracellulaires destinés à être complexés avec le CMH I. Pour les peptides associés au CMH II, il a été démontré que les TEC sont faiblement phagocytaires et donc inefficaces pour la présentation de peptides exogènes. Tout comme les cTEC, les mTEC ont un niveau d'autophagie constitutif élevé qui permet un chargement endogène du CMH II avec des autoantigènes provenant du cytoplasme, du noyau et des organelles. Les souris dont le processus d'autophagie est aboli, développent de l'auto-immunité systémique (Nedjic et al., 2008; Leavy, 2008).

### **2.2.3 Rôle des CD dans la sélection négative**

Des études basées sur des modèles d'expression des molécules du CMH exclusivement sur les CD ou les mTEC ont démontré de façon concluante que les CD sont indispensables pour la sélection négative (Brocker et al., 1997; Gallegos and Bevan, 2004; Ohnmacht et al., 2009). A partir de souris RIP-mOVA reconstituées avec de la moelle osseuse OT-II.CMH II<sup>-/-</sup>, Gallegos et Bevan ont démontré une altération de la sélection négative des LT CD4<sup>+</sup> OTII (Gallegos and Bevan, 2004). Dans un modèle de greffe de MO, l'absence des CD ou le déficit de CMH II sur les CD entraîne une accumulation de thymocytes SP CD4<sup>+</sup> avec une infiltration de LT CD4<sup>+</sup> autoréactifs polyclonaux dans plusieurs organes. (Ohnmacht et al., 2009; Teshima et al., 2003). Le Groupe de Kristin A. Hogquist a démontré très récemment que les CPA dérivées de la moelle osseuse contribuaient à environ la moitié du processus de délétion clonale thymique (Breed et al., 2019).

Dans le thymus, les CD se subdivisent en plusieurs sous types : les CD résidentes, les CD migratoires et les pDC (Donskoy and Goldschneider, 2003; Li et al., 2009; Proietto et al., 2008a). Aujourd'hui, il est clairement reconnu que ces divers sous-types de CD sont tous impliqués dans la sélection négative (Wu and Shortman, 2005). Au niveau de leur répartition spatiale, la majorité des CD thymiques sont localisées dans la médulla ou à la jonction cortico-médullaire (Ardavin et al., 1993; Sprent and Webb, 1995).

### **2.2.3.1 Les cellules dendritiques CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>**

Les CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Sirp $\alpha$ <sup>-</sup> cDC expriment le transcrit et la protéine CD8 $\alpha$ . Ces cellules représentent plus de 50 % des CD thymiques et elles se développent à l'intérieur du thymus et sont communément appelées cDC résidentes (Vremec et al., 2000; Wu and Shortman, 2005). Chez l'humain, une population équivalente aux CD8 $\alpha$  murines a été caractérisée à l'aide du marqueur spécifique BDCA-3 (Blood Dendritic Cell Antigen 3) (Poulin et al., 2010). L'origine des cDC résidentes est probablement lymphoïde puisque ces cellules se différencient à partir d'un progéniteur T / CD commun présent dans le thymus. Les cDC résidentes sont capables de présenter des peptides dérivés d'antigènes exogènes sur des molécules de CMH I à des LT CD8<sup>+</sup>, par le mécanisme nommé : présentation croisée.

Un facteur de transcription essentiel au développement des CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> est le facteur Batf3 qui favorise la transition de pré-CD vers les CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, et par conséquent les souris Batf3<sup>-/-</sup> sont dépourvues de CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> (Hildner et al., 2008). Chose surprenante, les souris Batf3<sup>-/-</sup> ne développent pas d'auto-immunité spontanée. Par contre, il a été suggéré que l'absence d'auto-immunité chez ces souris pourrait être due au fait que les CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> seraient nécessaires non

seulement à la sélection négative mais aussi à l'activation d'un clone de LT donné. En revanche le groupe de Konstantina Alexandropoulos a démontré que la combinaison d'une déficience de mTEC et de CD CD8 $\alpha^+$  était nécessaire au développement de l'auto-immunité (Herbin et al., 2016).

Le consensus proposé actuellement est que les mTEC et les cDC CD8 $\alpha^+$  coopèrent pour la sélection négative, alors que les mTEC jouent un rôle non redondant dans la production des nTreg. De plus, les mTEC et les CD8 $\alpha^+$  cDC apportent une contribution unique à l'induction de la tolérance qui ne peut être compensée par les autres types de CD thymiques restants (Herbin et al., 2016)

### **2.2.3.2 Les cellules dendritiques Sirp $\alpha^+$**

Les CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> CD8 $\alpha^-$  Sirp $\alpha^+$  cDC sont désignés par le terme de « cDC migratoires » et représentent environ 30% des CD thymiques (Wu and Shortman, 2005). Les cDC Sirp $\alpha^+$  migrent de la périphérie vers le thymus via la circulation sanguine pour présenter des antigènes périphériques aux thymocytes en développement (Li et al., 2009 13). La migration des cDC Sirp $\alpha^+$  dans le thymus est un processus dépendant au CCR2 et le recrutement dans le thymus implique plusieurs mécanismes moléculaires notamment des interactions via la P-sélectine et VLA-4 –VCAM-1 (Bonasio et al., 2006). Les souris déficientes en CCR2 ont des quantités de cDCs migratoires réduites dans le thymus qui affecte la sélection négative des LT contre les antigènes circulants. Sur le plan anatomique, ces cellules sont stratégiquement localisées à proximité des petits vaisseaux sanguins ou à l'intérieur des régions périvasculaires pour

capturer les antigènes circulants (Baba et al., 2009). Dans le thymus, ces cellules représentent une source riche d'antigènes périphériques qui contribuent à la délétion clonale des thymocytes auto-réactifs (Bonasio et al., 2006; Hadeiba and Butcher, 2013). Toutefois, le rôle des cDC Sirp $\alpha^+$  dans la tolérance centrale serait associé à la génération des Treg et dans une moindre mesure à la délétion clonale. Une étude in vitro récente faite à partir de culture de thymocytes en présence de différents sous-types de CD thymiques et spléniques, a montré une capacité des cDC Sirp $\alpha^+$  à générer des Treg contrairement aux cDC CD8 $\alpha^+$  et aux pDC (Proietto et al., 2009).

### **2.2.3.3 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes**

Les CD plasmacytoïdes représentent le 3ème type de CD thymiques. Comme les CD migratoires, les pDC accèdent au thymus par la circulation sanguine. Les pDC peuvent être identifiées sur la base de l'expression de CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup> et représentent environ 35% des CD totales détectées dans le thymus (Wu and Shortman, 2005). Les pDC entrent dans le thymus via la jonction cortico-médullaire et nécessite CCR9 (Hadeiba et al., 2012). Par ailleurs, il a été démontré que l'expression de CCR9 favorise également la migration des pDC de l'intestin vers le thymus, suggérant que ces cellules pourraient transporter des antigènes appartenant aux composantes alimentaires ou du microbiote intestinal pour les présenter aux thymocytes en développement (Li et al., 2009).

#### **2.2.4. Les mTEC et les CD dans la présentation autonome versus présentation indirecte pour la sélection négative**

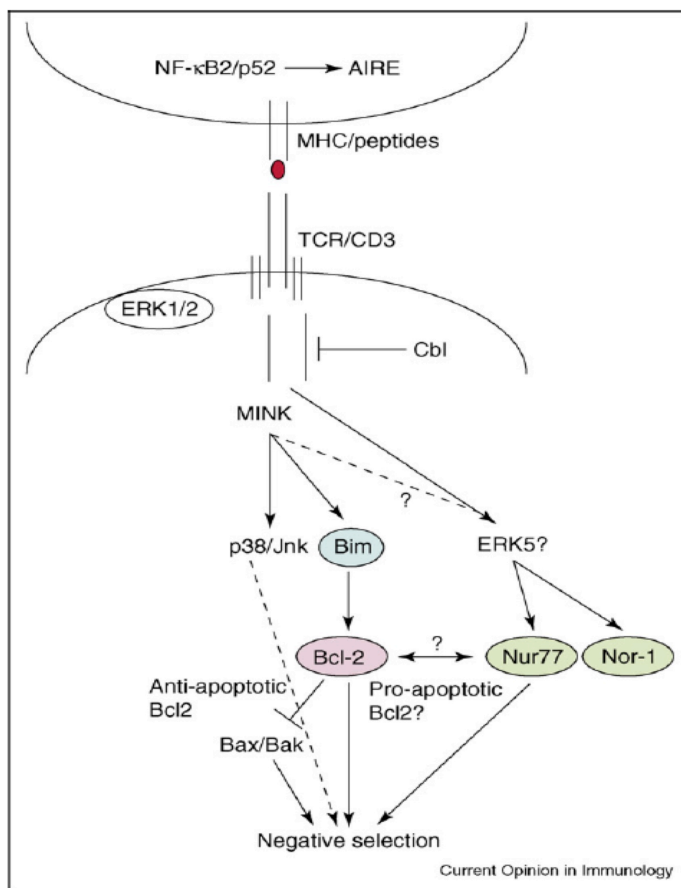
La contribution des CD thymiques et les mTEC dans la présentation des antigènes du soi a fait l'objet de plusieurs études (Klein et al., 2014; Lopes et al., 2015; Oh and Shin, 2015). Par contre, la contribution qualitative des mTEC versus les CD dans la sélection négative demeure encore obscure. Dans l'établissement de la tolérance centrale, la présentation des TRA par les mTEC s'effectue par 2 processus : par une présentation directe/autonome c'est-à-dire par les mTEC elles-mêmes ou par la présentation indirecte. La présentation indirecte implique un transfert des TRA par les mTEC aux CD résidentes localisées à proximité des mTEC (Lopes et al., 2015; Klein et al., 2014). Ce système de transfert des TRA produits par les mTEC vers les CD a fait l'objet de plusieurs travaux (Klein et al., 1998; Gallegos and Bevan, 2004) (Hinterberger et al., 2010; Hubert et al., 2011). Les mTEC représentent une grande source de TRA pour les CD et ont un taux d'apoptose relativement élevé. La libération des fragments apoptotiques par les mTEC serait à l'origine du transfert des auto-antigènes dérivés de mTEC vers des CD (Gray et al., 2007; Lopes et al., 2015). Les CD peuvent de cette façon capturer des portions de membrane des mTEC contenant des complexes peptide du soi-CMH ou acquérir directement le contenu cytosolique des mTEC contenant des TRA (Gallegos and Bevan, 2004; Millet et al., 2008; Koble and Kyewski, 2009; Hubert et al., 2011; Lopes et al., 2015). Suite à l'acquisition de ces complexes par les CD, ceux-ci peuvent être présentés de façon conventionnelle aux LT CD4<sup>+</sup>. Il a été démontré que la présentation des TRA par les CD versus la présentation autonome des TRA par les mTEC entraîne un mode de tolérance différent des LT CD4<sup>+</sup>. En effet la délétion clonale serait plus dépendante des CD alors que la

présentation des TRA par les mTEC serait impliquée de façon prédominante dans la génération des Treg (Aschenbrenner et al., 2007; Hubert et al., 2011).

### **2.2.5. Rôle de la costimulation dans la sélection négative**

Les mTEC et les CD sont caractérisées par leur forte expression de molécules de costimulation telles que CD80, CD86 et CD40, les rendant plus efficaces dans la délétion clonale (Millet et al., 2008; Koble and Kyewski, 2009). Par exemple il a été démontré que lorsque les CD migratoires pénètrent dans le thymus, elles augmentent l'expression des molécules du CMH II ainsi que les molécules de costimulation CD80 et CD86 (Li et al., 2009 13; Hadeiba et al., 2012). De plus, il semble que la costimulation pourrait favoriser l'induction de l'apoptose des LT autoréactifs au cours de la sélection négative (Kishimoto and Sprent, 1999; Li and Page, 2001; Buhlmann et al., 2003; Williams et al., 2014). En effet, il a été démontré que les animaux déficients pour les molécules CD80 et CD86 présentaient une altération de la sélection négative se traduisant par une accumulation des thymocytes SP CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Breed et al., 2019).

## 2.2.6. La signalisation du TCR dans la sélection négative



**Figure 1.8 : Voies de signalisation impliquées dans la sélection négative.**

Lors de la sélection négative, les interactions de TCR à haute affinité avec le complexe peptide du soi -CMH conduisent à une délétion impliquant plusieurs voies intracellulaires : l'activation de ERK5 et de Misshapen-like kinase (MINK). MINK active P38/ JNK. Bim inhibe l'activité Bcl-2 pour permettre à Bax et Bak d'induire la mort cellulaire. ERK5 quant à lui favoriserait l'action de Nur77, protéine pro-apoptotique. *Reprinted with permission from Elsevier: Seminars in Cell & Developmental Biology (Sohn et al., 2007), Copyright © 2007 Elsevier Ltd. License number : 4906620280697*



L'interaction du TCR avec les complexes CMH/peptide du soi présentés par les CD ou les mTEC engendrerait une cascade de messagers intracellulaires essentiels au devenir du thymocyte en développement. La stimulation du TCR induit une signalisation proximale initiée par l'activation de deux tyrosines kinases : LCK et ZAP70. LCK phosphoryle les motifs (ITAM) situés au niveau de la chaîne  $\zeta$  du complexe CD3. Cette phosphorylation permettrait le recrutement et l'activation de ZAP-70 impliquée dans l'activation de deux protéines adaptatrices majeures : LAT et SLP76. LAT et SLP76 activeraient et mobiliserait plusieurs autres protéines en aval, impliquées dans la stimulation du TCR. Il semble que des signaux intracellulaires distincts seraient générés suite à l'engagement du TCR au moment de la sélection positive versus négative (Alberola-Ila et al., 1996; Starr et al., 2003). Alors que la sélection positive impliquerait une activation de Ras qui initie la cascade MAPK qui mène à l'activation Raf1-MEK1/2-ERK1/2, la sélection négative impliquerait l'activation des kinases, JNK, MINK qui induisent l'expression de facteurs pro-apoptotiques notamment le facteur Bim, NUR77 (Figure 1.8) (Alberola-Ila et al., 1995; Alberola-Ila et al., 1996; Werlen et al., 2003; Fischer et al., 2005; Bouillet et al., 2002; Sohn et al., 2007).

Bim et Nur77 sont des protéines induites par la signalisation du TCR de haute affinité et sont considérées comme des facteurs régulateurs clés de la sélection négative (Cho et al., 2003; Hu and Baldwin, 2015). Une mutation de Bim ou de Nur77 entraîne une altération de la délétion des thymocytes autoréactifs (Calnan et al., 1995; Bouillet et al., 2002)

## **2.3. Tolérance centrale : délétion versus différenciation en Treg**

Il est bien connu que la sélection négative n'est pas parfaite et que quelques thymocytes autoréactifs échapperaient à la sélection négative (Anderson et al., 2000a; Yan and Mamula, 2002 ; Enouz et al., 2012). Par conséquent, d'autres mécanismes périphériques ont été décrits afin de maintenir la tolérance au soi dans le compartiment périphérique. Il est bien connu que la fonction des Treg est d'inhiber les réponses auto-immunes et les réponses immunitaires excessives et fatales à l'hôte (Sakaguchi et al., 1995; Sakaguchi et al., 2008). Les Treg peuvent être produits à l'intérieur du thymus ou bien induits en périphérie à partir de cellules CD4 naïves conventionnelles.

### **2.3.1. À la découverte des Treg**

Des études antérieures ont rapporté que la thymectomie néonatale de différentes lignées de souris entraînait des réponses auto-immunes dans divers organes (Nishizuka and Sakakura, 1969; Kojima et al., 1976). Par la suite, Sakaguchi et son groupe ont démontré que l'injection de LT CD4<sup>+</sup> pouvait prévenir le développement de l'auto-immunité chez les souris thymectomisées (Sakaguchi et al., 1982). Ces résultats ont ainsi démontré l'existence d'une population de LT CD4<sup>+</sup> dérivés du thymus qui possédait des propriétés immunosuppressives (Sakaguchi et al., 1982). D'autres études ont démontré que le pouvoir immunosuppressif provenait au sein de la population CD4<sup>+</sup>CD5<sup>high</sup> ou des CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> (Powrie and Mason, 1990; Sakaguchi et al., 1985). En 1995, Sakaguchi a fait une découverte remarquable dans la caractérisation des Treg en identifiant le récepteur CD25 sur les cellules CD4<sup>+</sup> immunosuppressives. En effet, le transfert de LT dépourvus de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> était incapable de prévenir la maladie auto-immune chez les souris athymiques alors que le co-transfert d'une petite quantité de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> prévenait la maladie (Sakaguchi et al., 1995). Cette capacité

suppressives a été également démontrée in vitro à partir de culture de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> activées avec un anticorps anti-CD3 en présence de cellules immunosuppressives CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Les résultats montraient que la présence de cellules immunosuppressives CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> inhibait la prolifération et la production d'IL-2 par les LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Thornton and Shevach, 1998). Il est important de souligner que les travaux initiaux pour caractériser les Treg ont été menés dans des modèles murins et ce n'est qu'en 2001, que les Treg humains ont été identifiés avec des modèles in vitro montrant l'expression du récepteur CD25 et l'importance de l'IL-2 (Ng et al., 2001).

Une étape cruciale dans la caractérisation des Treg fut l'identification de FOXP3, un membre de la famille des facteurs de transcription codé par le chromosome X, devenu marqueur spécifique des Treg. Une anomalie de l'expression ou de la fonction de FOXP3 est associée au développement spontané d'une maladie auto-immune fatale chez la souris Scurffy (Godfrey et al., 1991; Brunkow et al., 2001). Chez l'humain, une mutation FOXP3 est responsable du syndrome IPEX (dysrégulation immunitaire, polyendocrinopathie, entéropathie, liée à l'X), une maladie auto-immune systémique grave (Bennett et al., 2001; d'Hennezel et al., 2009).

La contribution de FOXP3 a été décrite dans le développement et la fonction suppressive des Treg naturels (nTreg) mais également dans l'induction périphérique des Treg (Hori et al., 2003; Fontenot et al., 2003; Ramsdell, 2003; Baecher-Allan et al., 2004). Les Treg se subdivisent en deux sous-groupes : 1) les LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dits « naturels » qui sont générés dans le thymus, 2) Les Treg périphériques (pTreg) qui sont induites à partir de l'activation de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup> naïfs sous l'influence de cytokines comme l'IL-10 et le TGF-β

(Apostolou and von Boehmer, 2004). Ces 2 populations participent au maintien de la tolérance au soi.

### **2.3.2. La différenciation des nTreg**

L'origine thymique des Treg fut identifiée à partir de l'expérience de thymectomie néonatale, dans laquelle le retrait du thymus au jour 3 contrairement au jour 7 post-natal, entraîne le développement spontané d'une maladie auto-immune (Nishizuka and Sakakura, 1969; Asano et al., 1996). Ces résultats ont permis de démontrer la migration des nTreg thymus vers la périphérie après le jour 3 post-natal et leur rôle crucial dans la tolérance au soi (Fontenot et al., 2005). Les Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> représentent environ 4% des CD4<sup>+</sup>SP thymiques (Fontenot et al., 2005; Apostolou and von Boehmer, 2004).

#### **2.3.2.1. Rôle des CD et mTEC dans la différenciation des Treg**

Des travaux ont démontré la contribution essentielle des mTEC dans la sélection des Treg chez les souris transgéniques exprimant un TCR spécifique pour un autoantigène dont l'expression est contrôlée par le promoteur du gène Aire (Aschenbrenner et al., 2007; Hinterberger et al., 2010). L'absence d'expression du CMH II sur les mTEC diminue le nombre de Treg en périphérie (Herbin et al., 2016). Ces observations supportent la contribution essentielle des mTEC pour la différenciation des Treg.

Les CD thymiques sont également importants pour le développement des Treg. Des expériences faites à partir de chimères hématopoïétiques (générées par une greffe de la moelle

osseuse CMH II<sup>-/-</sup> dans des souris WT irradiées) ont démontré une réduction significative des nTreg et l'apparition d'une maladie auto-immune systémique (Proietto et al., 2008b). Dans une autre étude, les auteurs ont montré que les CD CD8<sup>-</sup>Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> capturaient les autoantigènes en périphérie et migraient dans le thymus pour induire les nTreg (Proietto et al., 2009). L'utilisation de souris dépourvues de mTEC et/ou de CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> a aussi permis de démontrer un rôle important des CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dans la production de nTreg (Herbin et al., 2016). Pour les pDC, leur contribution pour développement des nTreg est bien établie chez l'humain (Martin-Gayo et al., 2010). Ainsi l'ensemble de ces études supporte l'existence d'une étroite collaboration entre les CD et les mTEC dans le développement des Treg.

### **2.3.2.2. Spécificité du TCR des Treg**

Les nTreg seraient sélectionnés à partir d'un processus de « déviation clonale » qui oriente la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> autoréactifs en Treg ou bien en d'autres lignées tel que les cellules NKT et les CD8 $\alpha$  IEL. Face à ces différentes orientations, il devenait essentiel d'identifier le ou les facteurs impliqués dans la différenciation des thymocytes potentiellement autoréactifs en Treg.

A ce jour, 2 modèles ont été proposés : le modèle instructif et le modèle sélective / stochastique. Le modèle instructif a trait à la qualité et à la puissance de la signalisation du TCR en réponse à un peptide du soi agoniste. Dans ce modèle, la différenciation des Treg est guidée par la spécificité et l'affinité du TCR pour les complexes peptide du soi-CMH présentés par les mTEC. Les indications selon lesquelles les Treg expriment préférentiellement des TCR dirigés vers des antigènes du soi, proviennent d'études effectuées

sur des souris transgéniques. Dans ces modèles, l'absence d'antigène spécifique au TCR expliquerait l'absence de production de Treg (Itoh et al., 1999). Au contraire, les souris qui expriment à la fois le transgène du TCR et l'antigène reconnue par le TCR produisent des Treg (Jordan et al., 2001; Apostolou et al., 2002; D'Cruz and Klein, 2005; Kawahata et al., 2002; Knoechel et al., 2005). Ainsi la présence du peptide agoniste serait un facteur clé qui détermine l'orientation des Treg. Cependant dans certains modèles transgéniques, malgré la présence de l'antigène en périphérie, les thymocytes subissaient une délétion clonale plutôt qu'une différenciation en Treg (Hsieh et al., 2012). Le consensus actuel repose sur le modèle instructif qui suggère que la différenciation en Treg serait guidée par des interactions TCR-peptides du soi-CMH mais avec une intensité modérée.

Le modèle sélectif/stochastique propose que d'autres signaux seraient intégrés à celui du TCR afin de favoriser une différenciation vers les Treg. Des études ont montré que les thymocytes FOXP3<sup>+</sup> étaient intrinsèquement plus résistants à la délétion clonale et que l'induction de l'expression de FOXP3 était indépendante du signal TCR (van Santen et al., 2004).

Le rôle des cytokines et de la costimulation pourrait être important dans la différenciation des Treg (Tai et al., 2005; Burchill et al., 2008; Lio et al., 2010; Hinterberger et al., 2011). Des cytokines de la famille à chaîne- $\gamma$ , telles que l'IL-2 et l'IL-15 seraient impliqués à différents niveaux dans la différenciation thymique des Treg (Lio and Hsieh, 2008; Burchill et al., 2007; Owen et al., 2018; Apert et al., 2018; Caramalho et al., 2015). Également l'IL-7, une cytokine cruciale pour la thymopoïèse (un point qui sera détaillé dans la section suivante) semblerait être essentielle lors de la différenciation des T reg (Wuest et al., 2008).

### **3. L'IL-7 : Cytokine indispensable pour la thymopoïèse et l'homéostasie des lymphocytes T en périphérie**

#### **3.1. Généralités**

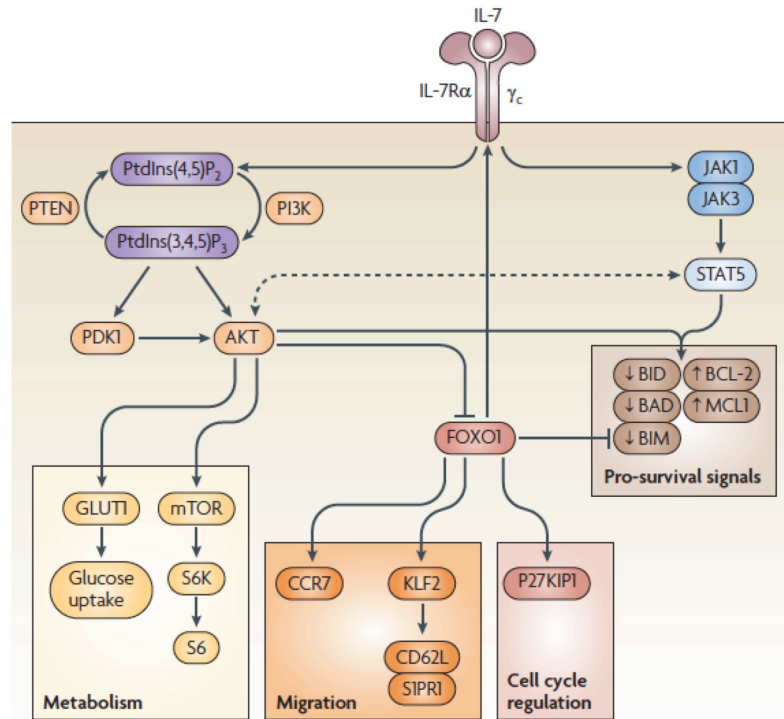
L'IL-7 est une cytokine essentielle pour la lymphopoïèse B et T (von Freeden-Jeffry et al., 1995). L'IL-7 est reconnue comme la cytokine principale pour la thymopoïèse et la survie des LT en périphérie. L'interleukine-7 signale sur les cellules cibles par sa liaison à son récepteur (IL-7R $\alpha$ ) qui est un hétérodimère composé d'une chaîne alpha (CD127) et d'une chaîne gamma ( $\gamma$ c ou CD132) qui est partagée par les récepteurs de l'IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 (Leonard et al., 1995; Fry and Mackall, 2002; Barata et al., 2019). L'IL-7R $\alpha$  est principalement exprimée par les LT et LB matures et leurs progéniteurs, les LT naïfs et LT mémoires, les CD, les NK et les LT<sub>i</sub> (Fry and Mackall, 2002; Mazzucchelli and Durum, 2007; Barata et al., 2019). Le rôle essentiel de l'IL-7 dans la lymphopoïèse et l'homéostasie des LT et LB est très bien illustré par la lymphopénie de LT sévère observée chez les souris déficientes en IL-7 ou IL-7R $\alpha$  (Peschon et al., 1994; von Freeden-Jeffry et al., 1995). Chez l'humain, des anomalies de l'axe IL-7 / IL-7R $\alpha$  induites par une mutation de la chaîne  $\gamma$ c, sont associées à l'immunodéficience combinée sévère (SCID) liée à l'X ou rarement à une mutation du récepteur qui se traduit aussi par un syndrome SCID (Lai et al., 1997; Puel et al., 1998).

Chez l'homme, le gène qui code pour l'IL-7 s'étend sur 72 kb et se situe au niveau du chromosome 8q12-13, il code pour une protéine de 177 acides aminés ayant un poids moléculaire de 20 kDa. Chez la souris, le gène de l'IL-7 se situe sur le chromosome 3 et code pour une protéine de 154 acides aminés avec un poids moléculaire de 18 kDa (Jiang et al.,

2005). Depuis la découverte de l'IL-7, différentes techniques ont été utilisées pour caractériser les cellules qui produisent de l'IL-7. Sachant que l'ARNm et la protéine de l'IL-7 sont exprimés à des niveaux très faibles, la quantification et la caractérisation des potentielles sources n'étaient pas très exhaustives. L'utilisation de souris transgénique avec un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène IL-7 a permis de mettre en lumière les cellules qui produisent de l'IL-7 (Alves et al., 2009; Mazzucchelli et al., 2009; Repass et al., 2009) (Shalapour et al., 2010; Hara et al., 2012). Plusieurs de ces travaux ont confirmé que la source principale d'IL-7 était d'origine non-hématopoïétique et majoritairement produite par les cellules stromales de divers organes (Fry and Mackall, 2005). Une source d'IL-7 d'origine hématopoïétique a été rapportée par d'autres études, notamment par les CD (Sorg et al., 1998; Zubkova et al., 2005; Guimond et al., 2009). Au niveau de la moelle osseuse, les cellules stromales représentent une grande source d'IL-7 (Mazzucchelli et al., 2009). Au niveau de la périphérie, dans les ganglions lymphatiques, une expression de l'IL-7 est bien caractérisée au niveau des cellules réticulaires fibroblastiques de la zone T (FRC) soutenant l'homéostasie des LT (Link et al., 2007). Dans l'intestin, il a été montré que ce sont les cellules épithéliales intestinales (IEC) qui produisent de l'IL-7, une source impliquée dans la régulation du système immunitaire mucoale notamment dans le développement et l'homéostasie des  $LT\gamma\delta^+$  et des lymphocytes intraépithéliaux (IEL) (Laky et al., 2000; Watanabe et al., 1995). L'IL-7 serait également exprimée par les kératinocytes épidermiques ainsi que dans le foie (Matsue et al., 1993; Hara et al., 2012). Au niveau du thymus, l'expression de l'IL-7 est détectée dans les TEC et dans les cellules mésenchymateuses (Watanabe et al., 1992; Hara et al., 2012).



### 3.2. Signalisation de l'IL-7



**Figure 1.9 : Voies de signalisation de l'IL-7.**

La liaison de l'IL-7 sur son récepteur IL-7Rα induit différentes voies de signalisation qui soutiennent l'homéostasie des lymphocytes T en favorisant la survie, migration, régulation du cycle cellulaire et le métabolisme. *Reprinted with permission from Springer Nature: Nature Reviews Immunology (Takada and Jameson, 2009a), Copyright © 1969, Springer Nature. License number : 4906620984586*

L'IL-7 signale sur les cellules cibles via sa liaison à l'IL-7Rα et le récepteur γc qui est commun à plusieurs cytokines. La liaison de l'IL-7 sur l'IL-7Rα, induit une hétérodimérisation avec la chaîne γ (Fry and Mackall, 2005; Jiang et al., 2005). L'hétérodimérisation entraîne l'association de la partie intramembranaire du récepteur avec les protéines kinases Jak1 et

Jak3 qui subissent une phosphorylation (Witthuhn et al., 1994). Deux voies de signalisation de l'IL-7 ont été décrites : la voie Jak-Stat et la voie phosphoinositide 3 kinase (PI3K-AKT). L'activation de JAK1 et JAK3 entraîne la phosphorylation et la translocation nucléaire de STAT5 afin d'induire l'expression de gènes cibles impliqués dans la survie et la prolifération des LT. STAT5 régule l'expression de protéines anti-apoptotiques tel que Bcl-2 et Bcl-XL alors que l'induction de MCL-1 par STAT5 inhibe l'action de facteurs pro-apoptotiques tel que Bim et Bid. L'IL-7 peut également activer la voie de signalisation de PI3K (Swainson et al., 2007). Une molécule effectrice clé intervenant suite à l'activation de la PI3K est l'AKT, une kinase impliquée en amont de diverses voies de signalisation contrôlant la survie, la migration et le métabolisme cellulaire des LT. L'action d'AKT sur le métabolisme implique la voie Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) qui régule le récepteur du glucose Glut1 et favorise l'absorption du glucose essentiel au maintien du développement et de l'homéostasie des LT (Wofford et al., 2008; MacIver et al., 2013)

L'activation d'AKT est aussi impliquée dans la migration cellulaire via la phosphorylation de FOXO1, une protéine impliquée dans l'expression/répression de CCR7 et CD62L (Kerdiles et al., 2009). Par conséquent, suite à sa phosphorylation, FOXO1 devient inactive et la perte de l'expression de CCR7 et CD62L réduit l'accessibilité des LT aux organes lymphoïdes secondaires.

AKT peut également réduire l'apoptose des LT en phosphorylant et inactivant la protéine pro-apoptotique Bad. Dans des conditions physiologiques normales, les taux systémiques d'IL-7 sont bas puisque l'IL-7 est consommée par les LT. En situation de lymphopénie, les niveaux d'IL-7 augmentent significativement en réponse à l'absence de LT.

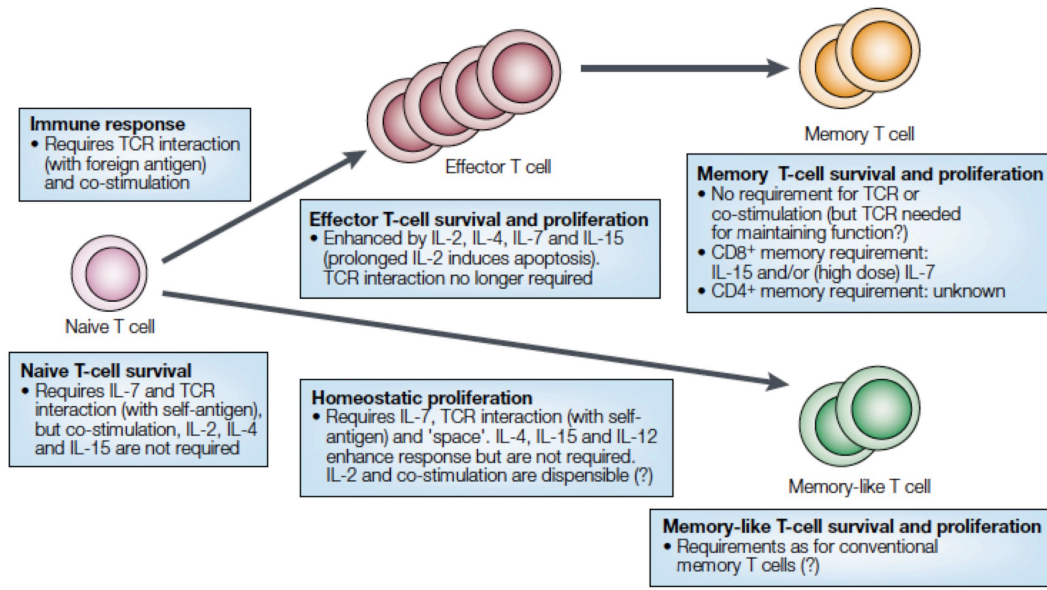
### **3.3. Rôle de l'IL-7 dans le thymus**

Dans le thymus, l'IL-7R $\alpha$  est exprimé à différents stades de la thymopoïèse. L'IL-7R $\alpha$  est exprimé fortement sur les thymocytes DN2 et DN3 et permet la survie des DN3 après la sélection beta (von Freeden-Jeffry et al., 1997). L'IL-7 demeure importante pour la transition des thymocytes DN vers DP. Au cours de la phase initiale du stade DP l'expression de l'IL-7R $\alpha$  est réprimée ce qui coïncide avec la sélection positive, un stade pendant lequel une majorité des thymocytes entrent en apoptose (Hong et al., 2012). Après la sélection positive, les thymocytes réexpriment l'IL-7R $\alpha$  où l'IL-7 serait requise non seulement pour la survie mais également pour la différenciation en simple positif CD4 vs CD8 (Brugnera et al., 2000; Yu et al., 2003; Singer et al., 2008). Les SP CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> expriment fortement l'IL-7R $\alpha$  et l'IL-7 favorise leur survie et leur prolifération homéostatique. A leur sortie du thymus, les thymocytes sont appelés « recent thymic emigrant » et expriment des niveaux élevés d'IL-7R $\alpha$ . En périphérie, l'IL-7 constitue la principale cytokine qui régule la survie et la prolifération homéostatique des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.

## **4. Homéostasie des lymphocytes T**

Chez l'humain et la souris, la taille et la diversité du répertoire des LT sont maintenues tout au long de la vie des individus. Après la sélection thymique, les SP CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> matures se retrouvent en périphérie, ces LT sont identifiés comme étant des LT naïfs dans la mesure où ils n'ont pas encore reconnu un antigène spécifique. L'exposition et la reconnaissance à l'antigène spécifique vont induire l'activation des LT initialement naïfs et la différenciation en LT effecteurs nécessaires à l'élimination du pathogène. Une petite fraction des LT persiste

indéfiniment en tant que des LT mémoires. Différents marqueurs permettent de distinguer des cellules naïves ( $CD62L^+CD44^-CD45RB^+$ ) des cellules activées ( $CD44^+CD62L^-CD45RB^-$ ) et des cellules effectrices ( $CD44^+CD62L^+$ ) (Tough and Sprent, 1994). En condition normale, les LT naïfs prolifèrent très peu et les niveaux physiologiques d'IL-7 en combinaison avec une stimulation suboptimale du TCR permettent de maintenir l'homéostasie des LT (Figure 1.10). Suite à une déplétion des LT, l'accessibilité pour les molécules du CMH I et II et les niveaux systémiques d'IL-7 augmentent considérablement, ce qui favorise la prolifération des LT  $CD4^+$  et  $CD8^+$ . Cette prolifération exagérée a pour but de rétablir le nombre de LT à des niveaux normaux. Ainsi, malgré le rôle essentiel du thymus pour générer un large répertoire de LT, des mécanismes homéostatiques périphériques sont en place afin d'assurer le maintien constant du nombre de LT ou de rétablir l'homéostasie lymphocytaire après un épisode lymphopénique. Avec l'âge et l'involution thymique qui survient relativement tôt chez l'humain, les mécanismes périphériques deviennent essentiels afin de d'assurer le maintien de l'homéostasie lymphocytaire.



**Figure 1.10 : Facteurs qui influencent l'homéostasie des lymphocytes T.**

IL, interleukine; TCR, récepteur des lymphocytes T. *Reprinted with permission from Springer Nature: Nature Reviews Immunology (Takada and Jameson, 2009a), Copyright © 2002, Springer Nature. License number: 4906630714584*

## 4.1. Les lymphocytes T naïfs

En périphérie, l'homéostasie des LT naïfs requiert une stimulation suboptimale constante du TCR par les complexes peptide du soi - CMH ainsi que l'IL-7 (**Figure 1.10**) (Tan et al., 2001; Surh and Sprent, 2008). Des études ont démontré une altération de la survie des LT CD4<sup>+</sup> matures chez les animaux dépourvus de molécules CMH de classe II (Takeda et al., 1996) (Kirberg et al., 1997; Rooke et al., 1997). Des résultats similaires ont aussi été obtenus pour les LT CD8<sup>+</sup> chez les souris receveuses CMH I<sup>-/-</sup> (Tanchot et al., 1997; Nestic and Vukmanovic, 1998; Takada and Jameson, 2009b), ce qui démontre clairement le rôle important de la stimulation du TCR par les molécules du CMH pour la survie et le maintien

des LT naïfs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en périphérie. D'autres études ont utilisé des LT transgéniques avec un TCR inductible par la tétracycline pour démontrer l'importance de la stimulation du TCR pour la survie et le maintien des LT naïfs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Labrecque et al., 2001; Seddon and Zamoyska, 2002b). Alors que la molécule du CMH II est largement retrouvée sur les CPA, l'expression de la molécule du CMH I est ubiquitaire. Des études effectuées dans notre laboratoire ont montré que les CD étaient essentiels pour la prolifération homéostatique des LT CD4<sup>+</sup> (Gauthier et al., 2015). Pour les LT CD8<sup>+</sup>, nos études indiquent que les CD seraient suffisantes mais non essentielles pour supporter la prolifération homéostatique de ces cellules (Gauthier et al., 2019)

L'IL-7 est aussi un facteur essentiel pour les LT naïfs. En effet, le transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> se traduit par une disparition rapide de ces cellules lorsqu'elles sont transférées dans des souris receveuses IL-7<sup>-/-</sup> (Surh and Sprent, 2005). L'ensemble de ces évidences démontre l'importance de la stimulation du TCR et de la signalisation de l'IL-7 pour le maintien et la survie des LT naïfs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.

## **4.2. Les lymphocytes T mémoires**

Des différences pour les facteurs homéostatiques qui régulent les LT mémoires CD4<sup>+</sup> versus LT CD8<sup>+</sup> ont été décrites. La stimulation du TCR serait importante pour les LT CD4<sup>+</sup> mémoires alors qu'elle serait non essentielle pour les LT mémoires CD8<sup>+</sup> (De Riva et al., 2007 ; Murali-Krishna et al., 1999; Lau et al., 1994). Malgré tout, d'autres études suggèrent que les LT CD4<sup>+</sup> pourraient survivre en absence de stimulation du TCR et que l'IL-7 serait suffisant pour leur homéostasie (Seddon et al., 2003). Pour les LT mémoires CD8<sup>+</sup>, l'IL-15

serait le facteur prédominant qui régule l'homéostasie de ces cellules (Zhang et al., 1998; Lodolce et al., 1998; Kennedy et al., 2000). Malgré tout, il semble que l'IL-7 pourrait aussi affecter la survie des cellules mémoires mais à un niveau beaucoup moins important que l'IL-15 (Schluns et al., 2000; Schluns and Lefrançois, 2003). Le modèle proposé pour l'homéostasie des LT mémoires CD8<sup>+</sup> serait que l'IL-15 est essentiel alors que l'IL-7 ne serait pas essentiel mais suffisant pour maintenir les LT mémoires (Tan et al., 2002; Kieper et al., 2002)

### **4.3 Lymphopénie et PH : un terrain fertile pour l'auto-immunité**

La reconstitution des LT après une lymphopénie peut s'effectuer via la thymopoïèse ou la prolifération homéostatique (PH) des LT matures (Mackall et al., 1996; Mackall et al., 1995). Dans la majorité des cas cliniques de lymphopénie, la thymopoïèse n'est pas une option à cause de l'âge du patient et/ou des traitements de chimiothérapie qui affectent considérablement le thymus (Mackall et al., 1995; Mackall et al., 1997). Dans ce contexte, la reconstitution immunitaire s'effectue de façon prédominante via la PH. La PH implique une prolifération exagérée des LT qui répondent aux antigènes du soi et aux niveaux élevés d'IL-7 (Ernst et al., 1999; Kieper et al., 2005; Schluns et al., 2000; Tan et al., 2001). L'absence de LT pour consommer l'IL-7 favorise l'accumulation de cette cytokine. Pour des raisons encore largement inconnues, la lymphopénie pourrait prédisposer aux maladies auto-immunes et l'abondance des ressources homéostatiques pourrait être en cause dans ce phénomène (Gleeson et al., 1996; King et al., 2004; Krupica et al., 2006; Merayo-Chalico et al., 2016). Dans un équilibre physiologique normal, bien que l'homéostasie des LT met en jeu des interactions continues avec les antigènes du soi, la compétition pour l'accès aux ressources

homéostatiques inhibe la PH des LT. Chez les individus non-lymphopéniques, les LT survivent mais ne prolifèrent pas.

## **5. Les Treg dans la tolérance périphérique**

### **5.1. Les nTreg versus les iTreg**

Les Treg occupent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie, le contrôle de la réponse immunitaire et la prévention des maladies auto-immunes, telles que le diabète de type (DT1), la polyarthrite rhumatoïde (PR), la sclérose en plaque (SEP) (Sakaguchi et al., 2012; Coombes et al., 2005; Sakaguchi et al., 2001). Alors que les nTreg sont sélectionnés dans le thymus en réponse aux antigènes du soi. Les Treg inductibles (iTreg) sont générés en périphérie à partir de LT CD4<sup>+</sup> matures (Apostolou and von Boehmer, 2004; Curotto de Lafaille et al., 2004). Cette différenciation des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels en iTreg, survient après une stimulation antigénique en périphérie en présence d'une combinaison de cytokines spécifiques incluant du TGF- $\beta$  et de l'IL-2 (Chen et al., 2003; Apostolou and von Boehmer, 2004; Fantini et al., 2004; Rubtsov and Rudensky, 2007; Zheng, Wang et al. 2007). Par ailleurs, il a été démontré que l'acide rétinoïque favoriserait l'induction de Treg en périphérie (Coombes et al., 2007; Xiao et al., 2008).

Sur le plan fonctionnel, des travaux ont évalué la contribution des sous-types de Treg dans le contrôle de la réponse immunitaire. Pour la colite inflammatoire, une synergie entre les iTreg et les nTreg a été démontrée (Haribhai et al., 2009). Chez la souris Foxp3<sup>-/-</sup>, les nTreg peuvent prévenir la mort de la souris mais demeurent insuffisant pour prévenir l'inflammation chronique qui nécessite l'ajout de iTreg (Haribhai et al., 2011). Ces observations soutiennent

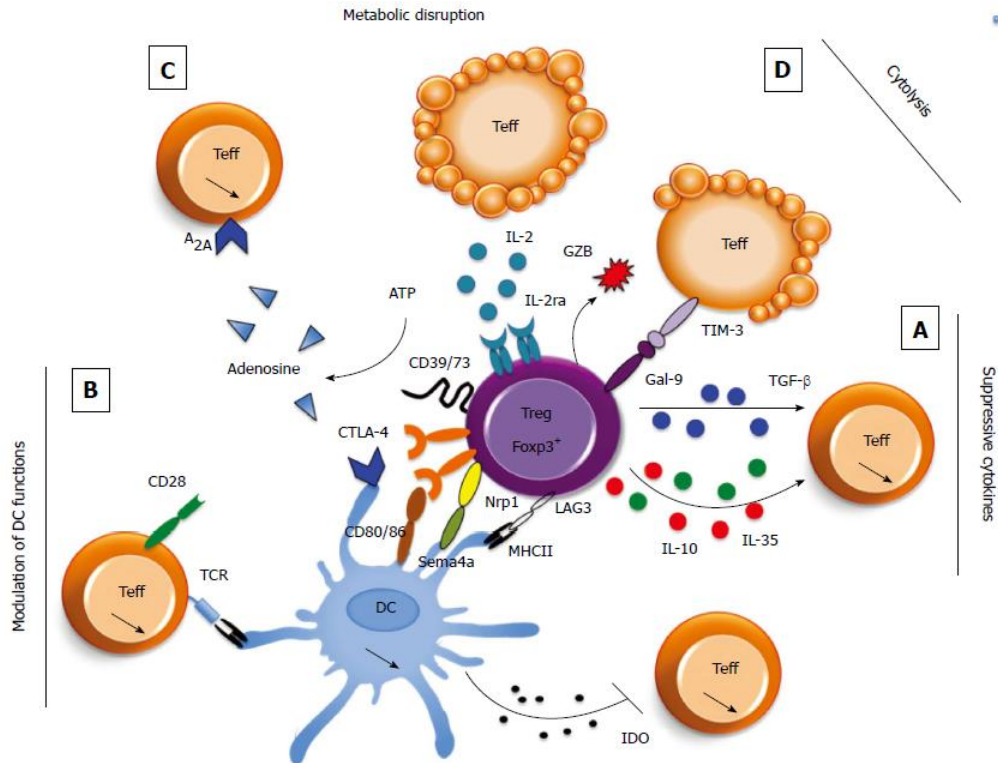


un modèle où les nTreg et iTreg auraient une certaine complémentarité dans leur action. Dans ce contexte, les nTreg contrôlèrent la tolérance aux autoantigènes, puisqu'ils possèdent des TCR qui reconnaissent le soi d'une certaine affinité alors que les iTreg contrôlèrent la réponse aux antigènes étrangers dérivés du microbiote commensal, du régime alimentaire et de divers agents pathogènes.

De nombreuses investigations en quête de marqueurs de Treg plus spécifiques ont permis de caractériser l'expression de divers marqueurs. Les nTreg et iTreg partagent une signature moléculaire et phénotypique similaire, notamment une forte expression de FOXP3, des molécules costimulatrices / coinhibitrices (CD28, CTLA-4, LAG-3, ICOS et PD-1, etc.), des récepteurs de la famille des récepteurs du TNF tels que, GITR, OX40. En revanche, les marqueurs Helios et Nrp1 (Neuropilin-1) seraient exprimés de façon plus importante chez les nTreg (Haribhai et al., 2009; Thornton et al., 2010; Weiss et al., 2012; Yadav et al., 2012). Par contre, l'expression différentielle d'Helios et de Nrp1 demeure controversée puisqu'Helios est aussi exprimé par les LT activés (Akimova et al., 2011; Singh et al., 2015). Cependant la majorité des thymocytes CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> expriment constitutivement des niveaux élevés de Helios et de Nrp-1 (Weiss et al., 2012). Finalement, une population de iTreg n'exprimant ni Hélios ni Nrp-1 exercerait un contrôle de la réponse immunitaire des LB via des interactions PD1/PD-L1 (Gotot et al., 2018). Ainsi les marqueurs pour distinguer les nTreg des iTreg restent à ce jour encore très controversés.

## 5.2. Mécanismes suppressifs des Treg

La fonction suppressive des Treg implique quatre grands mécanismes : la libération de cytokines inhibitrices, la cytolysse, une perturbation métabolique et l'inhibition de la fonction et de la maturation des CD. (Figure 1.11)



**Figure 1.11 : Effets immunosuppresseurs des lymphocytes T régulateurs.**

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) contrôlent le développement des réponses immunitaires via quatre principaux mécanismes (a) Inhibition par sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10, le TGF-bêta et l'IL-35. (b) Inhibition de la maturation et la fonction des CD via les interactions CTLA-4, Nrp-1 et LAG-3 exprimés par les Treg avec des molécules exprimées par les APC (c) Perturbation métabolique des LT effecteurs par la privation de l'IL-2. Les Treg expriment des ectoenzymes CD39 et CD73 qui catabolisent la production extracellulaire d'adénosine ce qui induit l'activation du récepteur A2A de l'adénosine inhibant la fonction des LT effecteurs. (d) Destruction des LT effecteurs par la production de granzyme B ou via l'interaction entre Gal-9 exprimé par les Tregs et Tim-3 exprimée par les LT effecteurs. Tiré de Pedros et al., 2016

Les Treg secrètent des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10, le TGF- $\beta$  et l'IL-35. La sécrétion d'IL-10 par les Treg inhibe la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (telles que l'IL-6 et IL-2) et l'expression du CMH II par les CD, empêchant ainsi la présentation antigénique. La sécrétion d'IL-10 par les Treg est essentielle au contrôle de la réponse inflammatoire intestinale. Une déficience en IL-10 aggrave la colite inflammatoire (Asseman et al., 1999; Uhlig et al., 2006). La sécrétion d'IL-35 intervient dans l'induction des Treg à partir des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels, tout en inhibant la prolifération des LT (Collison et al., 2010).

Un des mécanismes suppresseurs utilisé par les Treg est la cytolyse qui supprime la réponse immunitaire via la destruction des LT effecteurs suite à un contact cellule-cellule. Au cours de l'interaction Treg/LT effecteurs, il y a exocytose de granzymes et de perforines libérés par les Treg dans le milieu extracellulaire des LT effecteurs (Gondek et al., 2005; Cao et al., 2007). Les Treg peuvent également réduire l'accessibilité à l'IL-2 des LT effecteurs via leur forte expression de CD25 qui favorise une consommation excessive d'IL-2 locale, ce qui réduirait considérablement l'expansion clonale du LT activé (Pandiyani et al., 2007). La production d'adénosine par les Treg abolirait la fonction effectrice des LT via l'activation du récepteur A2A de l'adénosine. L'activation du récepteur A2A favoriserait la génération des iTreg en inhibant l'expression d'IL-6 tout en favorisant la production de TGF- $\beta$ .

Les Treg pourraient aussi interférer avec la maturation des CD via une liaison entre CTLA-4 exprimé par les Treg au complexe CD80 / 86 exprimés par les APC. Des études ont démontré une altération de la fonction suppressive des T reg déficients en CTLA-4 (Wing et al., 2008; Tai et al., 2012). Le CTLA-4 exprimé par les Treg compétitionnerait avec le CD28 exprimé par

les LT effecteurs, ce qui aurait un effet négatif sur la réponse immunitaire. Aussi, la liaison de CTLA-4 à CD80 / CD86 pourrait induire l'expression de l'indoleamine 2,3-dioxygénase par les CD et affecter leur pouvoir stimulateur de la réponse immunitaire.

L'expression de LAG-3 par les Treg affecterait aussi la maturation et la fonction des CD. LAG-3 est capable de lier les molécules du CMH de classe II des CD immatures, ce qui aurait pour effet de réduire la maturation des CD et leur capacité à stimuler les LT (Huang et al., 2004; Liang et al., 2008).

Les Treg pourraient également affecter la fonction des CD, via une expression élevée de LFA-1 sur les Treg ce qui favoriserait une forte adhésion des Treg aux CD et cette adhésion modifierait le cytosquelette des CD, limitant ainsi les contacts CD/ LT conventionnels (Chen et al., 2017). Récemment il a été démontré que les Treg peuvent induire une suppression de la réponse des LT conventionnels suite à une déplétion du complexe CMH-peptide exprimé au niveau des CD (Akkaya et al., 2019).

Dans l'ensemble, les Treg utilisent divers mécanismes pour contrôler ou inhiber les réactions immunitaires pathologiques. Dans cette fonctionnalité aussi, une suractivation des Treg peut également empêcher une réponse immunitaire adaptée contre certains agents pathogènes ou certaines tumeurs.

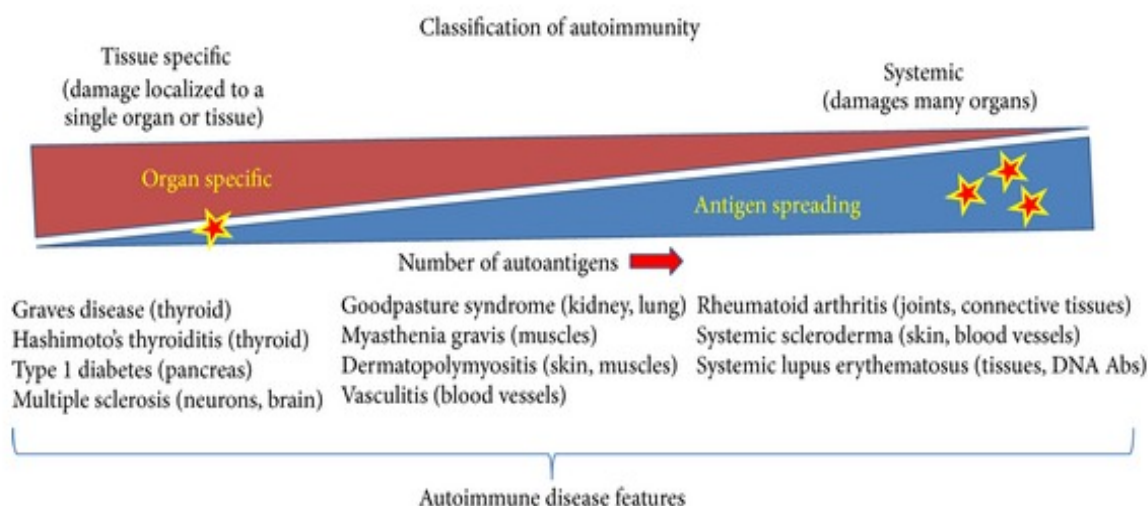
## **6. Auto-immunité : rupture des mécanismes de la tolérance du système immunitaire et perturbation de l'homéostasie des lymphocytes T**

### **6.1. Généralités**

Les mécanismes de tolérance centrale et périphérique sont présents pour contrôler la réponse immunitaire des LT et la rupture de l'un de ces mécanismes conduit à l'auto-immunité. L'auto-immunité est une réponse immunitaire aberrante des LT et des LB autoréactifs. Les maladies auto-immunes ont une prévalence allant de 7 à 9 % dans la population, avec une prévalence plus élevée chez la femme que chez l'homme causant une morbidité et une mortalité considérable (Theofilopoulos et al., 2017). Les maladies auto-immunes sont classées en deux catégories : les maladies spécifiques à un organe et les maladies auto-immunes systémiques ou disséminées (Figure 1.12). Les maladies spécifiques d'organe impliquent une réponse autoréactive contre un autoantigène localisé dans un organe spécifique. Par exemple le diabète de type 1 (DT1) qui se caractérise par une infiltration de lymphocytes dans les îlots de Langerhans dans le pancréas, provoquant une destruction des cellules  $\beta$  productrices d'insuline (Foulis, 1987; Atkinson et al., 2014). Aussi, la SEP qui se manifeste suite à une réponse immunitaire dirigée contre les autoantigènes du système nerveux central (SNC) (Herold et al., 2013; Wootla et al., 2012).

Les maladies auto-immunes systémiques sont associées à l'activation des cellules immunitaires suite à une reconnaissance inappropriée d'autoantigènes spécifiques ou répartis dans divers tissus à l'origine d'une inflammation causant des lésions multi-tissulaires. Un exemple de maladie auto-immune systémique très étudiée dans la littérature est le SLE (lupus érythémateux systémique) qui est une maladie auto-immune qui touche plusieurs organes,

notamment la peau, les articulations, le système nerveux central et les reins (Doria et al., 2006). Les mécanismes initiateurs des maladies auto-immunes sont encore loin d'être bien définis, cependant il est connu que des facteurs génétiques, environnementaux, des agents infectieux et/ou des microorganismes commensaux seraient impliqués dans la pathogenèse de ces maladies.



**Figure 1.12 : Maladies auto-immunes systémiques et spécifiques à un organe.**

Plusieurs maladies auto-immunes spécifiques à divers organes (à gauche). Les maladies auto-immunes provenant de plusieurs organes (au centre) et les maladies auto-immunes systémiques sont indiquées (à droite) tiré de Mbongue, Nicholas et al. 2014.

## 6.2. Les lymphocytes T dans l'auto-immunité

Il est généralement admis que les LT autoréactifs jouent un rôle central dans l'initiation et la progression de plusieurs maladies auto-immunes dont les dommages tissulaires peuvent être

médiés par les LT auxiliaires CD4<sup>+</sup> et/ou les LT cytotoxiques CD8<sup>+</sup>. Toutefois dans la quasi-totalité des manifestations auto-immunes, les LT CD4<sup>+</sup> sont fortement impliqués.

### **6.2.1. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans l'auto-immunité**

Les LT CD8<sup>+</sup>, également appelés lymphocytes T cytotoxiques (CTL), sont un sous-type de LT, qui contrôlent les infections, le processus tumoral, l'autoréactivité par la production robuste IFN- $\gamma$  et des mécanismes cytolytiques : perforine / granzymes ou FAS/FASL. Plusieurs recherches ont montré que les LT CD8<sup>+</sup>, sont également impliqués dans diverses maladies auto-immunes, notamment dans le DT1, il est souvent observé une infiltration massive de LT CD8<sup>+</sup> dans le pancréas ainsi que des clones de LT CD8<sup>+</sup> autoréactifs circulants ayant la même spécificité antigénique que les LT CD8<sup>+</sup> qui s'infiltrent dans le pancréas (Jorns et al., 2005; Willcox et al., 2009)

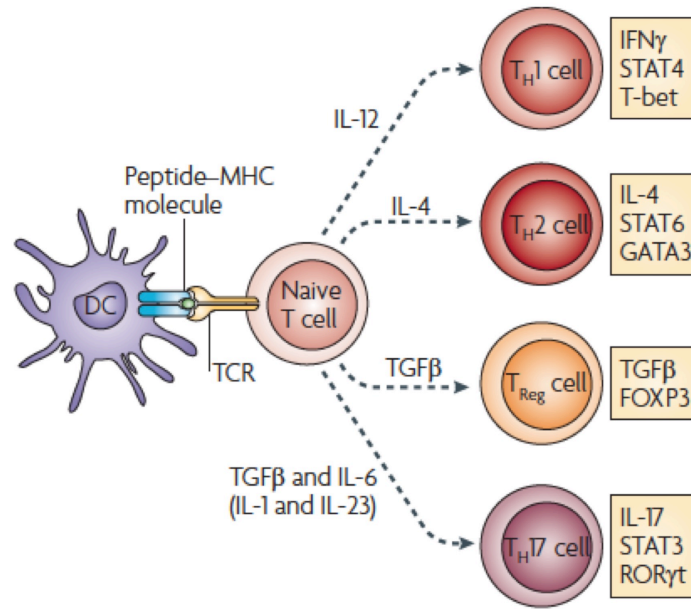
Dans la SEP, plusieurs groupes ont identifié une accumulation de LT CD8<sup>+</sup> avec un phénotype activé / mémoire dans le tissu du système nerveux central (SNC) et le liquide céphalorachidien (LCR) ainsi que des clones circulants dans le sang de patients atteints de SEP provoquant une inflammation et des dommages du SNC (Jacobsen et al., 2002; Skulina et al., 2004; Friese and Fugger, 2009; Huseby et al., 2012). Dans la polyarthrite rhumatoïde (PR), les LT CD8<sup>+</sup> font partie des LT s'infiltrant dans la membrane synoviale (Raposo et al., 2010). Chez les patients atteints de la myasthenie de Grave, une augmentation des LT CD8<sup>+</sup> a été observée (Yi et al., 2014). Dans le contexte de la colite inflammatoire et la maladie de Crohn, les LT CD8<sup>+</sup> ont été caractérisés dans l'induction des lésions intestinales via leur fonction cytolytique contre les cellules épithéliales (Nancey et al., 2006; Boschetti et al., 2016). Le rôle néfaste des LT CD8<sup>+</sup> observé dans les maladies auto-immunes est d'autant plus démontré par plusieurs

groupes qui ont rapporté un effet bénéfique de la déplétion des LT CD8<sup>+</sup> avec des anticorps monoclonaux qui semblent réduire la gravité et inverser la progression de certaines maladies auto-immunes (Reynolds et al., 2002; Raposo et al., 2010).

### **6.2.2. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans l'auto-immunité**

Dans l'immunité adaptative, les LT CD4<sup>+</sup> occupent un rôle crucial par leur régulation à la fois de la réponse immunitaire cellulaire cytotoxique et par la production d'anticorps dépendants des LB. L'activation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs induit une différenciation en LT effecteurs auxiliaires (Th) et en LT mémoires. Cette différenciation des LT CD4<sup>+</sup> est sous l'influence de plusieurs facteurs incluant les interactions avec les CPA, la nature de la stimulation antigénique, la signalisation des cytokines et les molécules costimulatrices. Les LT CD4<sup>+</sup> engagés peuvent se différencier en cellules Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, Tfh et Treg (Bettelli et al., 2007; Mosmann and Coffman, 1989; Zhou et al., 2009 ; Zou and Restifo, 2010). Le déséquilibre de la différenciation et/ou de l'activité des LT auxiliaires CD4<sup>+</sup>, joue un rôle essentiel dans le développement de maladies auto-immunes.





**Figure 1.13 : Différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs en périphérie.**

La différenciation de chaque sous-type de T helper (TH) ou Treg est guidée par une combinaison de cytokines et de facteurs de transcription spécifique : TH1: (IL-12/ T-bet), TH2 : (IL-4 /GATA-3), TH17 : (IL-17/ ROR $\gamma$ t), Treg : ((TGF $\beta$ , IL6/ Foxp3). *Reprinted with permission from Springer Nature: Nature Reviews Immunology (Zou and Restifo, 2010), Copyright © 1969, Springer Nature, Springer Nature. License number: 4906651276234*

### 6.2.2.1. Les lymphocytes T CD4+ de type Th1

Les cellules Th1 sont induites en réponse à des agents pathogènes, tels que des infections virales, et sont caractérisées par la production et la libération d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), l'IL-2, la lymphotoxine et le TNF- $\alpha$ . Les cellules Th1 sont principalement impliquées dans l'élimination des agents pathogènes intracellulaires.

La différenciation des cellules Th1 est initiée par l'IFN- $\gamma$  qui induit l'activation du (STAT1), ce qui entraîne la transcription du gène codant pour T-bet : facteur de transcription spécifique de Th1(Hsieh et al., 1993; Szabo et al., 2000). T-bet stimule directement la transcription de

l'IFN- $\gamma$  ainsi que de l'IL12RB2. La signalisation de l'IL12RB2 par l'IL-12 induit la phosphorylation de STAT-4 qui coopère avec T-bet pour activer le gène IFN- $\gamma$ , ce qui amplifie la production d'IFN- $\gamma$  et favorise l'engagement vers le phénotype Th1 (Yang et al., 1999; Jager and Kuchroo, 2010). La production d'IFN- $\gamma$  par les Th1 favorise au niveau du site d'inflammation, la différenciation et l'activation des macrophages M1 et l'expression des molécules du CMH permettant ainsi une présentation antigénique accrue et une production massive des cytokines pro-inflammatoires.

Un rôle central des cellules Th1 a été démontré dans les lésions tissulaires de nombreuses maladies auto-immunes. Dans la PR, le profil des cytokines observées dans la membrane synoviale, est de type Th1 (Dolhain et al., 1996). Dans le contexte de la SEP, des cytokines spécifiques associées aux cellules Th1 telle que l'IFN- $\gamma$ , sont présentes dans les lésions inflammatoires du SNC chez l'humain ainsi que dans le modèle de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), qui est un modèle murin de la SEP (Traugott and Lebon, 1988). Il a été montré dans le modèle de l'EAE, qu'il est possible de récapituler la maladie à partir d'un transfert adoptif de cellules CD4<sup>+</sup> Th1 spécifiques à la myéline dans des receveurs syngéniques sains (Yura et al., 2001; Lovett-Racke et al., 2011). Chez les personnes atteintes de maladie de Crohn ainsi que dans des modèles murins de colite inflammatoire, les cellules Th1 sembleraient être directement associées à la maladie (Li et al., 2017; Powrie et al., 1994)

#### **6.2.2.2. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th2**

Les cellules de type Th2 sont principalement impliquées dans la réponse immunitaire humorale et aident les LB à produire des anticorps. Les Th2 produisent des cytokines comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10, l'IL-13 et le TNF- $\alpha$ .

La différenciation des Th2 est induite par l'IL-4 et régie par le facteur de transcription spécifique Th2 : GATA-3 (Le Gros et al., 1990). L'engagement du récepteur de l'IL-4 conduit à la phosphorylation de STAT-6 qui se lie au promoteur de l'IL-4 pour induire la production d'IL-4, établissant ainsi une boucle de rétroaction positive pour augmenter la différenciation de Th2.

La réponse de type Th2 est bien caractérisée dans les maladies auto-immunes telles que le SLE et le syndrome de Sjögren (SS) en soutenant les LB autoréactifs dans la production accrue d'autoanticorps.

### **6.2.2.3. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th17**

Les CD4<sup>+</sup> se différencient en Th17 sous l'influence du TGF- $\beta$  et de l'IL-6 (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006) et représentent une grande source d'IL-17 (Park et al., 2005; Harrington et al., 2005; Veldhoen et al., 2006).

La différenciation des Th17 est initiée par l'activation de LT naïfs en présence d'IL-6 et le TGF- $\beta$ . Ces cytokines activent respectivement les facteurs de transcription Smads et STAT3 via l'expression du facteur de transcription ROR- $\gamma$ t, ce qui favorise la transcription des gènes codant pour l'IL-17 et permet ainsi la production de la cytokine IL-17 (Ivanov et al., 2006). L'activation de STAT3 est médiée par l'IL-6 et augmente l'expression de l'IL-23R, favorisant ainsi la polarisation des Th17. L'IL-23 vient stabiliser le phénotype Th17 et favorise aussi l'expansion. L'IL-21 est également induite massivement par les Th17 en développement et agit de manière autocrine sur les cellules Th17 pour augmenter leur pool. Les Th17 sont décrits comme des médiateurs importants de lésions tissulaires observées dans différents types

de maladies auto-immunes (Yasuda et al., 2019). Une expression dérégulée de l'IL-17 a été caractérisée dans plusieurs maladies auto-immunes comme la SEP et l'EAE, la PR, le SLE, le psoriasis, et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la colite (Chabaud et al., 1999; Wong et al., 2000; Lock et al., 2002; Komiyama et al., 2006). Chez l'homme et la souris, l'intestin est un site principal où résident les cellules Th17 ou elles assurent une protection contre les infections bactériennes et fongiques. Dans certaines des pathologies inflammatoires chroniques, ces cellules peuvent grandement s'accumuler dans l'intestin (Ivanov et al., 2009; Ouyang et al., 2008).

## Hypothèses et objectifs

L'IL-7 et les cellules dendritiques occupent un rôle concomitant et non redondant dans le développement et l'homéostasie des LT. La dérégulation de l'axe IL7/IL7R $\alpha$  est fortement associée à des déficits sévères des LT, tant au niveau de leur développement qu'au niveau de leur homéostasie. Également, une anomalie qualitative et quantitative des CD, entraîne un défaut dans le développement et l'homéostasie des LT. L'IL-7 est une cytokine qui est produite majoritairement par des cellules non hématopoïétiques, mais elle est également produite par les CD. Selon le contexte/environnement physiologique ou physiopathologique, il semblerait que la réponse et le destin d'un LT face à l'IL-7 seraient différents. Dans ces travaux, nous évaluons la contribution des CD et de l'axe IL7/IL7R $\alpha$  dans la biologie des LT: dans deux approches thérapeutiques différentes.

1/ Chez les patients LMC, traités par l'imatinib, une lymphopénie des LT est bien connue. Dans ce contexte, l'imatinib pourrait-il interférer avec la signalisation de l'IL-7 dans les LT sains.

2/ Dans un contexte de reconstitution des LT après greffe de MO, quel serait le rôle de l'IL7 produite par les CD ?

Face à ces interrogations, nous émettons l'hypothèse que :

**La dérégulation de l'homéostasie lymphocytaire T résulte d'une dysfonction des cellules dendritiques et/ou de la production ou la signalisation de l'axe IL-7-IL-7R $\alpha$ .**

Les objectifs de cette thèse consistent à :

- 1- Évaluer, l'effet de l'imatinib au niveau de l'axe IL-7/IL7R $\alpha$  pour l'homéostasie des lymphocytes T chez les patients atteints de LMC et traités avec de l'imatinib.
- 2- Évaluer le rôle de l'IL-7 produite par les cellules dendritiques dans le développement et l'homéostasie des lymphocytes T dans un modèle murin où la production d'IL-7 d'origine hématopoïétique est abolie.

## **CHAPITRE 2 : Article 1**

### **Imatinib mesylate inhibits STAT5 phosphorylation in response to IL-7 and promotes T cell lymphopenia in chronic myelogenous leukemia patients**

S Thiant, MM Moutuou, P Laflamme, R Sidi Boumedine, DM Leboeuf, L Busque, J Roy and M Guimond

## **Imatinib mesylate inhibits STAT5 phosphorylation in response to IL-7 and promotes T cell lymphopenia in chronic myelogenous leukemia patients.**

Stephanie Thiant\*<sup>1,2</sup>, Moutuaata M. Moutuou\*<sup>1,2</sup>, Philippe Laflamme <sup>1,2</sup>, Radia Sidi Boumedine<sup>1</sup>, Dominique M. Leboeuf<sup>3</sup>, Jean Roy<sup>1,3</sup>, Martin Guimond <sup>1,2</sup>.

\* Co-first authors

<sup>1</sup>Division d'Hématologie-Oncologie, Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont ; <sup>2</sup>Département de Microbiologie, infectiologie and Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Canada. <sup>3</sup>Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada.

Running Title: Imatinib interferes with IL-7 signaling and stat5 phosphorylation in T cells.

Key points:

- Imatinib disrupts T cell homeostasis through the inhibition of IL-7 and STAT5 phosphorylation.
- Imatinib attenuates cytokine signaling in different clinical settings of immune dysfunctions.



Corresponding Author: Martin Guimond, 5415 Boulevard de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada H1T 2M4. Phone: (514) 252-3400 (7624), Fax: (514) 252-3430, email: martin.guimond@umontreal.ca.

New contact information: Dominique M. Leboeuf, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia.

Statement of Author contribution:

S.T. Designed experiments, analyzed data, performed flow cytometric analysis of DCs and T cells, performed statistical analysis, wrote the manuscript.

M.M.M. Performed IL-7 and TCR signaling assays. Developed the in vivo mouse model.

P.L. Performed flow cytometric analysis of DCs.

R.S.B. Study DC in CML patients.

D.L. Provided scientific expertise in IL-7 and TCR signaling, edited the manuscript.

J.R. Provided scientific expertise in CML, stem cell transplant and edited the manuscript.

M.G. Designed the study, analyzed the data, and wrote the paper; all authors reviewed the paper and agree with its content.

Abstract word counts: 192

Manuscript word counts: 1381

## RESUME

Il a été démontré que le traitement par le mésylate d'imatinib (IM) induit une diminution du nombre de lymphocytes T (LT) chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) et une interférence de l'IM avec la signalisation des récepteurs des lymphocytes T (TCR) a été mentionnée pour expliquer cette observation. Cependant, la signalisation de l'IL-7 et du TCR sont toutes deux essentielles pour la survie des lymphocytes. L'objectif de cette étude était de déterminer si l'IM interfère avec la signalisation de l'IL-7 ou du TCR pour expliquer la diminution du nombre de LT chez les patients. Au moment du diagnostic, les patients atteints de LMC ont généralement dans le sang, des taux de CD4<sup>+</sup> réduits alors que les taux de CD8<sup>+</sup> sont normaux voir même augmentés chez certains patients. Après l'initiation du traitement par l'IM, le nombre de LT CD4<sup>+</sup> a encore diminué et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ont considérablement diminués. Des études in vitro ont confirmé l'interférence de l'IM avec la signalisation du TCR via l'inhibition de la phosphorylation de ERK ainsi qu'une inhibition de la signalisation de l'IL-7 et de la phosphorylation de STAT5 (STAT5-p). Dans un modèle de souris in vivo, nous avons démontré que l'IM altérait la survie des LT par l'inhibition de l'IL-7 et STAT5-p alors que la signalisation du TCR reste inchangée au cours de la thérapie par l'IM. Ainsi, les effets inhibiteurs de l'IM sur l'IL-7 et la phosphorylation de STAT5 expliquent comment la lymphopénie en LT est générée chez les patients traités par IM.

## **ABSTRACT**

Imatinib mesylate (IM) therapy has been shown to induce lower T cell counts in chronic myelogenous leukemia (CML) patients and an interference of IM with T cell receptor (TCR) signaling has been invoked to explain this observation. However, IL-7 and TCR signaling are both essential for lymphocyte survival. This study was undertaken to determine whether IM interferes with IL-7 or TCR signaling to explain lower T cell counts in patients. At diagnosis, CML patients have typically lower CD4<sup>+</sup> counts in their blood, yet CD8<sup>+</sup> counts are normal or even increased in some. Following the initiation of IM treatment, CD4<sup>+</sup> counts were further diminished and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were dramatically decreased. In vitro studies confirmed IM interference with TCR signaling through the inhibition of ERK phosphorylation and we showed a similar effect on IL-7 signaling and STAT5 phosphorylation (STAT5-p). Importantly however, using an in vivo mouse model, we demonstrated that IM impaired T cell survival through the inhibition of IL-7 and STAT5-p but not TCR signaling which remained unaffected during IM therapy. Thus, off-target inhibitory effects of IM on IL-7 and STAT5-p explain how T cell lymphopenia occurs in patients treated with IM.

## INTRODUCTION

Imatinib mesylate (IM) is currently the drug of choice for first line therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia (CML). Despite the relatively high specificity of IM treatment towards the BCR-ABL fusion protein, off-target multikinase inhibitory effects occur and can interfere with normal hematopoiesis (1, 2). For instance, non-specific inhibition of Flt3L has been associated with disruption of dendritic cell (DC) homeostasis and functions in both mice and humans (3). In addition, studies have reported an interference of IM with T cell counts and activation (4). T lymphocytes require T cell receptor (TCR) stimulation by MHC-I or MHC-II and IL-7 signaling in order to survive and persist in the periphery. While TCR signaling induces the phosphorylation and activation of AKT by the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), IL-7 signaling induces the phosphorylation of STAT5 (STAT5-p) by Jak1-3 protein kinases; these pathways constitute potential targets for IM (5, 6). Despite ample evidence that IM can inhibit TCR signaling in vitro, the precise mechanism of action of IM on T cell homeostasis has remained inconclusive in vivo. The present studies were undertaken to precise the impact of IM on TCR or IL-7 inhibition in order to explain T cell lymphopenia in CML patients.

## MATERIALS AND METHODS

### *Clinical samples*

Healthy donors (n=25), CML patients at diagnosis (n=22) and patients treated with IM (n=10) were recruited. Patients treated with IM received between 200 and 600 mg/day. The median time of IM treatment was 2.9 years (range: 0.5–10.9) and the median time of remission post-IM was 1.1 years (range: 0.3–3). Blood samples were obtained under protocols approved by the HMR Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all patients and healthy donors.

### *Flow cytometry analyses*

The percentage and absolute counts of naive CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T lymphocytes; (CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), central memory; (CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) and effector memory (TEM); (CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) were determined by flow cytometry. FITC-CD3, Pacific Blue-CD4, APCcy7-CD8, APC-CCR7, PEcy7-CD45RA were used to evaluate naive and memory T cells (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). PE-CD56 was used to evaluate NK cells (BD Biosciences). Non-specific binding was determined using isotypic controls. Flow cytometry acquisition was performed on LSRII and analysis with Flowjo software (Treestar, Ashland, OR, USA)(7). The percentages and absolute T-cell counts were calculated based on lymphocytes and monocytes gating.

### ***IL-7 and TCR signaling***

PBMCs from normal subjects were cultured at  $2 \times 10^6$  cells/ml in RPMI+10% FCS and incubated with IM (3  $\mu$ mol/ml) at 37 °C for 24 h.<sup>8</sup> For STAT5 phosphorylation, cells were washed and incubated in serum-free medium for 1 h before stimulation with rhIL-7 (Cytheris) for 30 min at 37 °C. After fixation and permeabilization in Perm-Buffer III (BD Biosciences) (9), cells were stained for STAT-5p (PE-STAT5, clone pY694, BD Biosciences) and cell surface receptors. For ERK phosphorylation (PE-ERK1-2, T202/pY204, BD Biosciences) following anti-CD3 stimulation (OKT3; BioXCell, West Lebanon, NH, USA), cells were serum starved for 1 h, incubated with 1 mg/ml of anti-CD3 for 15 min and then cross-linked with anti-mouse immunoglobulin-G (Sigma, Oakville, ON, Canada) at 5 mg/ml for 15 min. Intracellular staining was performed as described above.

### ***Mouse studies***

All experiments were approved by the Animal Ethic Committee of the HMR. For adoptive transfer of T cells into Rag<sup>-/-</sup> mice (CD45.2<sup>+</sup>),  $1 \times 10^6$  of enriched lymph node T cells (CD45.1<sup>+</sup>) were labeled with cell trace violet (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and adoptively transferred through the tail vein.<sup>7</sup> Mice were treated by gavage with IM 100 mg/kg twice a day for 7 days. Cell trace violet content was analyzed in CD45.1<sup>+</sup> T cells by flow cytometry.

### *Statistical analysis*

Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) was used for statistical analysis. The Mann Whitney U test was used to compare paired data, whereas the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post-test was used to compare three or more groups.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Lymphopenia has been reported in CML patients under IM therapy,<sup>10</sup> and T cells were evaluated before and after IM treatment. At diagnosis, CML patients have lower naive and memory CD4<sup>+</sup> T cells, while CD8<sup>+</sup> counts were not diminished. Following IM treatment, CD4<sup>+</sup> counts remained diminished and naive and memory CD8<sup>+</sup> T cells were much lower (Figures 1a–c). We confirmed an effect of IM with TCR signaling (4), by showing the inhibition of ERK-1/2 phosphorylation in response to suboptimal TCR simulation in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells exposed to 3  $\mu$ M of IM (Figure 1d). As IL-7 is essential for naive and memory T cell survival (9, 11). we evaluated IM effect on STAT5-p in response to IL-7 stimulation in T cells. While 0.5 and 1 ng/ml of IL-7 are sufficient for inducing STAT5-p in T cells, much higher concentrations of IL-7 are required when these cells are exposed to 3  $\mu$ M of IM (Figure 1e). Thus, in addition to TCR stimulation, our in vitro studies confirm that IM can interfere with IL-7 signaling and STAT5-p in T cells. While lower systemic IL-7 concentrations induce survival through Stat5-p and BCL-2 synthesis (12, 13), higher concentrations of IL-7 signal through PI3K and synergize with TCR signaling to induce homeostatic proliferation of T cells (14, 15). We therefore used lymphopenic Rag<sup>-/-</sup> mice to

evaluate the *in vivo* effect of IM on survival and homeostatic proliferation of adoptively transferred T lymphocytes (Figure 2a). After 7 days of IM treatment, lymphocyte counts were much lower, indicating a potential defect in survival and/or homeostatic proliferation of transferred T cells (Figure 2b). Importantly, IM treatment did not reduce homeostatic proliferation of T cells, thus confirming that TCR signaling remains functional during IM treatment and supporting a model wherein the loss of T cells is predominantly mediated through the inhibition of IL-7 signaling and STAT5-p (Figure 2d). Previous studies have invoked a potential role for TCR inhibition by IM to explain diminished delayed type hypersensitivity in mice (16). However, we showed herein that IM induces DC depletion in humans and mice, and this could contribute to limit delayed type hypersensitivity development (Figures 2c and e) (17, 18). Furthermore, IL-7 can act as an adjuvant to facilitate T cell activation and the inhibition of IL-7 signaling could probably impair delayed type hypersensitivity response (19, 20). Finally, while the inhibition of TCR signaling by IM could perhaps explain lower naive CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and memory CD4<sup>+</sup> T cell counts, it does not explain lower memory CD8<sup>+</sup> counts, as these cells do not require TCR stimulation for their peripheral maintenance (21). Thus, despite conclusive *in vitro* evidences showing an interference of IM with TCR signaling (4, 16, 22), our *in vivo* data are more consistent with an effect of IM on STAT5 to explain lower T cell counts. STAT5 is required for the signaling of other cytokines and it is possible that the effect of IM on T cells is not entirely restricted to IL-7 signaling (23). Additional studies are needed in order to understand the full spectrum of cytokines signaling inhibited by IM.

In conclusion, this study has several potential clinical implications. First, lymphopenia occurs in most CML patients following IM treatment. The use of IL-7 therapy could perhaps improve



T cell counts in patients at higher risk of infections such as those receiving IM for persistent disease after allogeneic stem cell transplant (24). Second, although promising results were initially obtained for the treatment of steroid refractory chronic graft-versus-host disease, <50% of patients respond to IM therapy and its use has not been widely accepted in the transplant community (25, 26). IL-7 can facilitate T cell activation but once activated, IL-7 receptor is down-modulated; this could limit the IM effect on T cells involved in chronic graft-versus-host disease and explain the disappointing results observed clinically. Third, in acute lymphoblastic leukemia, IL-7 can contribute to the survival of acute lymphoblastic leukemia cells and it is not excluded that part of IM effectiveness in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia cells may be related to the inhibition of IL-7 signaling and stat5p (27, 28). However, the benefit of IM in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia patients who do not undergo allogeneic transplant is often of a short duration, and rises in systemic IL-7 that typically occurs during lymphopenia may reduce the effectiveness of IM at blocking stat5p (Figure 1e) (9). In contrast, decrease in systemic IL-7 occurs following allogeneic stem cell transplantation despite profound lymphopenia, and IM treatment can still successfully prevent relapse in most patients (7, 30, 31). Whether IL-7 can induce IM resistance after allogeneic transplant remains unknown. Nonetheless, the finding that IL-7-stat5p can be inhibited by IM provides a novel perspective on IM treatment that should be further studied in future clinical trials.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Dr. Denis-Claude Roy for providing clinical samples, Mrs. Chantal Baron and Marylène Corriveau for their help with patient samples processing. We also thank Dr. Janos Filep for review of the manuscript.

Conflict of interest disclosure

The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Ruchatz H, Puttini M, Cleris L, Pilotti S, Gambacorti-Passerini C, Formelli F. Effect of imatinib on haematopoietic recovery following idarubicin exposure. *Leukemia* 2003 Feb; **17**(2): 298-304.
2. Chand M, Thakuri M, Keung YK. Imatinib mesylate associated with delayed hematopoietic recovery after concomitant chemotherapy. *Leukemia* 2004 Apr; **18**(4): 886-887; author reply 887-888.
3. Taieb J, Maruyama K, Borg C, Terme M, Zitvogel L. Imatinib mesylate impairs Flt3L-mediated dendritic cell expansion and antitumor effects in vivo. *Blood* 2004 Mar 1; **103**(5): 1966-1967; author reply 1967.
4. Seggewiss R, Lore K, Greiner E, Magnusson MK, Price DA, Douek DC, *et al.* Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner. *Blood* 2005 Mar 15; **105**(6): 2473-2479.
5. Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, Tsang M, Cao X, *et al.* Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 1993 Dec 17; **262**(5141): 1877-1880.
6. Suzuki K, Nakajima H, Saito Y, Saito T, Leonard WJ, Iwamoto I. Janus kinase 3 (Jak3) is essential for common cytokine receptor gamma chain (gamma(c))-dependent signaling: comparative analysis of gamma(c), Jak3, and gamma(c) and Jak3 double-deficient mice. *Int Immunol* 2000 Feb; **12**(2): 123-132.
7. Gauthier SD, Leboeuf D, Manuguerra-Gagne R, Gaboury L, Guimond M. Stromal-Derived Factor-1alpha and Interleukin-7 Treatment Improves Homeostatic Proliferation of Naive CD4(+) T Cells after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015 Oct; **21**(10): 1721-1731.
8. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T, *et al.* Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 2008 Apr 15; **111**(8): 4022-4028.
9. Hennion-Tscheltzoff O, Leboeuf D, Gauthier SD, Dupuis M, Assouline B, Gregoire A, *et al.* TCR triggering modulates the responsiveness and homeostatic proliferation of CD4+ thymic emigrants to IL-7 therapy. *Blood* 2013 Jun 6; **121**(23): 4684-4693.

10. Legros L, Ebran N, Stebe E, Rousselot P, Rea D, Cassuto JP, *et al.* Imatinib sensitizes T-cell lymphocytes from chronic myeloid leukemia patients to FasL-induced cell death: a brief communication. *J Immunother* 2012 Feb-Mar; **35**(2): 154-158.
11. Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, *et al.* IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jul 17; **98**(15): 8732-8737.
12. Jiang Q, Benbernou N, Chertov O, Khaled AR, Wooters J, Durum SK. IL-7 induces tyrosine phosphorylation of clathrin heavy chain. *Cell Signal* 2004 Feb; **16**(2): 281-286.
13. Kittipatarin C, Li WQ, Bulavin DV, Durum SK, Khaled AR. Cell cycling through Cdc25A: transducer of cytokine proliferative signals. *Cell Cycle* 2006 May; **5**(9): 907-912.
14. Barata JT, Silva A, Brandao JG, Nadler LM, Cardoso AA, Boussiotis VA. Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med* 2004 Sep 6; **200**(5): 659-669.
15. Swainson L, Kinet S, Mongellaz C, Sourisseau M, Henriques T, Taylor N. IL-7-induced proliferation of recent thymic emigrants requires activation of the PI3K pathway. *Blood* 2007 Feb 1; **109**(3): 1034-1042.
16. Dietz AB, Souan L, Knutson GJ, Bulur PA, Litzow MR, Vuk-Pavlovic S. Imatinib mesylate inhibits T-cell proliferation in vitro and delayed-type hypersensitivity in vivo. *Blood* 2004 Aug 15; **104**(4): 1094-1099.
17. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, *et al.* In vivo depletion of CD11c<sup>+</sup> dendritic cells abrogates priming of CD8<sup>+</sup> T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 2002 Aug; **17**(2): 211-220.
18. Kim HJ, Barajas B, Chan RC, Nel AE. Glutathione depletion inhibits dendritic cell maturation and delayed-type hypersensitivity: implications for systemic disease and immunosenescence. *J Allergy Clin Immunol* 2007 May; **119**(5): 1225-1233.
19. Fry TJ, Christensen BL, Komschlies KL, Gress RE, Mackall CL. Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts. *Blood* 2001 Mar 15; **97**(6): 1525-1533.

20. Melchionda F, Fry TJ, Milliron MJ, McKirdy MA, Tagaya Y, Mackall CL. Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool. *J Clin Invest* 2005 May; **115**(5): 1177-1187.
21. Murali-Krishna K, Lau LL, Sambhara S, Lemonnier F, Altman J, Ahmed R. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 1999 Nov 12; **286**(5443): 1377-1381.
22. Cwynarski K, Laylor R, Macchiarulo E, Goldman J, Lombardi G, Melo JV, *et al.* Imatinib inhibits the activation and proliferation of normal T lymphocytes in vitro. *Leukemia* 2004 Aug; **18**(8): 1332-1339.
23. Leonard WJ, Shores EW, Love PE. Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunol Rev* 1995 Dec; **148**: 97-114.
24. Rosenberg SA, Sportes C, Ahmadzadeh M, Fry TJ, Ngo LT, Schwarz SL, *et al.* IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. *J Immunother* 2006 May-Jun; **29**(3): 313-319.
25. Olivieri A, Cimminiello M, Corradini P, Mordini N, Fedele R, Selleri C, *et al.* Long-term outcome and prospective validation of NIH response criteria in 39 patients receiving imatinib for steroid-refractory chronic GVHD. *Blood* 2013 Dec 12; **122**(25): 4111-4118.
26. de Masson A, Bouaziz JD, Peffault de Latour R, Wittnebel S, Ribaud P, Rubio MT, *et al.* Limited efficacy and tolerance of imatinib mesylate in steroid-refractory sclerodermatous chronic GVHD. *Blood* 2012 Dec 13; **120**(25): 5089-5090.
27. Williams RT, den Besten W, Sherr CJ. Cytokine-dependent imatinib resistance in mouse BCR-ABL+, Arf-null lymphoblastic leukemia. *Genes Dev* 2007 Sep 15; **21**(18): 2283-2287.
28. Chalandon Y, Thomas X, Hayette S, Cayuela JM, Abbal C, Huguet F, *et al.* Randomized study of reduced-intensity chemotherapy combined with imatinib in adults with Ph-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015 Jun 11; **125**(24): 3711-3719.
29. Fry TJ, Connick E, Falloon J, Lederman MM, Liewehr DJ, Spritzler J, *et al.* A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood* 2001 May 15; **97**(10): 2983-2990.
30. Thiant S, Yakoub-Agha I, Magro L, Trauet J, Coiteux V, Jouet JP, *et al.* Plasma levels of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative BMT are predictive biomarkers of both acute GVHD and relapse. *Bone Marrow Transplant* 2010 Oct; **45**(10): 1546-1552.

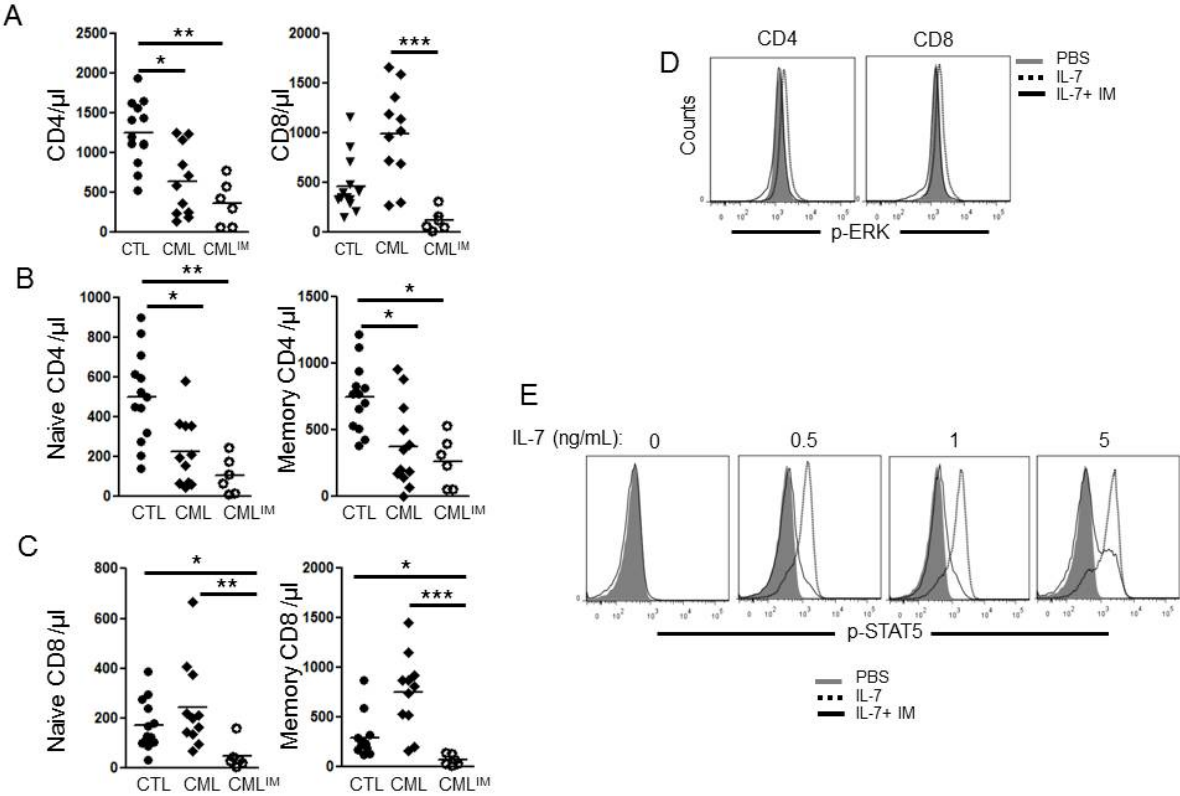
31. Thiant S, Moutuou MM, Leboeuf D, Guimond M. Homeostatic cytokines in immune reconstitution and graft-versus-host disease. *Cytokine* 2016 Jun; **82**: 24-32.

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1.** (a) Graphical summary of the absolute number (cells/ $\mu$ L) of CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells enumerated in the blood of age match controls (n=12), CML at diagnosis (n=11) and CML patients treated by TKI (n=6). (a-c) Absolute counts of naïve (CCR7<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells) and memory (CCR7<sup>+</sup>CD45<sup>RA</sup><sup>neg</sup>, CCR7<sup>neg</sup>CD45<sup>RA</sup><sup>neg</sup> and CCR7<sup>neg</sup>CD45<sup>RA</sup><sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Differences between groups were assessed by Kruskal-Wallis U test (Dunns post-test). \*p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\*p<0.001. (d) Evaluation of ERK phosphorylation in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells incubated with 3 $\mu$ M IM and then exposed to anti-CD3 stimulation. Results are representative of 2 independent experiments. (e) Evaluation of STAT5 phosphorylation in T cells incubated overnight with IM 3 $\mu$ M and then exposed to varying concentrations of rhIL-7 (ng/mL). Results are representative of 3 independent experiments.

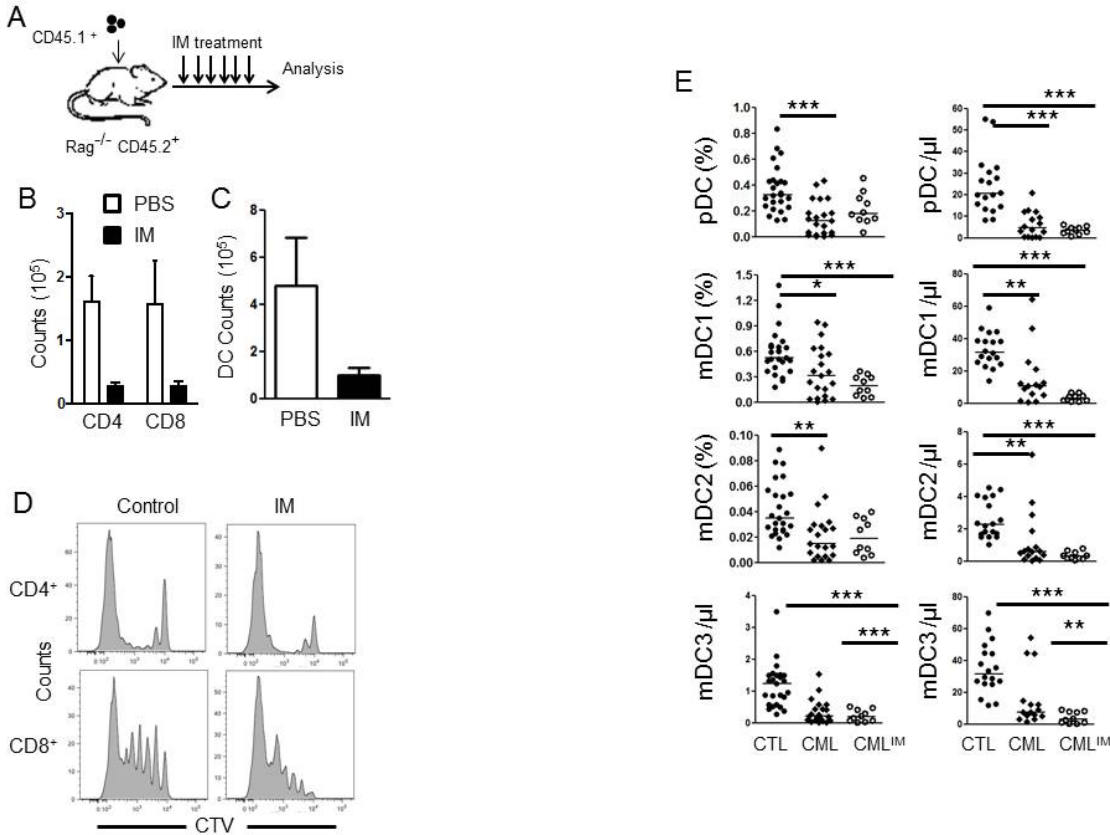
**Figure 2.** (a) Schematic representation of the in vivo mouse model to evaluate IM effect on T cells. (b) Absolute numbers of congenic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells recovered in IM treated mice. (c) Absolute numbers of CD11c<sup>+</sup> DCs after 7 days of IM treatment. (d) CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell proliferation 7 days after transfer into lymphopenic recipients treated or not with IM. Data are representative of 2 independent experiments, 4 mice per group. (e) Graphical summary of the median percentage (left) and absolute counts (right) of pDC (HLADR<sup>+</sup>CD14<sup>neg</sup>CD303<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>), mDC1 (HLADR<sup>+</sup>CD14<sup>neg</sup>CD11chiCD1c<sup>+</sup>), mDC2 (HLADR<sup>+</sup>CD14<sup>neg</sup>CD11c<sup>+</sup>CD141chi), mDC3 (HLADR<sup>+</sup>CD14<sup>neg</sup>CD11chiCD16<sup>+</sup>) in the blood of healthy subjects (n=25), CML at diagnosis (n=22), and CML patients treated by IM (n=10). Differences between groups were assessed by Kruskal-Wallis U test (Dunns post-test). \*p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\*p<0.001.

**Figure 1**





**Figure 2**



## **CHAPITRE 3: Article 2**

### **Fatal autoimmunity develops in RAG-knockout mice transplanted with IL-7<sup>-/-</sup> hematopoietic stem cell**

Moutuaata M Moutuou<sup>1,2</sup>, Stephanie Thiant<sup>1</sup>, Tony Petrella<sup>1</sup>, Dominique Leboeuf<sup>1</sup>, and Martin Guimond<sup>1,2</sup>.

Cet article sera soumis en 2021

## **Fatal autoimmunity develops in RAG-knockout mice transplanted with IL-7<sup>-/-</sup> hematopoietic stem cells.**

Moutuaata M Moutuou<sup>1,2</sup>, Stéphanie Thiant<sup>1</sup>, Tony Petrella<sup>1</sup>, Dominique Leboeuf<sup>1</sup>, and Martin Guimond<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Maisonneuve-Rosemont Research Center, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada <sup>2</sup>Department de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada.

### **Corresponding author:**

Dr. Martin Guimond,

Assistant Professor,

Department of Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada.

Department d'Hématologie-Oncologie, Hopital Maisonneuve-Rosemont

5415, Boulevard de l'Assomption, Montréal, H1T 2M4

E-mail: [martin.guimond@umontreal.ca](mailto:martin.guimond@umontreal.ca)

**Key words: IL-7, lymphopenia, thymus, autoimmunity, CD4, lymphocytes,**

## RESUME

L'interleukine-7 est produite principalement par les cellules stromales et en faible quantité par les cellules dendritiques. Dans ce travail, nous avons montré que des souris Rag<sup>-/-</sup> transplantées avec des cellules de moelle osseuse IL-7<sup>-/-</sup> développaient une auto-immunité excessive et mouraient au jour +35 après la greffe de cellules souches. En revanche, les souris WT transplantées avec des cellules de moelle osseuse IL-7<sup>-/-</sup> restent saines. La maladie est médiée par les cellules T CD4<sup>+</sup> et non par des cellules T CD8<sup>+</sup> et peut être transférée à des souris Rag<sup>-/-</sup> et non pas à d'autres souris lymphopéniques à moins qu'elles aient un fond Rag<sup>-/-</sup>. La physiopathologie a révélé une colite sévère avec infiltration massive de cellules T auto-immunes Th1 / Th17 CD4<sup>+</sup> dans l'intestin. L'analyse du thymus post-SCT n'a pas révélé de différence dans la reconstitution des cellules épithéliales thymiques ni dans les cellules dendritiques thymiques. De même, les Treg sont fonctionnels in vitro et in vivo lors de transfert adoptif à des souris Rag<sup>-/-</sup>. À notre connaissance, il s'agit des premiers travaux montrant un rôle de l'IL-7 produite par les cellules hématopoïétiques dans la thymopoïèse et dans la sélection négative.



## ABSTRACT

Interleukin-7 is produced mainly by stromal cells and to a lesser extent by dendritic cells. Here we showed that Rag<sup>-/-</sup> mice transplanted with IL-7<sup>-/-</sup> bone marrow cells developed excessive inflammation and autoimmunity and die by day +35 post-stem cell transplantation. In contrast, WT mice transplanted with IL-7<sup>-/-</sup> bone marrow cells remain healthy. The disease is mediated by CD4<sup>+</sup> but not by CD8<sup>+</sup> T cells and can be transferred to Rag<sup>-/-</sup> mice but not to other lymphopenic mice unless they have a Rag<sup>-/-</sup> background. Physiopathology revealed a severe colitis with massive infiltration of the gut by autoimmune Th1/Th17 CD4<sup>+</sup> T cells. Evaluation of the thymus post-SCT did not reveal difference for the recovery of the thymic medulla and thymic dendritic cells. Similarly, Tregs were functional and upon adoptive transfer to Rag<sup>-/-</sup> mice, they prevented the disease. To our knowledge, this is the first report showing a role-played hematopoietic cells-derived IL-7 during thymopoiesis and negative selection.

## INTRODUCTION

Interleukin-7 is a critical cytokine essential for thymopoiesis and peripheral T-cell homeostasis [1-4]. IL-7 belongs to the common cytokine receptor gamma chain ( $\gamma_c$ ) family and signals through the IL-7 receptor alpha (IL-7Ra) and the common  $\gamma_c$  chains [5]. Interleukin-7 is produced by stromal cells of the bone marrow (BM) [6], thymus [7], spleen, lymph nodes (LNs) [8], liver [6], skin [9], intestines [10], and lymphatic endothelial cells (LECs) [11]. More recently, studies have also identified IL-7 production in dendritic cells (DCs) but the exact function of DC-derived IL-7 remains largely unknown [12-15]. Under physiological conditions, systemic IL-7 levels are low and promote survival of naïve T cells via BCL-2 and MCL-1 [16, 17]. During lymphopenia, IL-7 consumption by residual T cells is reduced and systemic IL-7 rise above normal levels [14, 18-20]. Under these conditions, IL-7 can signal through AKT and synergize with TCR signaling to induce homeostatic proliferation of naïve T cells [21, 22]. Thus, IL-7 is a master regulator of thymopoiesis and peripheral T cell homeostasis in both humans and mice.

In the thymus, thymic dendritic cells are essential for central tolerance and their deletion or the absence of MHC class II expression on DCs has been shown to promote the development of systemic autoimmune disease [23-25]. Resident DCs is the most abundant subset of antigen presenting cells in the thymic medulla and they capture and cross-present self-antigens from medullary thymic epithelial cells (mTECs) to induce the deletion of self-reactive thymocytes and/or to promote the formation of Tregs [26, 27]. In addition, other DC subsets such as migratory DCs (CD8 $\alpha^-$ CD11b $^+$ SIRP $\alpha^+$ ), and plasmacytoid DCs (pDCs) (CD11c $^{int}$  CD45RA $^{int}$ ) contribute to central tolerance by picking up and presenting peripheral self-antigens to thymocytes to induce the deletion of autoreactive cells [28-30]. While the role of IL-7 has been relatively well studied during positive selection, the role of IL-7 during negative selection remains largely unknown. In the cortex, thymic epithelial cells (cTECs) produce IL-7 and control the maturation of thymocytes and V-D-J recombination during TCR rearrangement [31]. IL-7Ra expression is repressed during positive selection and it is later restored by TCR stimulation by self-peptide-MCH class I or II, promoting the survival of positively selected thymocytes via IL-7 signaling [16]. IL-7 signaling on

DP thymocytes is also important for lineage choices in order to generate SP CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> thymocytes [32-34]. However, as thymocytes progress through the medulla, the role of IL-7 becomes more controversial. Interleukin-7 and IL-2 signaling are important for the generation of self-reactive FoxP3 regulatory T cells and recent studies have indicated a role for DC-derived IL-2 in this process [35-38]. In vitro studies have suggested that IL-7 could constrain the negative selection of autoreactive thymocytes through increased BCL-2 [39, 40]. Surprisingly, despite the contribution of bcl-2 transgene to promote B cell dependent autoimmunity in mice and humans [41], there is no evidence that T cell dependent autoimmunity develops spontaneously in mice overexpressing bcl-2 [16]. Thymocytes unresponsive to IL-7 express lower TCR levels that could be normalized by forcing BCL-2 expression [42]. Such finding is consistent with the fact that IL-7 signaling can reduce the threshold of TCR activation and promote reactivity towards self-antigens [43, 44]. Thus, while the science indicates that IL-7 signaling on thymocytes has the potential to modulate the outcome of the negative selection, it is still unclear whether IL-7 antagonizes or promotes the deletion of self-reactive thymocytes.

Rag<sup>-/-</sup> mice do not support thymopoiesis beyond the DN3 stage and have severe thymic atrophy, disorganized architecture, abnormal thymic composition and an underdeveloped medulla [45-47]. Despite the dysfunction of the Rag<sup>-/-</sup> medulla, normal thymopoiesis can be restored by transplanting WT BM cells into Rag<sup>-/-</sup> recipient without evidence of autoimmunity. In this study we found that Rag<sup>-/-</sup> mice transplanted with IL-7<sup>-/-</sup> BM cells succumb to autoimmunity within 35-40 days post-SCT. Interestingly, we found the disease transferable by CD4<sup>+</sup> T cells to other Rag<sup>-/-</sup> recipients but not to WT mice or any other lymphopenic hosts tested unless they have a Rag<sup>-/-</sup> background. Despite autoimmunity, we did not find abnormalities in Tregs from [IL-7<sup>-/-</sup> → Rag<sup>-/-</sup>] as they suppressed T cell proliferation in vitro and prevented the development of the disease when co-administered with pathogenic CD4<sup>+</sup> T cells in secondary Rag<sup>-/-</sup> recipients. Evaluation of the thymus in [WT → Rag<sup>-/-</sup>] versus [IL-7<sup>-/-</sup> → Rag<sup>-/-</sup>] did not reveal a difference in the recovery of the medulla, mTECs, Aire expression and DC subsets. Finally, we found that antibiotherapy prevented the development of autoimmunity in Rag<sup>-/-</sup> mice transplanted with IL-7<sup>-/-</sup> BM cells. Our findings suggest an important role played by BM-derived IL-7 in central tolerance against gut antigens.



## MATERIALS AND METHODS

**Mice.** C57BL/6-SJL (B6.SJL; H-2<sup>b</sup>, Ptprca Pep3b, CD45.1<sup>+</sup>) and C57BL/6-129S7-Rag1tmMom/J (Rag<sup>-/-</sup>; H-2<sup>b</sup>, CD45.2<sup>+</sup>) and C57BL/6- TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> (B6.129S2-Tcratm1Mom/J) mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). C57BL/6-IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice were kindly provided by Dr. Crystal Mackall (NIH) and bred at the Maisonneuve Rosemont Research Center animal facility. C57BL/6-IL7<sup>-/-</sup> mice were kindly provided by Dr Nicholas Restifo (NIH) and bred at the Maisonneuve Rosemont Research Center animal facility. IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> CD45.1<sup>+</sup> and Rag<sup>-/-</sup>IL-7<sup>-/-</sup> and Rag<sup>-/-</sup>CD45.1<sup>+</sup> mice were interbred at the Maisonneuve-Rosemont research center animal facility. Mice were housed and bred in a specific pathogen-free at the Maisonneuve-Rosemont hospital animal facility. All animal studies were performed in accordance with the Maisonneuve-Rosemont research center Animal Care Committee.

**Bone marrow transplantation.** 1 x10<sup>7</sup> bone marrow (BM) cells from either C57BL/6 IL-7<sup>-/-</sup> or C57BL/6 wild type (WT) donor mice were injected intravenously into lethally irradiated C57BL/6 Rag<sup>-/-</sup> or C57BL/6 WT recipient mice. Mice were monitored daily for signs of illness and weighed every 3 days. A weight loss of 25% or more or sign of distress (immobility, arched back, eyes closed) were considered survival endpoints entailing euthanasia.

**Adoptive transfer of T lymphocytes.** Spleen and lymph nodes from chimeric Rag<sup>-/-</sup> mice were homogenized, and lymphocytes were sorted with a BD ARIA III (BD Bioscience, San Jose, CA). Cells were washed in PBS and resuspended at of 2x10<sup>6</sup> per mL. Recipient mice received 1x10<sup>6</sup> T cells. When mice displayed signs of disease, mice were sacrificed for physiopathology examination by a pathologist. Spleen and LNs were recovered and immune cells were analyzed by flow cytometry using a LSRII or Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR) was used for analysis.

**Flow cytometry.** Spleen, lymph nodes and thymuses were homogenized, and cells were resuspended at a density of 1 x10<sup>7</sup> cells/ml in FACS buffer. Cells were incubated 30 min on ice

with diluted monoclonal antibodies and then washed and resuspended in FACS buffer for immediate analysis. The following monoclonal antibodies were used: from BD Pharmingen, phycoerythrin (PE)-anti-anti-V $\beta$ 6 (RR4-7); PE-anti-CD4 (RM4.5); allophycocyanin (APC)-anti-CD4 (RM4.5); from BioLegend (San Diego, CA), Peridinin Chlorophyll Protein Complex Cyanine 5.5 (PerCPCy5.5)-anti-CD4 (GK1.5); PerCPCy5.5-anti-CD45.1 (A20); fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD8 (5H10-1); PE-anti-CD11c (N418); APC-anti-CD11b (M1/70); PerCPCy5.5-anti-CD11b (M1/70); FITC-anti-TCR $\beta$  (H57-597). APC-anti-CD45.1 (A20) and APC-anti-mPDCA-1 (JF05-1C2.4.1) were from eBioscience (San Diego, CA) and from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) respectively. The TCR V $\beta$  chain diversity was evaluated using V $\beta$  Screening Panel contains a set of different monoclonal antibodies FITC conjugated (BD Pharmingen). Intracellular staining for FOXP3 was performed with the anti-mouse/rat FOXP3 staining antibody kit (eBioscience) and cytofix/cytoperm kit (eBioscience). Intracellular cytokine staining was performed with PE-anti-IL-4, Brilliant Violet (BV)786-anti-IL-17A, and APC-anti-IFN $\gamma$  (all from BD Biosciences) after cells had been stimulated in vitro for 6 hours with Leukocyte Activation Cocktail and Brefeldin A (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Cells were analyzed on a Fortessa (BD Biosciences) using FACSDiva software (BD Biosciences) or FlowJo software (TreeStar).

**Thymic epithelial cell staining.** Thymuses were isolated and stromal cells were enriched based on a protocol published by Seach [48]. Briefly, thymi were cut into small pieces and placed in RPMI 1640 media with DNase I (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) and Liberase Tm (Roche, Mississauga, Ontario) and incubated at 37°C in order to release epithelial cells. The supernatant was collected every 20 min and the same process was repeated three times by adding 1-2 mL of media supplemented with with DNase I and Liberase Tm. Thymic stromal cells were indirectly labelled with biotinylated Ulex europaeus lectin 1 (UEA1; Vector Laboratories) and revealed with APC-streptavidin (BD Biosciences). In addition, thymic epithelial cells were labeled with PE-anti-CD45 (Clone 30-F11), Pacific blue-anti-I-Ab (Clone M5/114.15.2), BV605-anti-CD80 (Clone10-10A1) (BD Biosciences), APC-Cy7-anti-EpCAM (Clone G8.8), and PE-Cy7-anti-Ly51 (Clone 6C3) (BioLegend). Cell viability was assessed using eFluor 700 (BD Biosciences). For intracellular staining, cells were fixed/permeabilized using the Foxp3 buffer kit (eBioscience) and stained with Alexa fluor-anti-AIRE (Clone 5H12) (eBioscience). TEC were analyzed with a Fortessa (BD

Biosciences). FACSDiva or FlowJO software was used for analysis.

**In vitro T reg suppression assay.** In vitro T reg suppression assays involved two steps, as follows. LNs and spleen were retrieved from [WT→Rag<sup>-/-</sup>] and [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] BM chimeras. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were enriched from the spleen and LNs using a Tregs enrichment kits from Stem cell technology (Vancouver CAN). To increase the purity of T regs, we sorted CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> with a BD FACSAria sorter. Purified CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs were then cultured in complete RPMI 1640 medium with rmIL-2 (0.2 pg/mL, Biolegend), soluble anti-CD3ε (1μg/mL, eBioscience Clone #) and irradiated splenocytes at a ratio of 1:1 in 96-well U-bottom plates at 37°C for 24 hrs. At the end of the incubation, cells were washed twice with PBS.

Pre-activated Tregs were then used to evaluate their suppressive function. Briefly, 5x10<sup>4</sup> FACS sorted CTV-labeled CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T cells isolated from LNs and spleen of congenic CD45.1<sup>+</sup> B6SJL mice were cultured with pre-activated Tregs for 96 hours in 96 wells flat bottom plates pre-coated with anti-CD3 (1μg/mL). In addition, 10<sup>5</sup> irradiated (3,000 Rad) T cell depleted splenocytes were added to the mixture of Tregs and responder T cells. CTV dilution was evaluated on CD45.1<sup>+</sup> cells 96 hours later.

**In vivo T reg suppression assay.** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> non Tregs were sorted with a FACSAria from LNs and spleen of [WT→Rag<sup>-/-</sup>] and [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] BM chimeras. Purified pathogenic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> obtained from [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] BM chimeras cells were injected intravenously alone or with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs obtained from [WT→Rag<sup>-/-</sup>] or [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] BM chimeras. Mice were monitored daily for any evidence of disease.

**Lamina propria lymphocytes preparation.** Lamina propria lymphocytes were isolated from the wall of the small intestine (SI) and colon by mechanical and enzymatic separation. The small intestine and colon were retrieved and flushed and cleaned to remove feces before being opened longitudinally and cut into 3–5-mm pieces. Pieces of intestines were incubated at 37°C for 20 min with continuous stirring in pre-warmed RPMI medium supplemented with 3% FBS, 5mM EDTA, and dithiothreitol (0.145 mg/ml). To remove intraepithelial lymphocytes, pieces of intestine were washed twice with RPMI medium supplemented with 3% FBS, 5mM EDTA and passed through a

kitchen strainer. Lamina propria lymphocytes were isolated by incubating the remaining pieces of tissues with Liberase TL (Roche) (0.2 mg/mL) and 0.05% DNase (Sigma, St. Louis, MO) in RPMI medium for 20 min at 37 C with continuous stirring. Digested tissues were minced and passed through a 70 µm and 40 µm cell strainer. Cells were re-suspended and analyzed by flow cytometry.

**Histopathological evaluation and microscopy.** Tissues prepared for histology were fixed in buffered 10% formalin immediately after sampling, embedded in paraffin, cut in 5 µm sections, and stained with hematoxylin and eosin according to standard methods. Pictures from tissue sections were taken at room temperature using an AxioCamMR3 camera mounted on an AxioImager Z2 microscope and analyzed using the AxioVision software (Carl Zeiss, Toronto, Canada). Images were acquired using a 10X/.3 numerical aperture objective. Histopathological scoring on animals that had undergone transplantation was done by a pathologist in a blinded fashion, on paraffin-embedded colon, spleen, and BM slides.

**Statistical analysis.** Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA) was used for all statistical analyses. Survival curves were plotted using Kaplan-Meier estimates and compared by log-rank analysis. Mann Whitney was used to compare pairs of data. The specific tests used are described in the figure legends. A P value less than or equal to .05 was considered significant. Data are presented as mean ± SEM.

## RESULTS

**Rag<sup>-/-</sup> mice undergoing syngeneic SCT with IL-7<sup>-/-</sup> HSCs develop disease and die.** To understand the role of IL-7 produced by hematopoietic cells, we created BM chimeras with C57BL/6 IL-7<sup>-/-</sup> or C57BL/6 WT mice as donor and C57BL/6 Rag<sup>-/-</sup> mice as recipient (**Fig. 1A**). Unexpectedly, Rag<sup>-/-</sup> mice transplanted with IL-7<sup>-/-</sup> BM stem cells [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] experienced body weight loss by day +21-23 and succumb to the disease by day 33-38 post-SCT (**Fig. 1B-C**). In contrast, Rag<sup>-/-</sup> mice transplanted with WT BM cells [WT→Rag<sup>-/-</sup>] remained healthy. We repeated the experiment this time using WT mice as recipient and surprisingly, WT mice transplanted with IL-7<sup>-/-</sup> HSCs remained healthy (**data not shown**).

The visual examination of [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice revealed substantial changes to the fur (ruffled fur), scaly skin, hunched posture and diarrhea starting by day +24-26 post-SCT (**Fig. 1D**). Histological analysis of skin, colon, small intestine, and liver revealed the presence of immune cell infiltration (**Fig. 1E**). The accumulation of immune cells was more prominent in the colon, which likely explains the severity of colitis found in these animals. We also performed flow cytometry analysis on splenocytes in mice that reached their end point and found a significant expansion of activated CD4<sup>+</sup> (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>) and CD8<sup>+</sup> T cells (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] (**Fig. 1F**). Thus, for so far unknown reasons, Rag<sup>-/-</sup> mice transplanted with syngeneic IL-7<sup>-/-</sup> HSCs develop excessive inflammation and die.

**Adoptive transfer of CD4<sup>+</sup> T cells isolated from [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] chimeras induce the disease in secondary Rag<sup>-/-</sup> recipients.** To assess the involvement of T lymphocytes in the inflammatory disease that develops in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>], we transferred T cells from [WT→Rag<sup>-/-</sup>] or [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] into secondary Rag<sup>-/-</sup> recipients and monitored clinical signs of disease (**Fig. 2A**). While T cells obtained from healthy [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice failed to induce the disease in Rag<sup>-/-</sup> recipients, 100% of Rag<sup>-/-</sup> recipients succumbed to the disease after receiving T lymphocytes from [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] (**Fig. 2B**). Mice that received B lymphocytes obtained from [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] into Rag<sup>-/-</sup> recipients did not develop the disease (**data not shown**). To identify the subset of T cells involved in the disease, we transferred CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells from [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice into secondary Rag<sup>-/-</sup> recipients. Surprisingly, only CD4<sup>+</sup> T cells induced the disease in Rag<sup>-/-</sup>

recipients (**Fig. 2C**). Based on these data, we concluded that the disease developing in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice was mediated by CD4<sup>+</sup> T cells.

To further examine these activated T cells, we evaluated the capacity of T cells isolated from [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] to induce the disease in other syngeneic strains. While in WT mice, pathogenic T cells failed to induce the disease (**data not shown**), we also performed a series of adoptive transfer experiments in other lymphopenic recipients including irradiated WT recipients, IL-7Rα<sup>-/-</sup>, IL-7<sup>-/-</sup> and the double knockout Rag<sup>-/-</sup>IL-7<sup>-/-</sup>. Surprisingly, only the Rag<sup>-/-</sup> and the double knockout Rag<sup>-/-</sup>IL-7<sup>-/-</sup> mice developed the disease with an accumulation of activated T cells (**Fig. 2D-E**). Importantly the period of latency appeared longer in Rag<sup>-/-</sup>IL-7<sup>-/-</sup> compared with Rag<sup>-/-</sup> recipients. Based on these results, we concluded that Rag<sup>-/-</sup> mice are more susceptible to the disease and that systemic IL-7 could act as a facilitator of the disease.

### **Recovery of thymopoiesis in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice is followed by severe thymic atrophy.**

Thymopoiesis is essential for tolerance and therefore we studied thymocytes and Treg development in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] versus [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. At day +7 post-SCT, double negative (DN) thymocytes were detected in the thymus of [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] (**Fig. 3A-B**). At day +14 post-SCT, double positive (DP) thymocytes were the most abundant T cell subtype in the thymus with the emergence of few single positive (SP) CD4<sup>+</sup> thymocytes. At day +21, SP CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> thymocytes were present and the absolute counts and proportions of thymocyte subsets found in the thymus were similar between [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and control [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. However, by day +28 post-SCT, although thymocyte counts were dramatically decreased, the proportion of SP CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> thymocytes were increased in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>]. Finally, by day +35 post-SCT, thymocyte counts were very low and most of the cells detected in the thymus of [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice were SP CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> thymocytes.

To evaluate the nature of SP thymocytes found in the thymus of [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice at day +35 post-SCT, we studied the expression of CD5, CD24 and CD69 antigens which are typically expressed on thymocytes and serve as surrogate markers during thymic selection [49-52]. While at day +21 post-SCT the levels of expression of these markers on SP CD4<sup>+</sup> thymocytes were similar in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice, the expression profile was different at day +35 post-

SCT (**Fig. 3C**): in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice, the expression of CD24 was lost and the level of expression of CD69 and CD5 receptors was much lower on SP CD4<sup>+</sup> thymocytes, suggesting that these cells have passed the stage of negative selection [53]. To distinguish mature lymphocytes recirculating inside the thymus from SP thymocytes [54, 55], we evaluated Qa2<sup>+</sup> expression on SP CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> thymocytes. Qa2<sup>+</sup> is expressed on all peripheral T cells and on thymocytes at the final stage of differentiation. As shown on figure 3D, a larger proportion of SP CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> from [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice express the Qa2<sup>+</sup> antigen. Interestingly, we found that Qa2<sup>+</sup> expression was restricted to the fraction of CD24 negative cells, supporting a model wherein immature thymocytes have been replaced by mature lymphocytes in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] (**Fig. 3D-E**). Thus, as the disease progresses in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice, thymocytes are replaced by cells expressing receptors typically found on mature lymphocytes.

#### **Immune reconstitution is followed by severe lymphopenia in mice developing autoimmunity.**

To gain insight into the progression of the disease, we studied peripheral immune reconstitution in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice. No lymphocytes were detected in the spleen and LN of [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and control [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice at days +7 and +14 post-SCT but CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells started to appear at day +21 post-SCT, and absolute counts were similar in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. By day +28 post-SCT, T cell counts continued to rise in the spleen and LN. By that time, although the number of CD4<sup>+</sup> T cells tended to be lower [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>], the difference was not statistically significant from values obtained in control [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice (**Fig. 4A**). However, by day +35 post-SCT, [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice have developed the disease and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts were dramatically reduced in the spleen and LNs. In contrast, T cell counts continued to increase in the spleen and LNs of [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. Since we have already showed that lymphocytes present at day +35 post-SCT were activated (**Fig. 1F**), we evaluated cytokine production normally increased during autoimmunity. While IFN-g was produced by both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, IL-17 production was restricted to CD4<sup>+</sup> T cells (**Fig. 4B-C**). Finally, we evaluated the V $\beta$  chain diversity at day +35 post-SCT but the TCR repertoire was polyclonal and the diversity of the V $\beta$  did not differ between [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and control [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice (**Fig. 4D**). Thus, while peripheral immune reconstitution appears normal early post-SCT, lymphocyte counts dropped dramatically after day +28 post-SCT. By day +35, most lymphocytes are activated and exhibit a profile of cytokine skewed towards TH1/Th17.

**Regulatory FoxP3 CD4<sup>+</sup> T cells are produced and functional in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>].** Tregs are important for maintaining peripheral tolerance and a dysfunction of Tregs has been observed in several pre-clinical mouse models of autoimmunity [56-61]. In our model, FoxP3 CD4<sup>+</sup> thymocytes were detected at day +21 and +28 post-SCT. Absolute counts and proportion were similar between [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice (**Fig. 5A**). We then evaluated regulatory T cells in the spleen at day +21 and +28 post-SCT but proportions and absolute counts were similar in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] (**Fig. 5B**). However, by day +35 post-SCT, the number of FoxP3 CD4<sup>+</sup> T cells was greatly reduced in the spleen of [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice. We then evaluated the expression of receptors involved in the suppressive function of Tregs. While the expression of FoxP3, CTLA-4, CD25, LAG3, GITR and CD44 was similar between [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice, we found a lower expression of PD1 on Tregs from [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] (**Fig. 5C**). Since PD1 expression on Tregs has been associated with stability [62, 63] we evaluated their suppressive function. Enriched Tregs were stimulated with anti-CD25 and then co-culture with CTV labelled congenic primed T cells. Surprisingly, Tregs from [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] were as suppressive as Tregs from [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice (**Fig. 5D**). We then evaluated the suppressive function of Treg in vivo by performing co-transfer of pathogenic CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> and regulatory CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells in the same Rag<sup>-/-</sup> recipients (**Fig. 5E**). As expected, mice that received pathogenic CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cells without Tregs developed and died from the disease (**Fig. 5F**). As we increased the number of Tregs added to pathogenic CD4<sup>+</sup> T cells, we found that 20% of Tregs (1 Tregs: 5 pathogenic CD4<sup>+</sup> T cells) was insufficient to protect mice whereas 40% provided a protection to the disease (**Fig. 5F**). Based on these data we concluded that Tregs from [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice are functional enough to suppress the disease in Rag<sup>-/-</sup> mice. Importantly however, the number of Tregs is clearly insufficient for controlling self-reactive CD4<sup>+</sup> T cells produced in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>].

**Recovery of stromal cells and DCs in the thymus of [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice.**

Given the production of self-reactive T cells in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice, we postulated that thymic stromal cells recovery post-SCT could be affected by the absence of hematopoietic cell-derived IL-7, leading to an absence of cells capable of proper negative selection. Indeed, in the [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] chimera, only non-hematopoietic cells can produce IL-7. Before irradiation and SCT,



TEC numbers (Epcam<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>) were much lower in Rag<sup>-/-</sup> mice compared with WT mice (**Fig. 6A-B**). By day +21 post-SCT, the number of TEC has increased in both [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice but remained very low compared to control C56BL/6 WT mice. Surprisingly, TEC numbers and proportions were similar in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice (**Fig. 6A-B**). We then studied cTECs (Epcam<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>Ly51<sup>+</sup>) and mTECs (Epcam<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>UEA-1<sup>+</sup>) in transplanted mice. Before transplantation, cTECs were detected at low levels in Rag<sup>-/-</sup> mice and by day +21 post-SCT, their numbers remained low and were similar in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. For mTECs, their numbers were very low in Rag<sup>-/-</sup> mice before transplantation but by day +21, mTEC numbers increased, yet no difference was found between [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice (**Fig. 6A-B**).

We then studied the expression of AIRE, MHC class II and CD80 on medullary TECs. Before irradiation and transplantation, we found low levels of AIRE, MHC class II and CD80 expression in Rag<sup>-/-</sup> compared with WT C57BL-6 mice. By day +21 post-SCT, expression levels of AIRE, MHC class II and CD80 were increased compared to pre-transplant levels, but we found no difference between [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. (**Fig. 6C-D**). We also studied thymic DCs since they cross-present self-antigens to induce the negative selection of self-reactive thymocytes. In [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice, the number of thymic DC increased gradually from day +14 to day +35 post-SCT. DC numbers present in the thymus at day +14 and +21 were similar in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. By day 28 however, DC numbers were decreased in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and by day +35, DCs were absent (**Supplementary Fig. 1-2**). We then evaluated DC subsets including cDCs, CD8 $\alpha$ , Sirp $\alpha$  and pDCs in the thymus of [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice at day +21 post-SCT (**Fig. 6E-F**). All these subsets of DCs were detected in the thymus by day +21 post-SCT and numbers of proportions did not differ between [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. Evaluation of MHC class II, CD40, CD80 and CD86 on DCs did not reveal any difference in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] versus [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice (**Fig. 6G-I**). Based on these results, we concluded that difference in the thymic microenvironment in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] versus [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice could explain the production of autoreactive T cells in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice.

**Antibiotic treatment prevents the development of autoimmunity in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice.** Previous reports have demonstrated that mice with a hypomorphic mutation in the Rag gene can

develop severe inflammatory bowel disease mediated by CD4<sup>+</sup> T cells with a Th1/Th17 phenotype [64]. Interestingly, the intestinal autoimmunity was alleviated by administration of antibiotics. This finding was also observed in other autoimmune diseases [64-67]. Therefore, we examined whether or not the severe colitis that develops in transplanted [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice could be prevented by antibiotic therapy. After SCT, antibiotic (enrofloxacin) was administered for 15 consecutive days but this posology was insufficient to prevent the development of autoimmunity in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice. We then extended the administration of antibiotic up to day 35 post-SCT and [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice did not develop autoimmunity whereas control [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice died by day +35 (**Fig. 7A-B**). Physiopathology of the gut confirmed the benefit of enrofloxacin as the length of the colon was extended and inflammation was reduced compared with control [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice (**Fig. 7C-D**). Moreover, antibiotic therapy reduced the number of CD4<sup>+</sup> T cells producing IFN- $\gamma$  or IL-17 in the gut (**Fig. 7E-F**). Following antibiotic therapy, the thymus size was increased, the proportion of thymocyte subsets was normalized and thymocyte counts were increased compared to untreated [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>]. However, thymocyte counts remained lower than [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice (**Fig. 7G-I**). Thus, antibiotic therapy can prevent the development of the disease in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice. Whether antibiotic therapy modulates commensal or self-antigen in the gut or/and prevents the production of autoreactive T cells remains unknown. Additional studies are needed.

## DISCUSSION

In mice, syngeneic stem cell transplantation is normally well tolerated and leads to thymic dependent immune reconstitution and normalization of T cell counts in the periphery [68, 69]. Within a few weeks after SCT, lymphoid and myeloid cells recovery restore immunocompetence. Thymopoiesis is essential in this process as thymic insults results in a prolonged period of immunosuppression in both humans and mice [70-73]. BM-chimeras have been used extensively to reveal the contribution of hematopoietic and non-hematopoietic cells involved in distinct immunological phenomenon and here we describe an unsuspected role for hematopoietic cell-derived IL-7 to prevent autoimmunity in Rag<sup>-/-</sup> mice. In this model, the disease is not ascribed to alloreactivity since donor and recipient mice are on the same B6 background. In addition, Interleukin-7<sup>-/-</sup> mice produce few lymphocytes and we ruled out a potential contribution of these

cells to the disease by showing the absence of autoimmunity in Rag<sup>-/-</sup> mice after their adoptive transfer (not shown). Moreover, the removal of residual IL-7<sup>-/-</sup> T cells from the hematopoietic stem cell graft did not prevent the development of the disease in transplanted Rag<sup>-/-</sup> mice. These series of experiments provide compelling evidence that thymic dependent immune reconstitution is essential for autoimmunity to develop in Rag<sup>-/-</sup> mice transplanted with IL-7<sup>-/-</sup> BM cells.

For reasons that are still not completely understood, the CD4<sup>+</sup> T cell subset is often involved and sufficient to induce and maintain autoimmunity in mice and humans [74, 75]. While a small fraction of CD4<sup>+</sup> T cells can induce tissue damage through granzyme and perforin release, most often their role is to orchestrate the immune response and the development of inflammation [76-79]. Thymic DCs appear critical for the elimination of self-reactive CD4<sup>+</sup> T cells and alteration of these cells has been associated to CD4 autoimmunity. For example, the ablation of thymic DCs in mice promotes CD4 autoimmunity with clinical signs resembling those we described in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice [25, 80] Similarly, the lack of MHC class II expression by hematopoietic cells leads to the production of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells and like the previous model, clinical signs are also similar to those observed in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice [23]. These symptoms include important weight loss, severe colitis, and increased number of activated CD4<sup>+</sup> T cells. Given that the autoimmunity that develops in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] is also mediated by CD4<sup>+</sup> T cells, it is tempting to speculate that DCs in our model could be dysfunctional. Whether the dysfunction is related to IL-7 production itself or other signals that DCs deliver to thymocytes remains to be elucidated.

Despite the absolute requirement of thymic DCs to prevent CD4<sup>+</sup> T cell autoimmunity, medullary stromal cells play a critical role during negative selection since they express and produce a vast array of self-antigens that they transfer to DCs to induce the negative selection of self-reactive thymocytes [81-83]. mTECs express the transcription factor AIRE which regulates the expression of tissue-specific antigens [81-83]. AIRE-deficient mice have reduced expression of tissue-specific genes by mTECs, which leads to the development of autoimmune diseases against endocrine organs [84, 85]. Other mouse models such as Traf6<sup>-/-</sup> and Rel-b<sup>-/-</sup> mice also present alterations to the medulla microenvironment and develop multi-organ inflammation resulting from the production of self-reactive lymphocyte and abnormal regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells [86-90]. In this study, the evaluation of mTEC recovery by day +21 post-SCT did not reveal any difference

with regards to mTEC numbers, maturity, and AIRE expression between [WT→Rag<sup>-/-</sup>] and [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice. Thus, based on the absence of autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells and normal functional Tregs in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice, our model is more consistent with an effect of IL-7<sup>-/-</sup> DCs on the production of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells in Rag<sup>-/-</sup> mice. However, which DC subset is more affected by the lack of IL-7 production by hematopoietic cells remains to be determined.

[IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice develop severe lymphopenia. While activated lymphocytes likely migrate into inflamed tissues, the fate of non-autoreactive T cells remains more obscure. The decline in thymopoiesis during immune reconstitution represent an important factor that can halte the rise in T cells [71]. In addition, peripheral DCs are also important during immune reconstitution since they provide TCR stimulation to naïve T cells for them to persist [69]. While accessibility to DCs is absolutely required for the homeostatic peripheral expansion (HPE) naïve CD4<sup>+</sup> T cells [91], DC are dispensable for CD8<sup>+</sup> T cells since HPE can occur in their absence [92]. In [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice, DC depletion occurs before T cell depletion (Supplementary Fig. 2). Importantly, the loss of DCs by day<sup>+</sup> 28 post-SCT appears to have a more pronounce effect on CD4<sup>+</sup> than CD8<sup>+</sup> T cell counts, while at later time point, both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells counts were low. While alloreactivity can induce significant damage to the BM microenvironment to constrain DC production [93], it is not clear whether insults to stromal cells of the BM contributes occur in this model. Thus, in addition to the loss of thymopoiesis, the depletion of peripheral DCs likely aggravates lymphopenia in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice.

While we provide conclusive evidence that self-reactive CD4<sup>+</sup> T cells were produced in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice, we also showed that the presence of the autoantigen in the periphery was essential in order to reveal the autoimmunity. This autoantigen was prevalent in mice under a Rag<sup>-/-</sup> background, which likely explains why pathogenic CD4<sup>+</sup> T cells failed to induce autoimmunity in IL-7<sup>-/-</sup>, IL-7Rα<sup>-/-</sup> or WT mice while they induced the disease in the IL-7<sup>-/-</sup>Rag<sup>-/-</sup> double knockout mice. Rag<sup>-/-</sup> mice present abnormalities to the gut epithelium and intestinal barrier, which predispose to gut leaking [94]. In addition, Rag<sup>-/-</sup> mice have a distinct composition of intestinal microbiota that differ considerably from other strains [95-98]. The excessive inflammation that prevailed in the gut of [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice raised the prospect that the

autoantigen could be in the intestine. In some models of autoimmune diseases, commensal antigens were shown to initiate autoimmunity and changes in the microbiota of these animals prevented the development of the disease [99-103]. Several methods have been used to modulate the gut microbiota including the use of prebiotics, probiotics, stool transplantation and antibiotics [64, 67, 104-109]. In this study the use of enrofloxacin provides a dramatic benefit to [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice by reducing gut inflammation and death. The benefit provided by antibiotics has been known for some time but their mechanism of action in reducing/preventing anti-host reactivity remains poorly understood [66, 67, 110-112]. The effect of antibiotic is probably manifold since it could change the gut microbiota, reduce the bioavailability of gut self-antigens [113] and limit the trafficking of commensal self-antigens to the thymus, affecting negative selection of self-reactive thymocytes. In addition, it is not excluded that antibiotics could affect thymocytes and lymphocytes themselves [114]. The use of antibiotics with narrow-spectrum could help identifying elements of the microbiota that contribute to autoimmunity in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice.

In conclusion, this study is the first to report the development of lethal autoimmunity in Rag<sup>-/-</sup> mice transplanted with IL-7<sup>-/-</sup> HSCs. In this model, IL-7 production by hematopoietic cells appears important to prevent autoimmunity in transplanted Rag<sup>-/-</sup> mice but dispensable for mice that are not on a Rag<sup>-/-</sup> background. Adoptive transfer experiments did not reveal the production of autoreactive lymphocytes in [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice, whereas CD4<sup>+</sup> T cells isolated from in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice reproducibly induced lethal autoimmunity in secondary Rag<sup>-/-</sup> recipients. Under very specific conditions, IL-7 production by hematopoietic cells can impact the negative selection of CD4<sup>+</sup> thymocytes. The absence of mTEC in Rag<sup>-/-</sup> mice could limit IL-7 bioavailability and reveal an unsuspected role played by hematopoietic-derived IL-7 during negative selection. Hematopoietic cells are not the primary source of IL-7 and only DCs have been described to produce the cytokine [12-15]. While studies have proposed that IL-7 could interfere with the negative selection of thymocytes [40], other studies have demonstrated that IL-7 could act as co-stimulation to help T cell activation [43, 115, 116]. Considering the medulla underdeveloped in Rag<sup>-/-</sup> mice, it is tempting to speculate that IL-7 co-stimulation produced by hematopoietic cells, and perhaps DCs, could boost TCR stimulation to reach the threshold of negative selection against low avidity for self-antigens. Whether these findings could be relevant to patients with OMENN syndrome needs further investigations.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank Dr, Sylvie Lesage and Dr. Heather Melichar for their helpful review and thoughtful comments of this work. The authors would like to thank Mrs. Martine Dupuis for her valuable expertise in flow cytometry. Finally, the authors would like to thank Mrs. Julie Dubeau and the staff of the animal facility of HMR. This work was supported in part by grant from the Canadian Institutes of Health Research to M.G (grant no. MOP-102650) and the Cancer Research Society of Canada (grants no. 22669 to MG) and in part by a grant from the Foundation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montreal, QC, CAN.

**Financial disclosure:** The authors have nothing to disclose.

**Conflict of interest statement:** There are no conflicts of interest to report.

**Authorship contributions:** M.M.M. Designed and performed experiments and wrote the manuscript; S.T, performed experiments, provided intellectual input, and reviewed the manuscript. T.P. performed physiopathology evaluation. D.L. performed experiments, provided intellectual input, and reviewed the manuscript. M.G. Provided intellectual input and research support and wrote the manuscript.

## REFERENCES

- [1] C. L. Mackall, T. J. Fry, C. Bare, P. Morgan, A. Galbraith, R. E. Gress. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood*, 2001;97:1491-7.
- [2] T. J. Fry, M. Moniuszko, S. Creekmore, S. J. Donohue, D. C. Douek, S. Giardina *et al.* IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates. *Blood*, 2003;101:2294-9.
- [3] J. T. Tan, E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K. I. Weinberg *et al.* IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001;98:8732-7.
- [4] F. Carrette, C. D. Surh. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis. *Seminars in immunology*, 2012;24:209-17.
- [5] R. Mazzucchelli, S. K. Durum. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nature Reviews Immunology*, 2007;7:144-54.
- [6] J. C. Gutierrez-Ramos, C. Olsson, R. Palacios. Interleukin (IL1 to IL7) gene expression in fetal liver and bone marrow stromal clones: cytokine-mediated positive and negative regulation. *Exp Hematol*, 1992;20:986-90.
- [7] R. A. Montgomery, M. J. Dallman. Analysis of cytokine gene expression during fetal thymic ontogeny using the polymerase chain reaction. *The Journal of Immunology*, 1991;147:554.
- [8] A. Link, T. K. Vogt, S. Favre, M. R. Britschgi, H. Acha-Orbea, B. Hinz *et al.* Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol*, 2007;8:1255-65.
- [9] K.-i. Yamanaka, R. Clark, B. Rich, R. Dowgiert, K. Hirahara, D. Hurwitz *et al.* Skin-derived interleukin-7 contributes to the proliferation of lymphocytes in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*, 2006;107:2440-5.

- [10] M. Watanabe, Y. Ueno, T. Yajima, Y. Iwao, M. Tsuchiya, H. Ishikawa *et al.* Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest*, 1995;95:2945-53.
- [11] C. N. Miller, D. J. Hartigan-O'Connor, M. S. Lee, G. Laidlaw, I. P. Cornelissen, M. Matloubian *et al.* IL-7 production in murine lymphatic endothelial cells and induction in the setting of peripheral lymphopenia. *Int Immunol*, 2013;25:471-83.
- [12] R. V. Sorg, A. D. McLellan, B. D. Hock, D. B. Fearnley, D. N. Hart. Human dendritic cells express functional interleukin-7. *Immunobiology*, 1998;198:514-26.
- [13] I. Zubkova, H. Mostowski, M. Zaitseva. Up-regulation of IL-7, stromal-derived factor-1 alpha, thymus-expressed chemokine, and secondary lymphoid tissue chemokine gene expression in the stromal cells in response to thymocyte depletion: implication for thymus reconstitution. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2005;175:2321-30.
- [14] M. Guimond, R. G. Veenstra, D. J. Grindler, H. Zhang, Y. Cui, R. D. Murphy *et al.* Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 2009;10:149-57.
- [15] B. M. Carreno, M. Becker-Hapak, G. P. Linette. CD40 regulates human dendritic cell-derived IL-7 production that, in turn, contributes to CD8(+) T-cell antigen-specific expansion. *Immunol Cell Biol*, 2009;87:167-77.
- [16] K. Akashi, M. Kondo, U. von Freeden-Jeffry, R. Murray, I. L. Weissman. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell*, 1997;89:1033-41.
- [17] N. Chetoui, M. Boisvert, S. Gendron, F. Aoudjit. Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway. *Immunology*, 2010;130:418-26.
- [18] L. A. Napolitano, R. M. Grant, S. G. Deeks, D. Schmidt, S. C. De Rosa, L. A. Herzenberg *et al.* Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med*, 2001;7:73-9.



- [19] T. J. Fry, E. Connick, J. Falloon, M. M. Lederman, D. J. Liewehr, J. Spritzler *et al.* A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood*, 2001;97:2983-90.
- [20] N. Bosco, F. Agenes, R. Ceredig. Effects of increasing IL-7 availability on lymphocytes during and after lymphopenia-induced proliferation. *J Immunol*, 2005;175:162-70.
- [21] L. Swainson, S. Kinet, C. Mongellaz, M. Sourisseau, T. Henriques, N. Taylor. IL-7-induced proliferation of recent thymic emigrants requires activation of the PI3K pathway. *Blood*, 2007;109:1034-42.
- [22] S. Thiant, M. M. Moutuou, P. Laflamme, R. Sidi Boumedine, D. M. Leboeuf, L. Busque *et al.* Imatinib mesylate inhibits STAT5 phosphorylation in response to IL-7 and promotes T cell lymphopenia in chronic myelogenous leukemia patients. *Blood Cancer J*, 2017;7:e551-e.
- [23] T. Teshima, P. Reddy, C. Liu, D. Williams, K. R. Cooke, J. L. Ferrara. Impaired thymic negative selection causes autoimmune graft-versus-host disease. *Blood*, 2003;102:429-35.
- [24] O. Herbin, A. J. Bonito, S. Jeong, E. G. Weinstein, A. H. Rahman, H. Xiong *et al.* Medullary thymic epithelial cells and CD8alpha<sup>+</sup> dendritic cells coordinately regulate central tolerance but CD8alpha<sup>+</sup> cells are dispensable for thymic regulatory T cell production. *Journal of autoimmunity*, 2016;75:141-9.
- [25] C. Ohnmacht, A. Pullner, S. B. King, I. Drexler, S. Meier, T. Brocker *et al.* Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 2009;206:549-59.
- [26] C. Koble, B. Kyewski. The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J Exp Med*, 2009;206:1505-13.
- [27] K. Aschenbrenner, L. M. D'Cruz, E. H. Vollmann, M. Hinterberger, J. Emmerich, L. K. Swee *et al.* Selection of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire<sup>+</sup> medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol*, 2007;8:351-8.

- [28] R. Bonasio, M. L. Scimone, P. Schaerli, N. Grabie, A. H. Lichtman, U. H. von Andrian. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol*, 2006;7:1092-100.
- [29] L. Wu, K. Shortman. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol*, 2005;17:304-12.
- [30] H. Hadeiba, K. Lahl, A. Edalati, C. Oderup, A. Habtezion, R. Pachynski *et al*. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity*, 2012;36:438-50.
- [31] M. S. Schlissel, S. D. Durum, K. Muegge. The interleukin 7 receptor is required for T cell receptor gamma locus accessibility to the V(D)J recombinase. *J Exp Med*, 2000;191:1045-50.
- [32] E. Brugnera, A. Bhandoola, R. Cibotti, Q. Yu, T. I. Guinter, Y. Yamashita *et al*. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity*, 2000;13:59-71.
- [33] Q. Yu, B. Erman, A. Bhandoola, S. O. Sharrow, A. Singer. In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine*, 2003;197:475-87.
- [34] J. H. Park, S. Adoro, T. Guinter, B. Erman, A. S. Alag, M. Catalfamo *et al*. Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat Immunol*, 2010;11:257-64.
- [35] A. L. Bayer, J. Y. Lee, A. de la Barrera, C. D. Surh, T. R. Malek. A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*, 2008;181:225-34.
- [36] M. A. Burchill, J. Yang, C. Vogtenhuber, B. R. Blazar, M. A. Farrar. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*, 2007;178:280-90.
- [37] K. B. Vang, J. Yang, S. A. Mahmud, M. A. Burchill, A. L. Vegoe, M. A. Farrar. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol*, 2008;181:3285-90.

- [38] B. M. Weist, N. Kurd, J. Boussier, S. W. Chan, E. A. Robey. Thymic regulatory T cell niche size is dictated by limiting IL-2 from antigen-bearing dendritic cells and feedback competition. *Nat Immunol*, 2015;16:635-41.
- [39] R. L. Rubin, T. M. Hermanson. Plasticity in the positive selection of T cells: affinity of the selecting antigen and IL-7 affect T cell responsiveness. *International Immunology*, 2005;17:959-71.
- [40] H. Kishimoto, J. Sprent. Several different cell surface molecules control negative selection of medullary thymocytes. *J Exp Med*, 1999;190:65-73.
- [41] M. López-Hoyos, R. Carrió, R. Merino, L. Buelta, S. Izui, G. Núñez *et al.* Constitutive expression of bcl-2 in B cells causes a lethal form of lupuslike autoimmune disease after induction of neonatal tolerance to H-2b alloantigens. *Journal of Experimental Medicine*, 1996;183:2523-31.
- [42] S. Tani-ichi, A. Shimba, K. Wagatsuma, H. Miyachi, S. Kitano, K. Imai *et al.* Interleukin-7 receptor controls development and maturation of late stages of thymocyte subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013;110:612-7.
- [43] P. Deshpande, M. M. Cavanagh, S. Le Saux, K. Singh, C. M. Weyand, J. J. Goronzy. IL-7- and IL-15-mediated TCR sensitization enables T cell responses to self-antigens. *J Immunol*, 2013;190:1416-23.
- [44] D. A. Bazdar, S. F. Sieg. Interleukin-7 enhances proliferation responses to T-cell receptor stimulation in naïve CD4<sup>+</sup> T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Virol*, 2007;81:12670-4.
- [45] M. Anderson, S. K. Anderson, A. G. Farr. Thymic vasculature: organizer of the medullary epithelial compartment? *International Immunology*, 2000;12:1105-10.
- [46] S. E. Prockop, H. T. Petrie. Regulation of Thymus Size by Competition for Stromal Niches among Early T Cell Progenitors. *The Journal of Immunology*, 2004;173:1604.
- [47] M. Zamisch, B. Moore-Scott, D. M. Su, P. J. Lucas, N. Manley, E. R. Richie. Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2005;174:60-7.

- [48] N. Seach, M. Hammett, A. Chidgey. Isolation, characterization, and reaggregate culture of thymic epithelial cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ), 2013;945:251-72.
- [49] H. S. Azzam, A. Grinberg, K. Lui, H. Shen, E. W. Shores, P. E. Love. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *The Journal of experimental medicine*, 1998;188:2301-11.
- [50] T. A. Baldwin, K. A. Hogquist. Transcriptional analysis of clonal deletion in vivo. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 2007;179:837-44.
- [51] Q. N. Hu, T. A. Baldwin. Differential Roles for Bim and Nur77 in Thymocyte Clonal Deletion Induced by Ubiquitous Self-Antigen. *The Journal of Immunology*, 2015;194:2643.
- [52] Q. Hu, S. A. Nicol, A. Y. W. Suen, T. A. Baldwin. Examination of thymic positive and negative selection by flow cytometry. *J Vis Exp*, 2012:4269.
- [53] H. Kishimoto, J. Sprent. Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *The Journal of experimental medicine*, 1997;185:263-71.
- [54] J. S. Hale, P. J. Fink. Back to the thymus: peripheral T cells come home. *Immunology and cell biology*, 2009;87:58-64.
- [55] K. Ayasoufi, R. Fan, A. Valujskikh. Depletion-Resistant CD4 T Cells Enhance Thymopoiesis During Lymphopenia. *American Journal of Transplantation*, 2017;17:2008-19.
- [56] V. L. Godfrey, J. E. Wilkinson, L. B. Russell. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *The American journal of pathology*, 1991;138:1379-87.
- [57] M. E. Brunkow, E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S.-A. Yasayko *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics*, 2001;27:68.
- [58] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, M. Toda. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a

single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 1995;155:1151-64.

[59] S. Gregori, N. Giarratana, S. Smiroldo, L. Adorini. Dynamics of pathogenic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 2003;171:4040-7.

[60] D. A. Horwitz. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future. *Arthritis Res Ther*, 2008;10:227-.

[61] M. Feuerer, W. Jiang, P. D. Holler, A. Satpathy, C. Campbell, M. Bogue *et al.* Enhanced thymic selection of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the NOD mouse model of autoimmune diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007;104:18181-6.

[62] B. Zhang, S. Chikuma, S. Hori, S. Fagarasan, T. Honjo. Nonoverlapping roles of PD-1 and FoxP3 in maintaining immune tolerance in a novel autoimmune pancreatitis mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016;113:8490.

[63] C. Stathopoulou, A. Gangaplara, G. Mallett, F. A. Flomerfelt, L. P. Liniany, D. Knight *et al.* PD-1 Inhibitory Receptor Downregulates Asparaginyl Endopeptidase and Maintains Foxp3 Transcription Factor Stability in Induced Regulatory T Cells. *Immunity*, 2018;49:247-63.e7.

[64] R. Rigoni, E. Fontana, S. Guglielmetti, B. Fosso, A. M. D'Erchia, V. Maina *et al.* Intestinal microbiota sustains inflammation and autoimmunity induced by hypomorphic RAG defects. *The Journal of experimental medicine*, 2016;213:355-75.

[65] Q. Mu, V. J. Tavella, J. L. Kirby, T. E. Cecere, M. Chung, J. Lee *et al.* Antibiotics ameliorate lupus-like symptoms in mice. *Scientific Reports*, 2017;7:13675.

[66] J. Ochoa-Reparaz, D. W. Mielcarz, L. E. Ditrio, A. R. Burroughs, D. M. Foureau, S. Haque-Begum *et al.* Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 2009;183:6041-50.

[67] B. He, Y. Liu, T. K. Hoang, X. Tian, C. M. Taylor, M. Luo *et al.* Antibiotic-modulated microbiome suppresses lethal inflammation and prolongs lifespan in Treg-deficient mice. *Microbiome*, 2019;7:145-.

- [68] C. Mackall, L. Granger, M. Sheard, R. Cepeda, R. Gress. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood*, 1993;82:2585-94.
- [69] M. M. Moutuou, G. Pagé, I. Zaid, S. Lesage, M. Guimond. Restoring T Cell Homeostasis After Allogeneic Stem Cell Transplantation; Principal Limitations and Future Challenges. *Frontiers in immunology*, 2018;9:1237-.
- [70] M. Bosch, F. M. Khan, J. Storek. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Current opinion in hematology*, 2012;19:324-35.
- [71] C. L. Mackall, T. A. Fleisher, M. R. Brown, M. P. Andrich, C. C. Chen, I. M. Feuerstein *et al.* Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *The New England journal of medicine*, 1995;332:143-9.
- [72] C. L. Mackall, T. A. Fleisher, M. R. Brown, M. P. Andrich, C. C. Chen, I. M. Feuerstein *et al.* Distinctions Between CD8+ and CD4+ T-Cell Regenerative Pathways Result in Prolonged T-Cell Subset Imbalance After Intensive Chemotherapy. *Blood*, 1997;89:3700-7.
- [73] J. Storek, R. P. Witherspoon, R. Storb. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone marrow transplantation*, 1995;16:413-25.
- [74] M. Yura, I. Takahashi, M. Serada, T. Koshio, K. Nakagami, Y. Yuki *et al.* Role of MOG-stimulated Th1 type "light up" (GFP+) CD4+ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of autoimmunity*, 2001;17:17-25.
- [75] K. Chemin, C. Gerstner, V. Malmström. Effector Functions of CD4+ T Cells at the Site of Local Autoimmune Inflammation—Lessons From Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*, 2019;10.
- [76] B. Broux, S. Markovic-Plese, P. Stinissen, N. Hellings. Pathogenic features of CD4+CD28- T cells in immune disorders. *Trends in molecular medicine*, 2012;18:446-53.

[77] F. Zaguia, P. Saikali, S. Ludwin, J. Newcombe, D. Beauseigle, E. McCrea *et al.* Cytotoxic NKG2C<sup>+</sup> CD4 T cells target oligodendrocytes in multiple sclerosis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 2013;190:2510-8.

[78] A. Takeuchi, M. E. S. G. Badr, K. Miyauchi, C. Ishihara, R. Onishi, Z. Guo *et al.* CRTAM determines the CD4<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte lineage. *The Journal of experimental medicine*, 2016;213:123-38.

[79] L. M. Peeters, M. Vanheusden, V. Somers, B. Van Wijmeersch, P. Stinissen, B. Broux *et al.* Cytotoxic CD4<sup>+</sup> T Cells Drive Multiple Sclerosis Progression. *Front Immunol*, 2017;8:1160-.

[80] W. Huang, Q. Qi, J. Hu, F. Huang, T. M. Laufer, A. August. Dendritic cell-MHC class II and Itk regulate functional development of regulatory innate memory CD4<sup>+</sup> T cells in bone marrow transplantation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 2014;192:3435-41.

[81] J. Derbinski, A. Schulte, B. Kyewski, L. Klein. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol*, 2001;2:1032-9.

[82] M. S. Anderson, E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, 2002;298:1395-401.

[83] A. M. Gallegos, M. J. Bevan. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *The Journal of experimental medicine*, 2004;200:1039-49.

[84] A. Liston, S. Lesage, J. Wilson, L. Peltonen, C. C. Goodnow. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol*, 2003;4:350-4.

[85] C. Ramsey, M. P. Rubinstein, D. M. Kim, J.-H. Cho, J. Sprent, C. D. Surh. The lymphopenic environment of CD132 (common gamma-chain)-deficient hosts elicits rapid homeostatic proliferation of naive T cells via IL-15. *J Immunol*, 2008;180:5320-6.

[86] T. Akiyama, S. Maeda, S. Yamane, K. Ogino, M. Kasai, F. Kajiura *et al.* Dependence of Self-Tolerance on TRAF6-Directed Development of Thymic Stroma. *Science*, 2005;308:248.

- [87] L. Burkly, C. Hession, L. Ogata, C. Reilly, L. A. Marconi, D. Olson *et al.* Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature*, 1995;373:531-6.
- [88] F. Weih, D. Carrasco, S. K. Durham, D. S. Barton, C. A. Rizzo, R.-P. Ryseck *et al.* Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- $\kappa$ B/Rel family. *Cell*, 1995;80:331-40.
- [89] B. J. O'Sullivan, S. Yekollu, R. Ruscher, A. M. Mehdi, M. R. Maradana, A. P. Chidgey *et al.* Autoimmune-Mediated Thymic Atrophy Is Accelerated but Reversible in RelB-Deficient Mice. *Front Immunol*, 2018;9.
- [90] M. Irla, G. Hollander, W. Reith. Control of central self-tolerance induction by autoreactive CD4<sup>+</sup> thymocytes. *Trends in immunology*, 2010;31:71-9.
- [91] S. D. Gauthier, D. Leboeuf, R. Manuguerra-Gagne, L. Gaboury, M. Guimond. Stromal-Derived Factor-1alpha and Interleukin-7 Treatment Improves Homeostatic Proliferation of Naive CD4(+) T Cells after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015;21:1721-31.
- [92] S. D. Gauthier, M. M. Moutuou, F. Daudelin, D. Leboeuf, M. Guimond. IL-7 Is the Limiting Homeostatic Factor that Constrains Homeostatic Proliferation of CD8(+) T Cells after Allogeneic Stem Cell Transplantation and Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019;25:648-55.
- [93] Y. Shono, S. Ueha, Y. Wang, J. Abe, M. Kurachi, Y. Matsuno *et al.* Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2010;115:5401-11.
- [94] S. Dahan, K. M. Rabinowitz, A. P. Martin, M. C. Berin, J. C. Unkeless, L. Mayer. Notch-1 signaling regulates intestinal epithelial barrier function, through interaction with CD4<sup>+</sup> T cells, in mice and humans. *Gastroenterology*, 2011;140:550-9.
- [95] F. Scholz, B. D. Badgley, M. J. Sadowsky, D. H. Kaplan. Immune mediated shaping of microflora community composition depends on barrier site. *PloS one*, 2014;9:e84019.



- [96] C. Thoene-Reineke, A. Fischer, C. Friese, D. Briesemeister, U. B. Gobel, T. Kammertoens *et al.* Composition of intestinal microbiota in immune-deficient mice kept in three different housing conditions. *PloS one*, 2014;9:e113406.
- [97] H. Zhang, J. B. Sparks, S. V. Karyala, R. Settlage, X. M. Luo. Host adaptive immunity alters gut microbiota. *The ISME journal*, 2015;9:770-81.
- [98] O. Kwon, S. Lee, J. H. Kim, H. Kim, S. W. Lee. Altered Gut Microbiota Composition in Rag1-deficient Mice Contributes to Modulating Homeostasis of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Immune network*, 2015;15:252-9.
- [99] H. J. Wu, Ivanov, II, J. Darce, K. Hattori, T. Shima, Y. Umesaki *et al.* Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity*, 2010;32:815-27.
- [100] Y. K. Lee, J. S. Menezes, Y. Umesaki, S. K. Mazmanian. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011;108 Suppl 1:4615-22.
- [101] X. Zhang, D. Zhang, H. Jia, Q. Feng, D. Wang, D. Liang *et al.* The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nature Medicine*, 2015;21:895-905.
- [102] K. Berer, M. Mues, M. Koutrolos, Z. A. Rasbi, M. Boziki, C. Johner *et al.* Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*, 2011;479:538-41.
- [103] W. E. Ruff, C. Dehner, W. J. Kim, O. Pagovich, C. L. Aguiar, A. T. Yu *et al.* Pathogenic Autoreactive T and B Cells Cross-React with Mimotopes Expressed by a Common Human Gut Commensal to Trigger Autoimmunity. *Cell Host & Microbe*, 2019;26:100-13.e8.
- [104] G. Cammarota, G. Ianiro, S. Bibbò, A. Gasbarrini. Gut microbiota modulation: probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation? *Internal and Emergency Medicine*, 2014;9:365-73.
- [105] X. Zhang, B.-d. Chen, L.-d. Zhao, H. Li. The Gut Microbiota: Emerging Evidence in Autoimmune Diseases. *Trends in molecular medicine*, 2020;26:862-73.

- [106] J. S. So, H. K. Kwon, C. G. Lee, H. J. Yi, J. A. Park, S. Y. Lim *et al.* Lactobacillus casei suppresses experimental arthritis by down-regulating T helper 1 effector functions. *Molecular immunology*, 2008;45:2690-9.
- [107] T. P. Ivanovska, K. Mladenovska, Z. Zhivikj, M. J. Pavlova, I. Gjurovski, T. Ristoski *et al.* Synbiotic loaded chitosan-Ca-alginate microparticles reduces inflammation in the TNBS model of rat colitis. *International journal of pharmaceutics*, 2017;527:126-34.
- [108] S. Paramsothy, M. A. Kamm, N. O. Kaakoush, A. J. Walsh, J. van den Bogaerde, D. Samuel *et al.* Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*, 2017;389:1218-28.
- [109] C. H. F. Hansen, C. S. Larsen, H. O. Petersson, L. F. Zachariassen, A. Vegge, C. Lauridsen *et al.* Targeting gut microbiota and barrier function with prebiotics to alleviate autoimmune manifestations in NOD mice. *Diabetologia*, 2019;62:1689-700.
- [110] A. Ebringer. Therapy: Gut-mediated autoimmune arthritis treated with antibiotics. *Nature reviews Rheumatology*, 2010;6:622-3.
- [111] H. C. Rath, M. Schultz, R. Freitag, L. A. Dieleman, F. Li, H. J. Linde *et al.* Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infection and immunity*, 2001;69:2277-85.
- [112] F. Hoentjen, H. J. Harmsen, H. Braat, C. D. Torrice, B. A. Mann, R. B. Sartor *et al.* Antibiotics with a selective aerobic or anaerobic spectrum have different therapeutic activities in various regions of the colon in interleukin 10 gene deficient mice. *Gut*, 2003;52:1721-7.
- [113] M. Uribe-Herranz, K. Bittinger, S. Rafail, S. Guedan, S. Pierini, C. Tanes *et al.* Gut microbiota modulates adoptive cell therapy via CD8 $\alpha$  dendritic cells and IL-12. *JCI Insight*, 2018;3:e94952.
- [114] G. Banck, A. Forsgren. Antibiotics and suppression of lymphocyte function in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 1979;16:554-60.

[115] B. R. Lawson, R. Gonzalez-Quintial, T. Eleftheriadis, M. A. Farrar, S. D. Miller, K. Sauer *et al.* Interleukin-7 is required for CD4(+) T cell activation and autoimmune neuroinflammation. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*, 2015;161:260-9.

[116] T. J. Fry, C. L. Mackall. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood*, 2002;99:3892-904.

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1: Rag<sup>-/-</sup> mice transplanted with IL-7<sup>-/-</sup> BM cells develop excessive inflammation and die.** (A) schematic representation of the transplantation experiment. Irradiated Rag<sup>-/-</sup> mice received 10x10<sup>6</sup> BM cells from either IL-7<sup>-/-</sup> or WT C57BL/6.SJL donor mice. (B) Survival curve of Rag<sup>-/-</sup> mice transplanted with WT [WT→Rag<sup>-/-</sup>] or IL-7<sup>-/-</sup> [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] BM cells. (C) Body weight of [WT→Rag<sup>-/-</sup>] and [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] after SCT. For day 34, P-values were determined by a Mann-Whitney test (\*p≤0.05). A weight loss of 25% and more was considered a survival endpoint entailing euthanasia. P-values were determined by a LogRank test (\*\*\*p≤0.0005) (D) Visual examination of mice at day +34 post-SCT (E) Histopathology analysis of the small intestine, colon, liver, and skin viewed at 10X after hematoxylin and Eosin staining. (F) Dot plot showing CD44 and CD62L expression on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from LN. (G) Percentage of CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>D62L<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T cells from LN. Data are representative of 3 or more experiment, N=10 per groups. Results show mean +/- s.e.m.

**Figure 2: The disease that developed in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] can be transferred to Rag<sup>-/-</sup> recipient by CD4<sup>+</sup> T cells.**

(A) Schematic representation of the transplantation experiment. (B) Survival curve of Rag<sup>-/-</sup> mice after adoptive transfer of T cells isolated from the spleen of day +35 [WT→Rag<sup>-/-</sup>] or IL-7<sup>-/-</sup> [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice. P-values were determined by a LogRank test (\*\*\*p≤0.0005) (C) Survival curve of Rag<sup>-/-</sup> mice after adoptive transfer of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells enriched from day +35 [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice. P-values were determined by a LogRank test (\*p≤0.05) (D) Survival curve of Irradiated WT, Rag<sup>-/-</sup>, IL-7Rα<sup>-/-</sup> and Rag<sup>-/-</sup>IL-7<sup>-/-</sup> mice after adoptive transfer of T lymphocytes enriched from day +35 [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice. P-values were determined by a LogRank test (\*\*\*p≤0.0005) (E) Dot plot showing the expression of CD44 and CD62L expression on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells recovered from the spleen of Irradiated WT, Rag<sup>-/-</sup>, IL-7Rα<sup>-/-</sup> and Rag<sup>-/-</sup>

IL-7<sup>-/-</sup> mice that received enriched T lymphocytes from day +35 [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice. Data are representative of 2 or more experiments, N=3-5 mice per groups. Results show mean +/- s.e.m.

**Figure 3: Thymus recovery in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice is followed by severe thymus involution**

(A) Dot plot showing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> expression on thymocytes obtained from [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] at day 7, 14, 21, 28, and 35 post-SCT. (B) Histogram showing thymocyte counts Total cell counts in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] at day 7, 14, 21, 28, and 35 post-SCT. (C) Flow cytometric analysis showing the expression of CD24, CD5 and CD69 on single positive CD4<sup>+</sup> thymocytes. (D) Dot plot showing the expression of CD24 and Qa2<sup>+</sup> on single positive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> thymocytes from [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice at day +35 post-SCT. (E) Histogram showing the proportion of singly positive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> thymocytes expressing Qa2 antigen at day +21 and +25 post-SCT in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice. Data are representative of 3 independent experiments, N=3-4 mice per groups. Results show mean +/- s.e.m. P-values were determined by a Mann-Whitney test (\*p≤0.05)

**Figure 4: Evaluation of peripheral lymphocyte reconstitution in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice.**

(A) Histograms showing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts in the spleen and LN of [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice at indicate time points. (B) Intracellular flow cytometric analysis of IFN-γ and IL-17 produced by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T in day +35 post-SCT [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. (C) Histograms showing the percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells producing IFN-γ and IL-17 in day +35 post-SCT [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. (D) Evaluation of the Vβ repertoire in CD4<sup>+</sup> T cells from the spleen of day +35 [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. Results are from 3 independent experiments. N = 3-4 per group. For the Vβ experiment, splenocytes were pooled from 3 mice and the experiment was repeated twice. P-values were determined by a Mann-Whitney test (\*p≤0.05)

**Figure 5: Evaluation of Tregs immune reconstitution and function in [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice.**

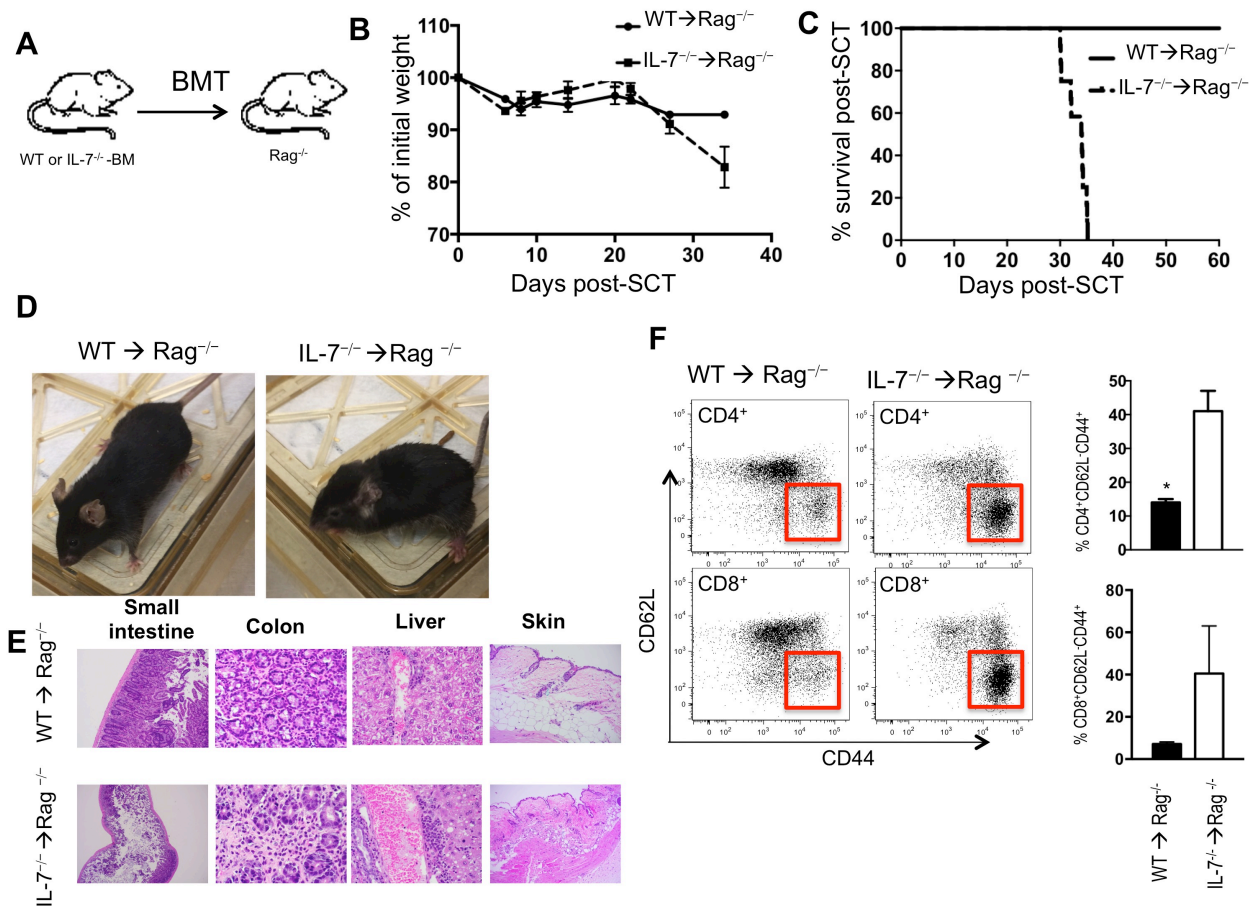
(A) Histograms showing the absolute numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the thymus of control C57BL6 wild type mice and [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and

[WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice at indicated time points. (B) Histograms showing the absolute numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the spleen of [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice at indicated time points. (C) Flow cytometry histogram showing the expression of CD25, FoxP3, LAG3, PD-1, GITR, CTLA-4. Expression levels of these receptors were gated on CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. (D) In vitro evaluation of the suppressive functions of Tregs by flow cytometry. Histogram showing the dilution of CTV labelled primed T cells exposed to Tregs and non-Tregs cells. (E) In vivo evaluation of the suppressive function of Tregs. Tregs and non-Tregs CD4<sup>+</sup> T cells isolated from [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice were transferred into Rag<sup>-/-</sup> recipient at indicated ratio. Data are representative of 2 independent experiments. n=2 per group. P-values were determined by a LogRank test (\*p≤0.05). For A and B, results show mean +/- s.e.m, N= 3-4. P-values were determined by Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn's test (\*p≤0,05).

**Figure 6: Evaluation of stromal cells and dendritic cells in the thymus of [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice.** (A) Flow cytometry analysis performed on the thymus of day+21 post-SCT [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. R1 shows TECs based on the expression of CD45<sup>+</sup> and EpCAM<sup>+</sup>. Flow cytometry histograms show mTECs (CD45<sup>+</sup>Ly51<sup>low</sup> UE-A1<sup>+</sup>) in indicated mice. (B) Histogram showing the absolute number of TECs, mTECs, and cTECs in indicated mice. (C) Flow cytometry histograms showing MHC class II, Aire, and CD80 expression by mTECs. (D) Histogram showing the mean fluorescence intensity (MFI) of MCH class II, Aire and CD80 on mTECs from [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. (E) Flow cytometry plots showing thymic cDCs (CD11<sup>high</sup>CD45RA<sup>+</sup>) and pDCs (CD11c<sup>int</sup>CD45RA<sup>+</sup>). CD8<sup>+</sup>Sirpα<sup>-</sup> (CD8α<sup>+</sup>DCs) and CD8<sup>lo</sup>Sirpα<sup>+</sup> (Sirpα<sup>+</sup>DCs) were identified by gating on cDCs (CD11<sup>high</sup>CD45RA<sup>+</sup>). (F) Histogram showing the absolute number of cDCs, CD8α<sup>+</sup>DCs, Sirpα<sup>+</sup>DCs and pDCs in the thymus of day +21 post-SCT [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. (G) Flow cytometry histograms showing the expression of MCH II, CD40, CD80, and CD86 on CD8α<sup>+</sup> DCs from day +21 post-SCT [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. (H) Histogram showing the mean value of MFI expression of MCH II, CD40, CD80, and CD86 on CD8α<sup>+</sup> DCs from day +21 post-SCT [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] and [WT→Rag<sup>-/-</sup>] mice. Data are representative of 2 independent experiments with n=2-4 mice per group. Results show mean +/- s.e.m. P-values were determined by Kruskal-Wallis test (\*p≤0,05).

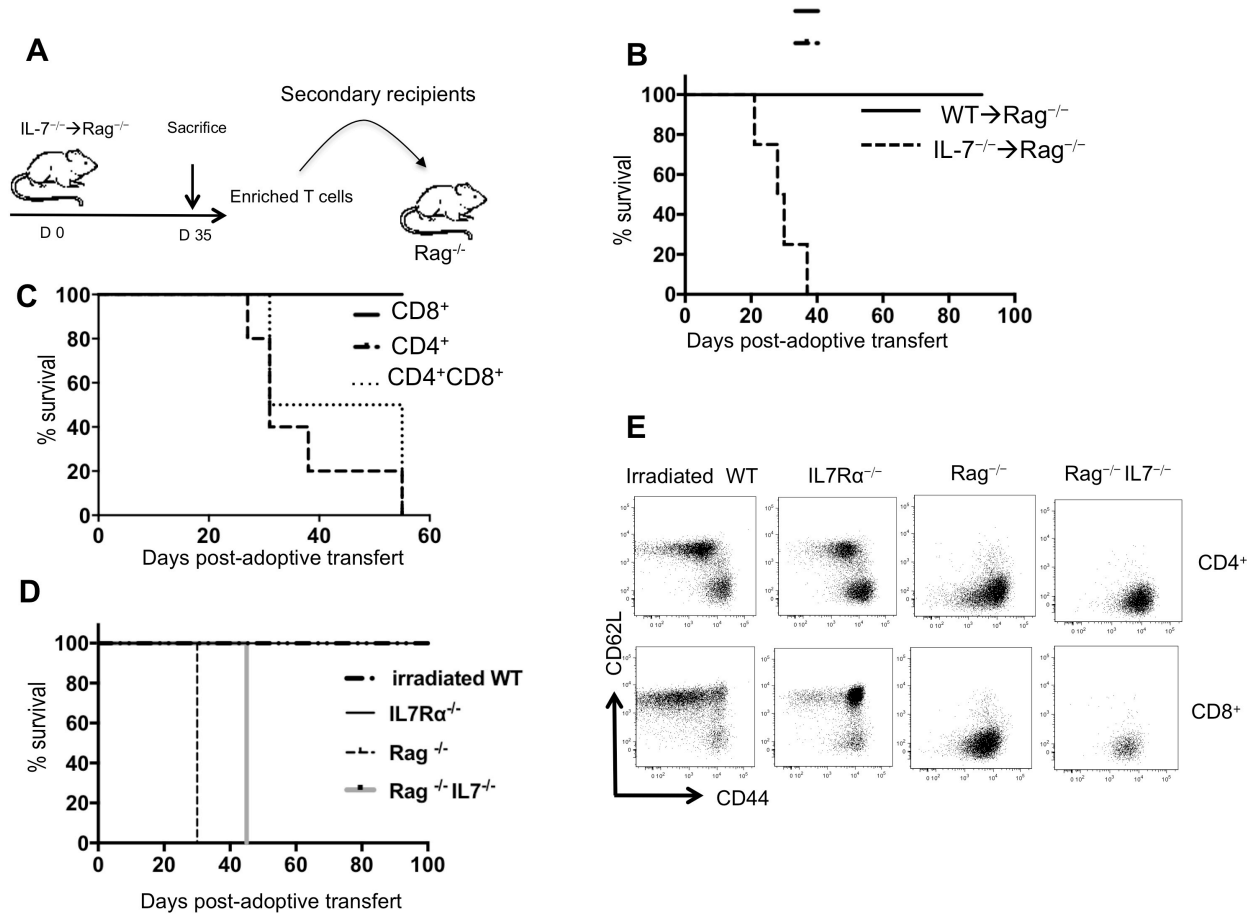
**Figure 7: Treatment with antibiotic reduces gut inflammation and restores T cell homeostasis.** (A) Picture of control [WT→Rag<sup>-/-</sup>], [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] treated with antibiotic, and [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] at day +35 post-SCT. (B) Survival curve of [WT→Rag<sup>-/-</sup>], [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] treated with antibiotic, and [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice. P-values were determined by a LogRank test (\*p≤0.05). (C) Length of the colon of [WT→Rag<sup>-/-</sup>], [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] treated with antibiotic, and [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] at day +35 post-SCT. (D) Histograms showing the mean average colon length in centimeter. (E) Representative Flow cytometry analysis of CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> (Th17), CD4<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup> (Th1), and CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup> (Th17/Th1) in indicated mice. (F) Histogram showing the absolute number of CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> (Th17), CD4<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup> (Th1) in the colon of day +35 post-SCT [WT<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>], [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] treated with antibiotic, and [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] mice. (G) Size of the thymus at day +35 post-SCT of indicated mice on a metric scale. (H) Representative flow cytometry of thymocytes based on CD4 and CD8 receptor expression in indicated mice 35 days post-SCT. (I) Thymocyte counts in indicated mice 35 days post-SCT. Data are representative results of three independent experiments with 2-4 mice per group. Results show mean +/- s.e.m. P-values were determined by Kruskal-Wallis test (\*p≤0,05; \*\*p≤0,005).

**Figure 1**

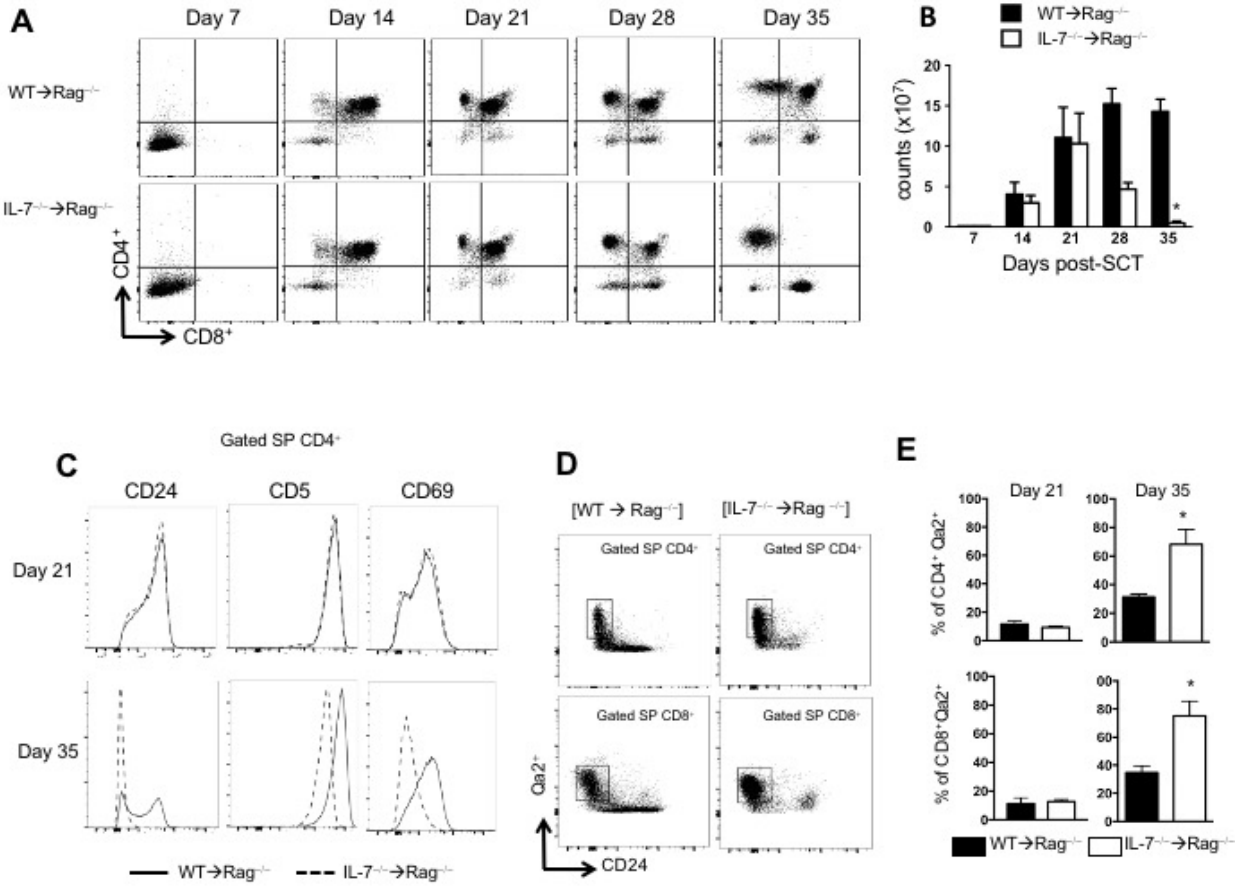




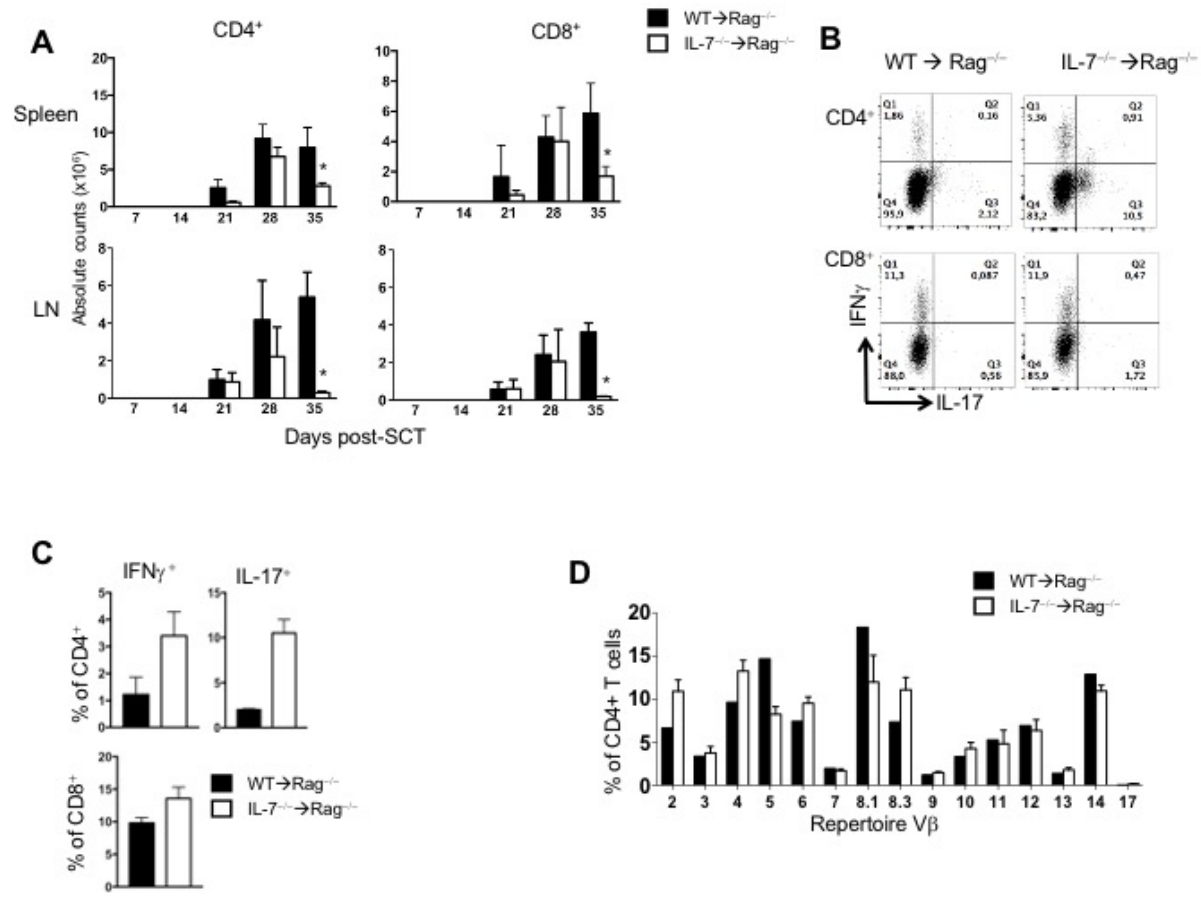
**Figure 2**



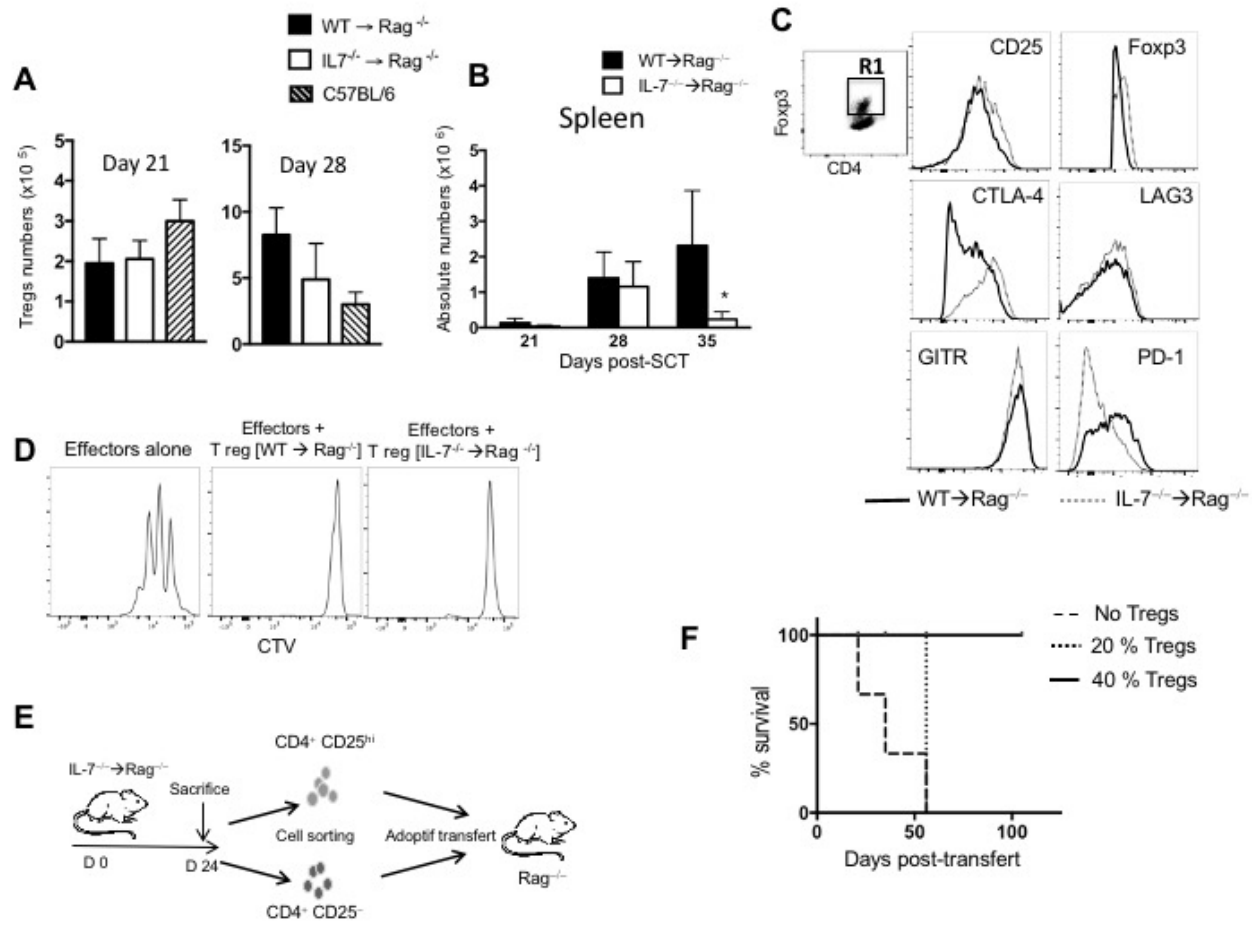
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

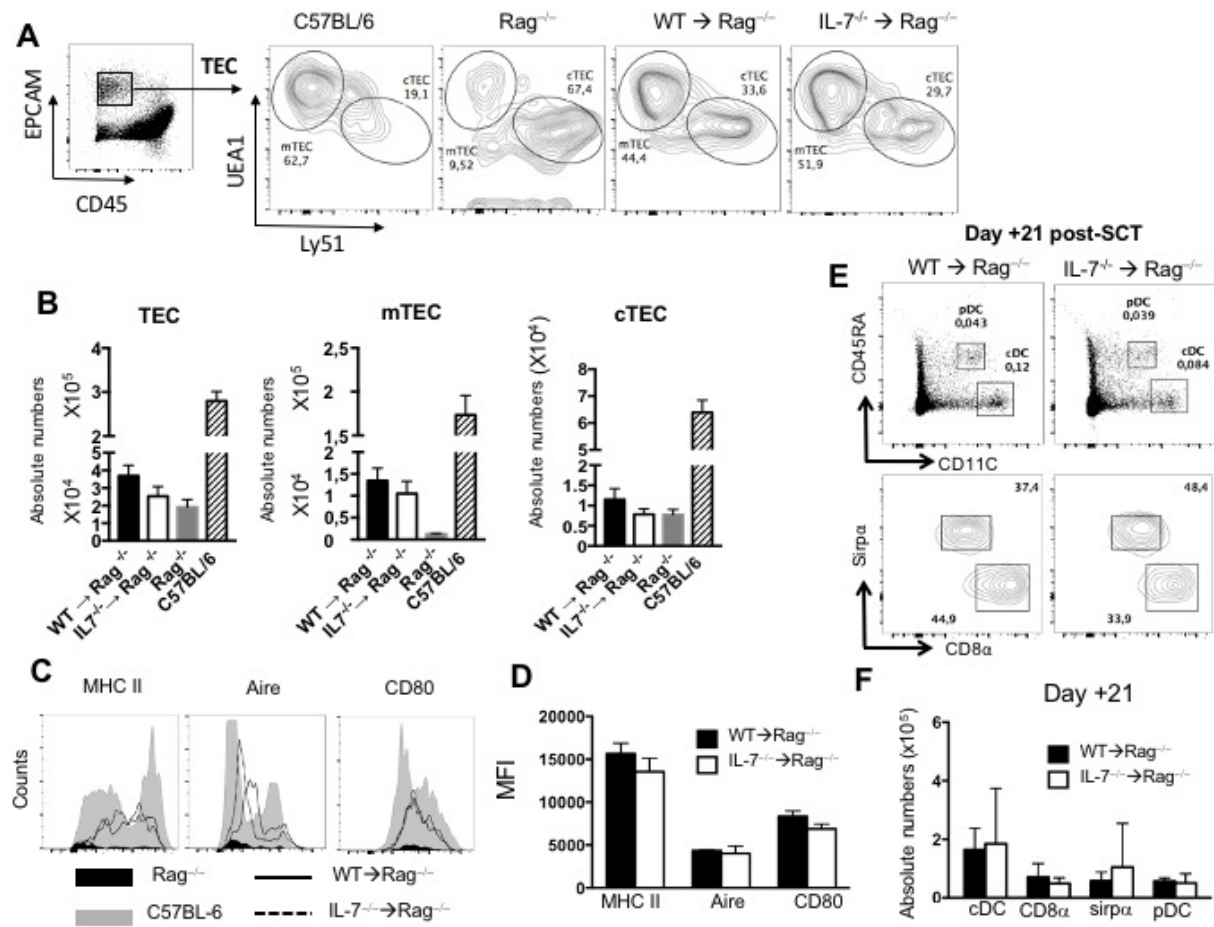
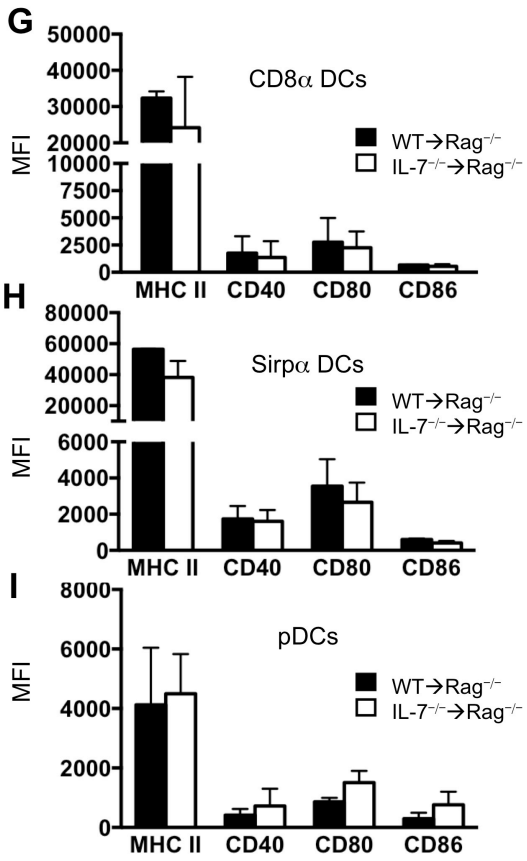
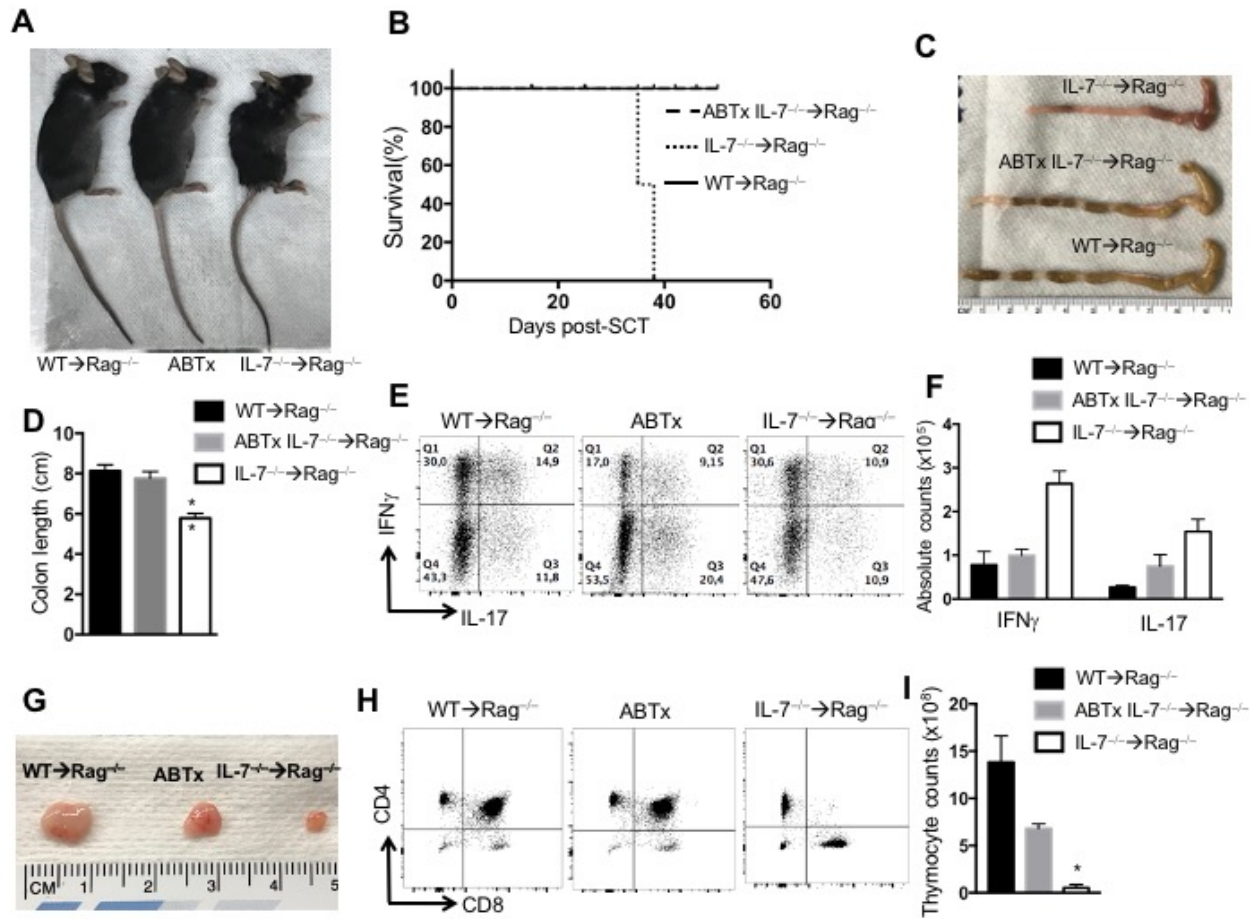


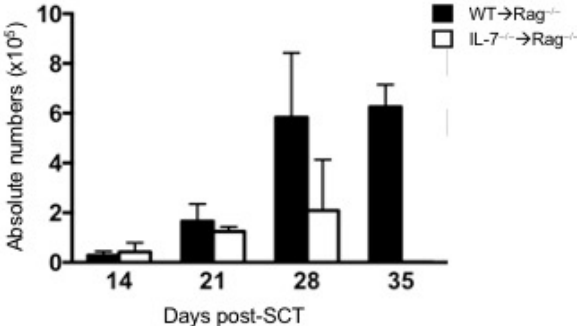
Figure 6 (suite)



**Figure 7**



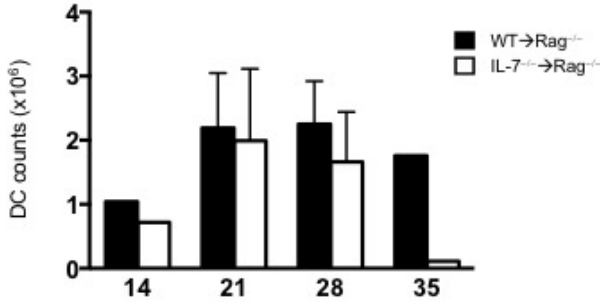
Supplementary Figure 1



**Supplementary Figure 1:** Absolute number of dendritic cells CD11c<sup>+</sup>IAIE<sup>+</sup> in thymus of [WT→Rag<sup>-/-</sup>] and [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] at indicated time points post-SCT.



**Supplementary Figure 2**



**Supplementary Figure 2:** Absolute number of dendritic cells CD11C<sup>+</sup>IAIE<sup>+</sup> in spleen of [WT→Rag<sup>-/-</sup>] and [IL-7<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>] at indicated time points post-SCT.

## **CHAPITRE 4 : Discussion et Perspectives**

### **4. L'axe IL7/IL7R $\alpha$ et les CD dans la reconstitution et l'homéostasie des lymphocytes T**

L'interleukine-7 (IL-7) est une cytokine connue depuis longtemps dans le domaine de l'immunologie, principalement pour ses effets dans le développement et l'homéostasie des LT et LB. Au cours de ces dernières années, cette cytokine apparaît avoir un champ d'activité beaucoup plus large, cela dans des conditions tout aussi physiologiques que physiopathologiques comme par exemple dans une variété de maladies auto-immunes ou le cancer. Dans l'ensemble de ces contextes, la contribution de l'IL-7 implique nécessairement deux paramètres : la source et le récepteur de l'IL-7. L'IL-7 est produite dans plusieurs tissus et signale via son récepteur l'IL-7R $\alpha$ , à partir duquel vont s'enclencher différentes cascades de signalisation qui sont mobilisées chacune séparément et dont certaines chevauchent avec celles du TCR. L'objectif de cette thèse était d'étudier la contribution de l'axe IL-7/ IL-7R $\alpha$  et des CD dans la reconstitution immunitaire et l'homéostasie des LT dans deux contextes thérapeutiques différents (traitement par imatinib et greffe de MO) : Dans le chapitre 2, nous avons mis en évidence une perturbation de la signalisation de l'IL-7 dans les LT en plus d'une anomalie quantitative des CD suite à une interférence avec l'imatinib. Dans le chapitre 3, nous avons démontré un rôle crucial de l'IL-7 produite par les cellules hématopoïétiques dans la reconstitution immunitaire après greffe de MO.

## **4.1. Effet de l'imatinib sur l'homéostasie des lymphocytes T**

### **4.1.1. L'axe IL7/IL7R $\alpha$ dans l'altération de l'homéostasie des lymphocytes T chez les patients atteints de LMC traités avec de l'imatinib**

L'IL-7 est produite par les cellules stromales qui tapissent divers organes incluant le thymus, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, la peau, l'intestin, le foie et également produite par les CD (Fry and Mackall, 2002). Comme mentionné dans l'introduction, la signalisation de l'IL-7 est initiée par sa liaison à l'IL-7R $\alpha$ , puis le recrutement de la chaîne  $\gamma c$ . Ces deux composantes ensemble sont à l'origine de la mobilisation de diverses voies de signalisation : JAK/STAT, PI3K/AKT. Une délétion de Jak3,  $\gamma c$ , Stat5 entraîne une profonde lymphopénie (Nosaka et al., 1995; Park et al., 1995; Cao et al., 1995; DiSanto et al., 1995; Suzuki et al., 2000; Yao et al., 2006). En accord avec cet aspect essentiel de l'intégrité de la signalisation de l'IL-7 dans l'homéostasie des LT, nos résultats présentés dans l'article 1, démontrent que la lymphopénie sévère observée chez les patients atteints de LMC et traités par l'imatinib, serait liée à une altération de la signalisation de l'IL-7 au niveau de p-STAT5 induite par l'imatinib (Section 4.1).

### **4.1.2. L'imatinib induit une altération de la signalisation de l'IL-7 au niveau des lymphocytes T**

L'imatinib est le traitement de première intention chez les patients atteints de LMC liée au chromosome de Philadelphie. L'action principale de l'imatinib consiste à inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase de la protéine de fusion BCR-ABL notamment la phosphorylation de

STAT-5 (p-STAT5) dans les cellules leucémiques. Cependant, malgré la spécificité de l'imatinib pour BCR-ABL, l'effet inhibiteur de l'imatinib peut également interférer avec des voies de signalisation dans des cellules immunitaires saines (Appel et al., 2005). Des études expérimentales in vitro ont démontré que l'imatinib inhibe l'activation et la prolifération des LT normaux (Cwynarski et al., 2004; Seggewiss et al., 2005; Boissel et al., 2006; Legros et al., 2012). De plus, chez les patients atteints de LMC, une lymphopénie sévère est décrite. En accord avec ces observations, nos analyses de PBMC de patients atteints de LMC ont montré une lymphopénie des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> qui est d'autant plus sévère chez les patients traités à l'imatinib (Article 1, figure 1a-c). Legros et al, ont démontré une contribution du facteur Fas induite par l'imatinib dans les LT activés favorisant la mort cellulaire (Legros et al., 2012). Bien que chez les patients LMC sous imatinib, la lymphopénie ait été caractérisée, les mécanismes d'action impliqués restent très peu étudiés. L'objectif de l'article 1 était d'évaluer l'implication de l'axe IL-7/ IL-7R $\alpha$  dans la lymphopénie observée chez les patients atteints de LMC traités par l'imatinib. Connaissant le rôle central de l'axe IL-7/IL-7R $\alpha$  dans l'homéostasie des LT, nous avons dans un premier temps analysé la signalisation de l'IL-7 sur des LT de sujets sains en présence d'imatinib. Pour cela, nous avons mené une étude in vitro à partir de PBMC humains cultivés en présence de 3  $\mu$ m d'imatinib suivie d'une stimulation par l'IL-7 à différentes concentrations. Alors que 0,5 et 1ng/ml d'IL-7 sont suffisants pour induire p-STAT5 dans les lymphocytes T, des concentrations beaucoup plus élevées d'IL-7 sont nécessaires lorsque ces cellules sont exposées à 3  $\mu$ m d'imatinib (Article 1, figure 1e). Ces résultats démontrent une altération de la signalisation de l'IL-7 notamment une baisse de la sensibilité dans la phosphorylation de STAT5 suite à une stimulation par l'IL-7.

### **4.1.3. L'imatinib affecte la survie et non la capacité proliférative des lymphocytes T**

Larmonier et al ont démontré une réduction de l'activation des facteurs de transcription STAT3 et STAT5 par l'imatinib dans les Treg. En plus de cette observation, l'analyse de la cascade de signalisation induite par le TCR des Treg a révélé une inhibition de la phosphorylation de ZAP70 et de LAT sous l'action de l'imatinib (Larmonier et al., 2008). Ces observations corroborent avec nos résultats qui démontrent un effet de l'imatinib sur la signalisation du TCR en montrant l'inhibition de la phosphorylation de ERK-1/2 en réponse à une stimulation sous-optimale du TCR des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> exposés à 3 µm d'imatinib (Article 1, figure 1d). L'ensemble de nos analyses in vitro démontrent une perturbation de la signalisation de l'IL-7 et du TCR induite par l'imatinib. À partir de ce résultat et compte tenu du rôle crucial de l'IL-7 et du TCR pour la survie et la prolifération homéostatique des LT, notre prochaine étape a été d'évaluer l'action de l'imatinib sur l'homéostasie des LT in vivo. Nous avons élaboré un modèle in vivo basé sur un transfert adoptif de LT WT marqués au CTV dans des souris receveuses syngéniques lymphopéniques traitées à l'imatinib par gavage (Article 1, Figure 2a). Les résultats in vivo démontrent que malgré les faibles comptes de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> observés chez les souris traitées à l'imatinib, les LT maintiennent leur capacité proliférative (Article 1, Figure 2b-d). Le rôle non redondant des signaux de l'IL-7Rα pour la prolifération homéostatique est parfaitement démontré par la prolifération altérée des LT IL-7Rα<sup>-/-</sup> (Osborne et al., 2007). En considérant cette observation, comment expliquer ici, ce maintien de la prolifération des LT suite à une perturbation de la signalisation de l'IL-7 ?

Plusieurs études ont décrit des activités distinctes des voies de signalisation induites par l'IL-7 qui pourraient être liées à différents états des LT à savoir la survie, prolifération ou l'activation.

En effet la voie JAK / STAT5 semblerait induire des signaux de survie via l'expression de BCL2 tandis que la voie PI3K / AKT favoriserait la prolifération cellulaire et l'activation (Crawley et al., 2014). La voie PI3K/AKT est une voie en aval commune à la signalisation de l'IL7 et du TCR. Dans l'homéostasie des LT naïfs, il est prouvé que l'IL-7 peut agir en synergie avec les signaux du TCR pour favoriser à la fois la survie et l'induction de la prolifération homéostatique. Ainsi le maintien de la capacité proliférative des LT que nous avons observée dans les souris traitées à l'imatinib, laisse penser que le TCR serait suffisamment fonctionnel pour signaler en synergie avec l'IL-7 possiblement via la voie PI3K pour soutenir la prolifération. En revanche la lymphopénie des LT en présence d'imatinib serait principalement associée à un défaut de survie induit par l'inhibition de la signalisation de l'IL-7 via p-STAT5. Un autre point à souligner est que l'inhibition de la signalisation du TCR par l'Imatinib pourrait également contribuer aux faibles quantités des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Cependant, avec nos résultats obtenus à partir d'un test in vitro montrant une légère altération de la phosphorylation de ERK, il est difficile de transposer cette observation à ce qui se passe in vivo.

## **4.2. Les CD : une cible et une source pour l'IL-7**

L'IL-7 est décrite comme un facteur qui participe au développement des cellules dendritiques (voir section 4.2.1) et certaines populations de CD normales produisent également de l'IL-7 (voir section 4.3.1).

### **4.2.1. Altération des cellules dendritiques en présence d'imatinib**

Des études antérieures ont démontré une modulation négative du développement en plus d'une altération fonctionnelle des CD induite par l'imatinib (Appel et al., 2005; Appel et al., 2004). En accord avec ces précédentes observations, nous avons constaté une baisse drastique des CD incluant les mDC1, mDC2 et mDC3 ainsi que les pDC chez les patients atteints de LMC lors du diagnostic. Cette réduction des différents sous-types de CD est encore plus significative chez les patients traités par l'imatinib (Article 1, Figure 2e). L'ensemble de ces données démontre que l'imatinib est un facteur aggravant la perturbation du pool des CD. Cette régulation négative de l'homéostasie des CD par l'imatinib est d'autant plus confirmée par la diminution du nombre de CD observée dans notre modèle murin traité avec de l'imatinib (Article 1, Figure 2c). Les CD et l'IL-7 sont deux facteurs essentiels pour les LT et une déficience de l'un de ces facteurs pourrait diminuer la survie et la PH des LT (Gauthier et al., 2015; Moutouou et al., 2018). Dans notre étude, la perturbation du pool des CD observée pourrait également favoriser/contribuer à la lymphopénie observée chez les patients et le modèle murin traités avec de l'imatinib.

Pour expliquer la perturbation du pool des CD par l'imatinib, plusieurs possibilités ont été démontrées, à savoir une inhibition non spécifique de Flt3-L ou encore une interférence de l'imatinib avec le GM-CSF (Taieb et al., 2004; Medina et al., 2019). Dans notre laboratoire, la culture de cellules CD34<sup>+</sup> normales avec du GM-CSF ou Flt3-L en présence d'imatinib a révélé une altération significative de la différenciation des cellules CD34<sup>+</sup> en CD (données observées au laboratoire).

Dans nos travaux, chez les patients atteints de LMC puis traités avec de l'imatinib, nous avons mis en évidence une perturbation de la signalisation de l'IL-7 dans les LT suite à une inférence avec l'imatinib. Sachant que l'expression de l'IL7R $\alpha$  par différents sous-ensembles de CD est

bien connue et cette expression, semble jouer un rôle dans le développement et l'homéostasie des CD (Reche et al., 2001; Guimond et al., 2009; Vogt et al., 2009; Fry and Mackall, 2002), quel est l'impact de la perturbation de la signalisation de l'IL-7 induite par l'imatinib sur les CD ? Il a été démontré que bien que tous les sous-populations de CD connues puissent être détectées chez les souris IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> et IL-7<sup>-/-</sup>, la perte de signalisation de l'IL-7 pourrait affecter le nombre des cDC et de pDC (Yang et al., 2005; Vogt et al., 2009). Ces études et nos résultats laissent penser que l'imatinib pourrait tout comme pour les LT, affecter le développement et le pool des CD en altérant la signalisation de l'axe IL7/ IL-7R $\alpha$ .

### **4.3. Les CD et l'IL-7 dans la reconstitution des lymphocytes T**

#### **4.3.1. Les CD : une source d'IL-7, quel rôle dans le développement des lymphocytes T ?**

Dans le thymus, les cellules stromales constituent la principale source d'IL-7 et un petit nombre d'études a montré que les CD constituaient également une source d'IL-7 toutefois sa contribution dans le thymus n'a jamais été évaluée (Kroncke et al., 1996; de Saint-Vis et al., 1998; Sorg et al., 1998; Guimond et al., 2009; Zubkova et al., 2005).

Au niveau fonctionnel, la souris déficiente en IL-7 démontrant une diminution de la cellularité thymique et une lymphopénie sévère, représente le modèle murin idéal pour illustrer la fonction globale de l'IL-7 (von Freeden-Jeffry et al., 1995). Cependant très peu d'études se sont intéressées à la compréhension de la fonction locale de l'IL-7 au sein des différents organes



caractérisés comme source d'IL-7. En ce qui concerne le thymus, le groupe de Koichi Ikuta a généré des souris knock-out conditionnellement déficientes pour l'expression d'IL-7 par les TEC. Ces souris ont une réduction significative des LT  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  (Shitara et al., 2013). Sachant que dans le thymus, les CD constituent également une source d'IL-7 et compte tenu du rôle crucial de ces cellules dans la thymopoïèse, quelles seraient les conséquences d'une déficience d'IL-7 dans les CD ? Face à cette interrogation, l'objectif de l'article 2 avait pour but d'étudier le rôle de l'IL-7 produite par les cellules dendritiques dans la reconstitution des LT après greffe de MO. Les résultats présentés dans l'article 2 démontrent pour la première fois dans la littérature que la déficience de production d'IL-7 par les cellules hématopoïétiques entraîne une maladie auto-immune dans un contexte de reconstitution immunitaire après greffe de moelle osseuse (Article 2).

#### **4.3.2. La greffe de MO IL-7<sup>-/-</sup> dans les souris Rag<sup>-/-</sup> conduit à une maladie auto-immune systémique létale lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dépendante.**

Pour évaluer la contribution de l'IL-7 produite par les cellules hématopoïétiques dans la reconstitution immunitaire et l'homéostasie lymphocytaire, nous avons généré un modèle murin permettant d'exclure la production d'IL-7 d'origine hématopoïétique après greffe de MO IL-7<sup>-/-</sup> dans des souris Rag<sup>-/-</sup> (Article 2, Figure 1 A). Les souris Rag<sup>-/-</sup> reconstituées avec la MO IL-7<sup>-/-</sup> développent une maladie auto-immune systémique et létale après 4 semaines post-greffe (Article 2, Figure 1). Le caractère auto-immun de certaines maladies, telles que l'IBD, l'EAE, le DT1...etc, est démontré entre autres par la capacité à récapituler la maladie dans des hôtes syngéniques initialement saines après un transfert adoptif de LT de souris malades (Ortega et al., 2013; Haskins and McDuffie, 1990; Peterson and Haskins, 1996 ; Christianson et al., 1993;

Sharma et al., 2009; Malchow et al., 2016). Dans les organes lymphoïdes secondaires des souris malades, nous avons observé une forte accumulation de LT CD4<sup>+</sup> et de LT CD8<sup>+</sup> activés. Pour vérifier le caractère autoréactif des LT activés des souris malades, nous avons effectué un transfert adoptif de LT de souris malades dans des souris lymphopéniques versus des souris WT syngéniques. Nos données ont démontré la possibilité d'induire la maladie uniquement dans des souris receveuses saines Rag<sup>-/-</sup> après le transfert des LT CD4<sup>+</sup> et non des LT CD8<sup>+</sup> seuls (Article 2, Figure 2). Cette observation soutient fortement le caractère autoréactif du répertoire des LT CD4<sup>+</sup> des souris malades. Pourquoi les LT CD4<sup>+</sup> et non les LT CD8<sup>+</sup> ? Pour expliquer ce résultat, il a été démontré que pour les LT CD8<sup>+</sup>, les CD pourraient ne pas être nécessaires et de plus leur absence peut être comblée par la présence d'autres cellules exprimant le CMH I telles que les cellules stromales. En revanche, pour le développement et l'homéostasie des LT CD4<sup>+</sup>, les interactions étroites avec les CD demeurent indispensables (Gallegos and Bevan, 2006; Ohnmacht et al., 2009; Gauthier et al., 2019). L'ablation des CD ou un déficit constitutif des CD entraîne une perturbation de la différenciation des LT, ce qui engendre une production massive de LT CD4<sup>+</sup> autoréactifs mais un répertoire inchangé de LT CD8<sup>+</sup> (Teshima et al., 2003; Ohnmacht et al., 2009; Huang et al., 2014). Les symptômes cliniques observés dans ces souris incluent une perte de poids sévère, une colite létale avec une fréquence élevée de LT CD4<sup>+</sup> activés de type Th1, Th17 observée dans les organes lymphoïdes et l'intestin. Ces observations sont très similaires avec nos données obtenues chez les souris reconstituées avec la MO IL-7<sup>-/-</sup> et de telles similitudes suggèrent une contribution des CD avec un rôle possible de l'IL-7 d'origine hématopoïétique dans l'induction de la tolérance des LT CD4<sup>+</sup>.

### **4.3.3. L'interleukine-7 dans la lymphopénie: un médiateur clé dans l'auto-immunité induite par les lymphocytes T**

La greffe de cellules hématopoïétiques après un traitement myéloablatif comme la radiothérapie, implique une période de lymphopénie sévère avant la reconstitution comme observée dans nos résultats de la cinétique de la reconstitution des LT en périphérie qui demeure très faible avant J 28 post-greffe (Article 2, Figure 4A). Il est bien connu que la grande disponibilité en cytokines homéostatiques telles que l'IL-7, associée à la lymphopénie, peut soutenir non seulement la prolifération du pool des LT normaux mais également à la prolifération et l'activation des LT autoréactifs (Calzascia et al., 2008; Jameson, 2002; Krupica et al., 2006; Le Champion et al., 2009). Nos résultats ont montré que chez les souris reconstituées avec la MO IL-7<sup>-/-</sup>, les LT nouvellement générés en périphérie semblent contenir une proportion accrue de cellules fortement autoréactives (Article 2, Figure 2). Dans ce contexte, notre hypothèse est que la lymphopénie impliquant des concentrations élevées d'IL-7 systémique, aurait un rôle critique dans l'expansion des LT CD4<sup>+</sup> autoréactifs nouvellement générés mais également dans la potentialisation de la signalisation du TCR.

Des études ont montré que l'inhibition de la signalisation de l'IL-7 réduit efficacement la gravité de diverses maladies auto-immunes (Calzascia et al., 2008; Gonzalez-Quintial et al., 2011; Penaranda et al., 2012). Pour évaluer ce point 3 semaines après greffe, nous aurions pu injecter, un anticorps neutralisant l'IL-7 dans nos souris reconstituées avec la MO IL-7<sup>-/-</sup>, ce qui induirait possiblement une diminution de l'expansion et l'activation des LT autoréactifs médiée par l'IL-7 systémique.

Dans notre étude nous démontrons que le transfert adoptif des LT de souris malades dans différentes souches lymphopéniques, que seules les souris Rag<sup>-/-</sup> et la souris double knockout

Rag<sup>-/-</sup> IL-7<sup>-/-</sup> récapitulent la maladie (Article 2, Figure 2D). Une explication face à cette observation, implique la contribution d'autres facteurs spécifiques au fond génétique de la souris Rag Knock-out notamment l'environnement thymique et le microbiote que nous évoquerons dans les sections suivantes.

#### **4.3.4. La production de l'IL-7 par les CD : un possible rôle compensatoire face à l'altération quantitative des TEC ?**

Il a été démontré que les CD thymiques aussi bien les résidentes que les CD migratoires participent à la médiation de la sélection négative de thymocytes en développement (Wu and Shortman, 2005; Irla et al., 2010; Hadeiba et al., 2012). L'analyse quantitative et qualitative des différents sous-types de CD n'a révélé aucune différence entre les souris reconstituées avec la MO IL-7<sup>-/-</sup> et les souris greffées avec la moelle WT (Article 2, Figure 6E-F-G). Ce résultat indique que mis à part le déficit de production d'IL-7 par les CD, il n'y a pas de différence phénotypique pouvant affecter la reconstitution immunitaire.

Nous avons démontré que seules des souris Rag<sup>-/-</sup> et non des WT reconstituées avec la moelle IL-7<sup>-/-</sup> développaient une maladie auto-immune. L'analyse de la médulla des chimères reconstitués avec la MO IL7<sup>-/-</sup> vs la MO WT, a montré une réduction significative des TEC comparativement à une souris WT non irradiée (Article 2, Figure 6A-B), cela malgré une reconstitution thymique normale observée dans ces chimères à J 21. Mais comment expliquer ce résultat ?

La médulla occupe un rôle central dans la maturation et la sélection des thymocytes SP. Et inversement, le développement, l'organisation et le maintien de la médulla sont régulés par des

interactions avec les thymocytes SP (Irla et al., 2008). Dans la souris Rag<sup>-/-</sup>, l'arrêt précoce de la différenciation des thymocytes résulte d'une atrophie thymique, une désorganisation de l'architecture, une anomalie de la composition thymique et de la formation de la médulla. (Anderson et al., 2000b; Prockop and Petrie, 2004; Zamisch et al., 2005; Marrella et al., 2014). Chez l'homme, la mutation des gènes Rag1 et Rag2 est associée au syndrome d'Omenn montrant une déficience des mécanismes de la tolérance centrale due entre autres à une altération de l'environnement thymique (Marrella et al., 2014). L'ensemble de ces études, nous a conduit à envisager l'hypothèse que l'environnement thymique de la souris Rag<sup>-/-</sup> pourrait être un facteur important qui favoriserait une altération de la sélection négative des thymocytes autoréactifs et par conséquent une maladie auto-immune. Sauf que malgré la réduction similaire des mTEC observée dans nos chimères reconstituées avec la MO IL7<sup>-/-</sup> vs la MO WT, les souris reconstituées avec la MO WT n'ont pas développé la maladie. Cette observation suggère que face à la réduction des TEC observée dans nos chimères reconstituées avec la MO IL7<sup>-/-</sup> vs la MO WT, un apport d'IL-7 produite par les CSH, probablement par les CD serait nécessaire pour prévenir l'auto-immunité. Par le système de culture sur des silices thymiques combiné à la microscopie à deux photons, l'équipe de E. Robbey a démontré des interactions successives entre thymocytes/CD, estimées à environ 500 CD/thymocyte pendant leur séjour dans la médulla (Le Borgne et al., 2009). Cette polygamie des thymocytes offre la possibilité de prévenir la maladie par l'apport de CD fonctionnelles dans un contexte de déficience en CD. Ceci expliquerait le fait que les Rag<sup>-/-</sup> reconstituées avec la combinaison de MO [WT + IL-7<sup>-/-</sup>] ne développent pas la maladie et ont un profil thymique similaire à la souris WT (Annexe Figure 1). Pour l'aspect quantitatif, une étude a démontré la nécessité d'un minimum de 1 CD pour 200 thymocytes pour assurer la tolérance centrale (Matzinger and Guerder, 1989). Par conséquent, ce n'est qu'en cas d'une suppression complète des CD thymiques qu'une maladie auto-immune peut se développer.

Nous avons testé différents ratios dans la combinaison de MO [WT + IL-7<sup>-/-</sup>]. Alors que les souris reconstituées avec une combinaison de 50 : 50 % sont protégées contre la maladie, les souris ayant reçu la mixture (10%+ 90%) de MO WT + IL-7<sup>-/-</sup> développent la maladie. Ces souris malades démontrent notamment une atrophie thymique semblable à celle des souris reconstituées avec 100% de MO IL-7<sup>-/-</sup> (Annexe Figure 1). Ainsi pour contrer la maladie, des quantités importantes de CSH WT sont requises. L'ensemble de ces données soutiennent fortement un rôle essentiel de l'IL-7 produite par les CSH en l'occurrence les CD pour prévenir la maladie dans un environnement thymique altéré.

Marella et al, ont démontré l'effet in vivo de l'administration d'anticorps monoclonal anti-CD3ε (mAb) chez des souris Rag<sup>-/-</sup> mimant le syndrom d'Omenn. Bien qu'aucun changement significatif n'ait été observé dans le thymus des souris adultes, l'injection de l'anti-CD3ε au stade néonatal favoriserait une amélioration significative de la cellularité des TEC et de la morphologie du thymus, avec l'apparition de zones distinctes : le cortex et la médulla (Marrella et al., 2012). Dans nos travaux décrit ici, nous pourrions traiter des souris Rag<sup>-/-</sup> au stade néonatal avec de l'anti CD3ε pour favoriser une reprise de l'architecture thymique. Ces souris traitées pourront ensuite être greffées avec la MO IL-7<sup>-/-</sup> ou WT, ceci dans le but de voir s'il serait possible de prévenir la maladie en améliorant l'environnement thymique.

Une autre alternative pour évaluer la contribution d'une médulla déficiente dans la maladie que nous avons observée dans nos chimères serait le traitement avec le facteur de croissance des kératinocytes (KGF). Le KGF est connu comme étant un mitogène des cellules épithéliales. Chez les souris jeunes et âgées après irradiation, ou recevant de la dexaméthasone induisant des dommages de l'environnement thymique, l'administration du KGF favorise une augmentation significative de la cellularité thymique. Dans notre étude, nous pourrions injecter du KGF à nos

souris et voir si en favorisant une reprise de l'environnement thymique, la maladie pourrait être prévenue.

#### **4.3.5. Les CD : une source de cytokine essentielle pour la sélection thymique**

Les preuves accumulées suggèrent que lors de la sélection thymique, d'autres facteurs seraient impliqués dans les interactions CD/thymocytes, notamment l'action de cytokines produites par les CD (Yarilin and Belyakov, 2004). Ces cytokines pourraient moduler les signaux délivrés par les interactions TCR-CMH / peptide pour renforcer le processus de sélection (Hou et al., 2015; Weist et al., 2015; Mencarelli et al., 2018). Des travaux récents ont démontré que l'absence de certaines cytokines produites par les CD thymiques telle que l'IL-2 entraînait de l'auto-immunité systémique et une baisse des Treg (Mencarelli et al., 2018). Soutenant l'importance de certaines cytokines produites par les CD dans la sélection thymique, alors que la source majoritaire de l'IL-2 thymique est les LT eux même, Robey et ses collègues ont démontré que le développement des Treg dépendait en partie de l'IL-2 fournit par les CD (Weist et al., 2015). Hou et al, ont démontré que l'IL-15 produite des cellules hématopoïétiques, vraisemblablement provenant des CD thymiques, était nécessaire pour une sélection négative optimale des thymocytes autoréactifs (Hou et al., 2015).

Nos données présentées dans cette étude révèlent que l'IL-7 potentiellement produite par les CD pourrait avoir un rôle crucial dans la tolérance des LT CD4<sup>+</sup>. Pour mieux évaluer l'impact de l'absence de la production de l'IL-7 produite par les CD dans la différenciation thymique et l'homéostasie des LT, il serait important de générer des souris IL-7 conditionnelles knockout, où l'IL-7 serait flanquée dans des sites LoxP. Ces souris pourraient être croisées avec des souris CD11C-Cre<sup>+</sup> de type sauvage.

#### **4.3.6. L-IL-7 produite par les CD : fonction de costimulation dans la signalisation du TCR ?**

Sorg et al, ont démontré chez l'humain, que les CD constituaient une source d'IL-7 qui contribuait à la costimulation de l'activation des LT (Sorg et al., 1998). Une autre étude a démontré via une réaction lymphocytaire mixte (MLR), que les CD modifiées génétiquement pour sécréter l'IL-7 étaient plus efficaces pour amplifier l'activation des LT spécifiques d'une tumeur (Westermann et al., 1998). Guimond et al ont observé que l'IL-7 produite par les CD était plus apte à soutenir la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> essentiellement dans un milieu déficient en IL-7. Cette même étude a démontré que la PH des LT naïfs CD4<sup>+</sup> nécessite l'expression commune du CMH II et de l'IL-7 par une même CD (Guimond et al., 2009).

Ainsi l'ensemble de ces études démontre que la production d'IL-7 par les CD pourrait avoir un effet costimulant qui serait d'une importance physiologique dans un contexte où l'IL-7 systémique devient limitante ou absente. À partir de ces observations basées que sur des expériences réalisées dans le compartiment périphérique et avec l'appui de nos résultats, nous avons émis le modèle illustré par la (Figure 4.1). Ce modèle postule que dans un environnement thymique où les TEC (principales cellules productrices d'IL-7) seraient réduits, l'IL-7 produite par les CD pourrait ainsi avoir un rôle important pour optimiser la stimulation du TCR potentiellement autoréactif tout en favorisant la probabilité que les thymocytes reconnaissent le peptide du soi en même temps que l'IL-7 (Figure 4.1). Dans l'action en synergie du TCR et l'IL-7 observée en périphérie, il a été démontré que bien que les deux voies soient activement impliquées, les contributions relatives des deux signaux varient selon le seuil de sensibilité/affinité des clones de LT (Seddon and Zamoyska, 2002a). Transposer cette flexibilité



de l'affinité du TCR dans le thymus permettrait une discrimination de l'action de l'IL-7 produite par la CD selon l'affinité du peptide du soi (force de la signalisation du TCR).

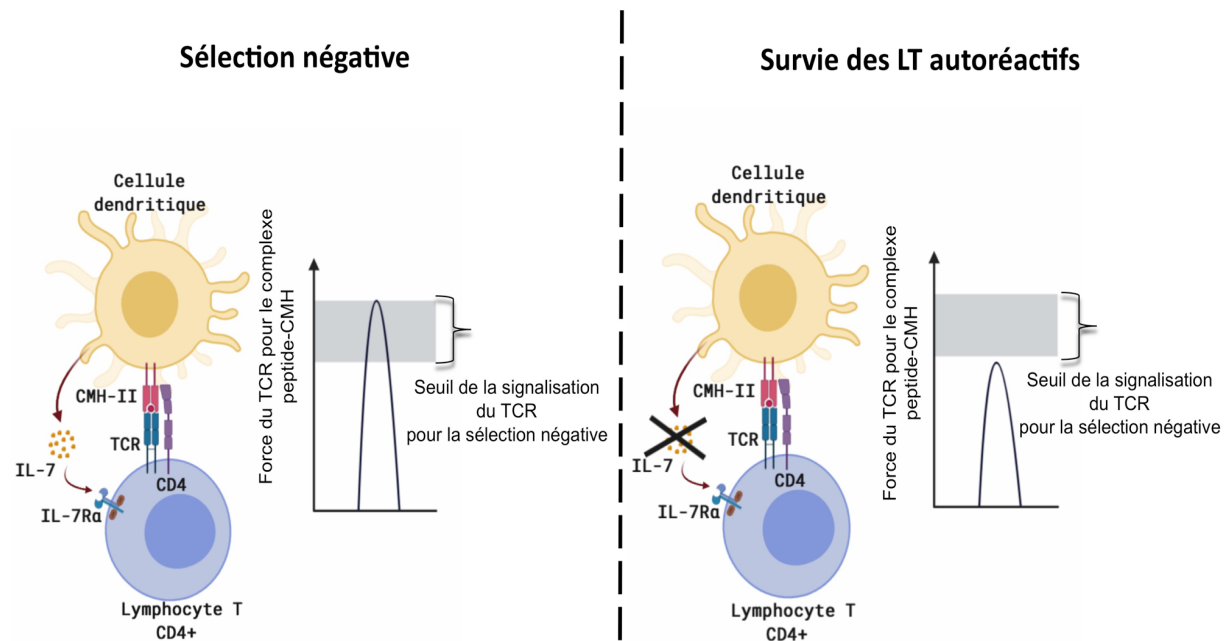


Figure 4.1 : modèle du rôle de l'IL-7 produite par les CD dans la sélection négative des lymphocytes T autoréactifs.

### 4.3.7. Comment s'opèrerait la signalisation de l'IL-7 produite par les CD sur le thymocyte dans une médulla altérée ?

Une modulation différentielle de la signalisation de l'IL-7 dépendamment de la concentration de l'IL-7 contenue dans l'environnement a été démontrée. Cette sensibilité des LT aux différences de concentration d'IL-7 aurait un impact sur l'orientation d'un LT vers divers états à savoir, survie, prolifération, activation (Swainson et al., 2007; Crawley et al., 2014). Dans le thymus,

l'IL-7 secrétée par les TEC signale de façon paracrine. Il serait concevable de penser que la concentration d'IL-7 provenant des TEC pourrait être différente ou perçue différemment par un thymocyte comparé à celle fournie par la CD. Ce dernier point mène à visualiser le site de contact rapproché établi entre une CD et un thymocyte lors l'interaction TCR /peptide du soi-CMH. Une telle configuration laisse penser que l'IL-7 fournie par la CD, pourrait être plus enrichie au niveau de la zone de contact CD/thymocytes comparée à l'IL-7 provenant des TEC.

Il a été démontré que des faibles concentrations systémiques d'IL-7 induisent la survie via une signalisation passant par pStat5 et Bcl-2, alors que des concentrations plus élevées d'IL-7 signalent via la PI3K et agissent en synergie avec la signalisation du TCR pour induire la prolifération homéostatique (Crawley et al., 2014). Transposer ces données au processus de la sélection négative des LT dans le thymus laisse envisager que l'IL-7 produite au sein de la synapse CD/thymocyte pourrait enclencher une cascade de signalisation de l'IL-7 favorable non pas à la survie mais plutôt à l'optimisation de la signalisation du TCR. Dans nos travaux, cette notion de concentration d'IL-7 pourrait être un facteur très important, dans un environnement thymique qui montre une diminution des TEC, ce qui rendrait l'IL-7 limitant, et par conséquent celle produite par les CD aurait un rôle physiologique essentiel.

Différents travaux ont mis en évidence un chevauchement de certains composants des cascades de signalisation initiées par le TCR et celles induites par l'IL-7, ce qui permettrait d'augmenter la sensibilité d'un LT (Deshpande et al., 2013; Lawson et al., 2015; Pellegrini et al., 2009).

Une étude a démontré que l'IL-7 jouait un rôle d'adjuvant permettant d'améliorer les réponses antitumorales. Cette amélioration de la réponse immunitaire impliquerait notamment une optimisation de la signalisation du TCR via une régulation négative de l'expression de l'ubiquitine ligase Cbl-b qui est un régulateur négatif de l'activation des LT (Pellegrini et al.,

2009). Lawson et ses collègues ont démontré une modulation du TCR par la signalisation de l'IL-7 passant par le chevauchement de la voie PI3K/AKT et la voie STAT5, deux voies induites également par la signalisation du TCR. Cette synergie semble bonifier le seuil d'activation des LT CD4<sup>+</sup> (Lawson et al., 2015). Dans l'arthrite rhumatoïde, la contribution de l'IL-7 a été caractérisée dans la phosphorylation d'ERK en synergie avec une stimulation du TCR. Cette action de l'IL-7 en association avec la stimulation du TCR rendrait ce dernier hypersensible et par conséquent un tel phénomène en périphérie favoriserait l'auto-immunité (Deshpande et al., 2013).

La voie MAPK / ERK (également connue sous le nom de voie Ras-Raf-MEK-ERK) est une voie de signalisation très bien caractérisée dans la signalisation du TCR mais en revanche très peu décrite dans la signalisation de l'IL-7. Des études récentes que je décris ici brièvement, ont émis quelques hypothèses sur le mécanisme de la diaphonie entre les voies JAK / STAT et MAPK / ERK. Deshpande a proposé un modèle qui démontre que l'IL-7 serait capable d'activer la voie MAPK / ERK via l'axe PI3K – PLC $\gamma$  (Deshpande et al., 2013). De façon intéressante, les protéines MAPK, telles que les protéines Jnk, Erk et p38, ont été décrites comme étant impliquées dans la signalisation de l'IL-7 en faveur de la prolifération et le métabolisme des LT (Crawley et al., 1997). Lors de la sélection thymique, la stimulation du TCR des thymocytes induit l'activation de la voie MAPK incluant trois familles de protéines kinases : ERK, les kinases c-Jun N-terminales (JNK) et p38. Les kinases JNK et p38 ont été très largement associées à la sélection négative. L'ensemble de ces données nous a amené à supposer quant à un possible scénario mettant en jeu ces cascades de signalisation en réponse à l'IL-7 et le TCR dans la sélection thymique. Comment l'IL-7 signalerait en synergie avec le TCR pour augmenter le seuil de signalisation d'un TCR potentiellement autoréactif ? Face à cette question, nous proposons le

modèle suivant basé sur l'ensemble des données décrites dans cette section. Ce modèle hypothétique impliquerait un rôle de l'IL-7 produite par les CD agissant en synergie avec la signalisation du TCR dans la sélection de LT CD4<sup>+</sup>. Ainsi, une étude approfondie des voies en aval des signaux médiés par le TCR des thymocytes au cours de la sélection serait cruciale pour une compréhension complète de l'effet de l'IL-7 produit par les CD.

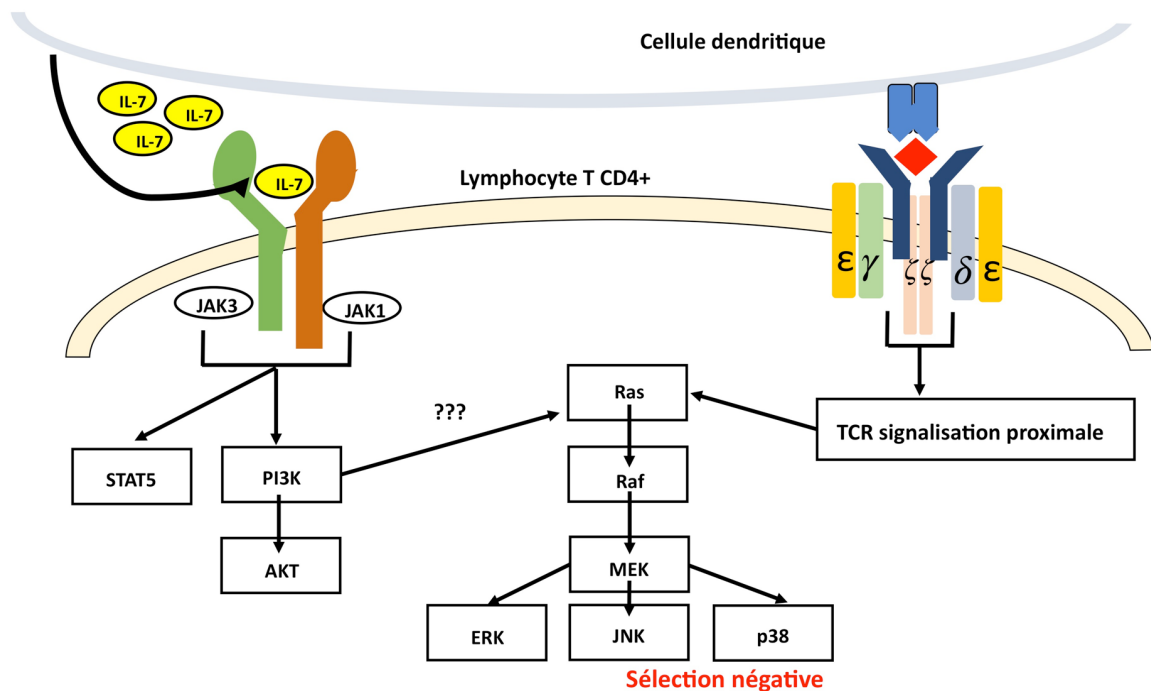


Figure 4.2 : modèle de la signalisation l'IL-7 produite par les CD en synergie avec le TCR au cours de la sélection négative des LT autoréactifs.

### **4.3.8. Un potentiel rôle du microbiote intestinal dans la pathogenèse MO IL-7<sup>-/-</sup> → Rag<sup>-/-</sup> ?**

Le microbiote a le pouvoir de moduler le système immunitaire et le maintien de l'homéostasie du système muco-sal. Dans des multiples maladies auto-immunes, la dysbiose intestinale constitue un facteur clé. Cette affirmation s'applique tout aussi bien aux maladies inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse, mais également à des maladies auto-immunes qui ne ciblent pas l'intestin comme l'arthrite rhumatoïde, le DT1 ou la SEP (McLean et al., 2015). L'effet causal reste encore mal défini toutefois il semblerait que des bactéries entériques ou leurs composantes soient bénéfiques pour la prévention de certaines maladies auto-immunes contrairement à d'autres types de bactéries qui les favoriseraient.

Chez nos souris malades, nous avons observé une forte accumulation de LT CD4<sup>+</sup> dans la lamina propria avec un profil de type Th1 / Th17 (Article 2, Figure 7E-F), qui est fréquemment impliqué dans la pathogenèse des maladies tels que l'IBD, maladie de crohn. De plus, les données d'histopathologie montrent des lésions évidentes de l'architecture intestinale (Article 2, Figure 1E) (Article 2, Figure 7C). Nos observations corroborent des études antérieures impliquant un défaut de la tolérance centrale due à une anomalie des CD (Ohnmacht et al., 2009; Teshima et al., 2003).

Nous avons démontré que la maladie se développait uniquement que chez les souris Rag<sup>-/-</sup> et non dans les souris WT. Il est bien documenté qu'un certain nombre de facteurs peuvent affecter la composition du microbiote intestinal chez les rongeurs, notamment les conditions d'hébergement, le régime alimentaire, la génétique, l'âge, le sexe et l'environnement (Nell et al., 2010; Thoene-Reineke et al., 2014; Laukens et al., 2016). Ces variables sont identiques entre les modèles de souris utilisés dans nos travaux, excepté le facteur génétique connu comme ayant un

effet majeur sur la composition bactérienne et l'induction conséquente d'une inflammation chronique intestinale. Plusieurs groupes ont démontré une composition de microbiote intestinal distincte entre les souris Rag<sup>-/-</sup> et les souris de type sauvage. De plus une altération du microbiote chez les souris Rag<sup>-/-</sup> a été décrite (Thoene-Reineke et al., 2014; Scholz et al., 2014; Zhang et al., 2015; Kwon et al., 2015).

Le maintien d'une relation symbiotique entre les microbes commensaux et leur hôte implique une barrière physique qui sépare le microbiote de la lumière intestinale. Cette barrière repose sur l'intégrité de l'assemblage de cellules épithéliales intestinales qui régulent la perméabilité paracellulaire. La rupture de cette barrière comme observée dans le modèle de colite induite par le sulfate de dextrane sodique (DSS), est suffisante pour permettre aux bactéries de rentrer dans la couche épithéliale et de provoquer une inflammation intestinale chez la souris. Chez les souris Rag<sup>-/-</sup>, une anomalie de la différenciation de l'épithélium en plus d'une altération de la barrière intestinale ont été décrites (Dahan et al., 2011). L'ensemble de ces données, nous laisse penser que le microbiote de la souris Rag<sup>-/-</sup> pourrait être un permissif à une expansion des clones de LT incluant des LT autoréactifs. Nous pourrions évaluer le microbiote des souris malades, en utilisant le séquençage du gène de l'ARNr 16S ce qui permettra d'examiner spécifiquement la structure et la composition des bactéries métaboliquement actives au cours de la maladie. Avec une telle technique, un pathogène qui favoriserait l'expansion de LT autoréactifs pourrait être identifié.

Le microbiote intestinal peut être modulé par diverses méthodes telle que l'utilisation de prébiotiques, probiotiques, transplantation de selles et antibiotiques. Dans nos travaux, nous avons démontré que le traitement par le baytril ou enrofloxacin, prévenait la maladie chez les souris reconstituées avec la MO IL-7<sup>-/-</sup> (Article 2, Figure 7A-B). Bien que le traitement par baytril n'ait pas modifié de manière significative les pourcentages de cellules LT CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> et LT

CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, il faut cependant préciser qu'en nombre absolu, nous avons observé une nette diminution des LT CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> et LT CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> dans les souris traitées par rapport aux non traitées (Article 2, Figure 7E-F). Ces résultats corroborent les observations antérieures décrivant des effets bénéfiques de multiples antibiotiques sur la réduction de la gravité de diverses maladies auto-immunes telles que la maladie de EAE, la PR, la souris Scurffy et la colite induite ou spontanée chez la souris IL-10<sup>-/-</sup> (Ochoa-Reparaz et al., 2009; Ebringer, 2010; He et al., 2019; Rath et al., 2001; Hoentjen et al., 2003).

A quel niveau agirait le Baytril ? Le Baytril est connu comme étant un antibiotique à large spectre qui modifie la flore intestinale. Cette modification modulerait par conséquent la réponse immunitaire dans l'intestin mais également en périphérie, Il a été démontré que la dysbiose induite par le baytril peut conduire à un environnement immunitaire favorisant l'induction de cellules régulatrices telles que les LT Treg, les B reg CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>, les Tr1 IL-10<sup>+</sup>, et les TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> (Strzēpa et al., 2017). Une étude récente a démontré que le baytril favoriserait également une augmentation des niveaux de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , des cytokines favorables à l'induction de CD tolérogènes qui conduisent au développement de cellules régulatrices (Strzēpa et al., 2019). Nous pourrions analyser ces cellules régulatrices et ces cytokines anti-inflammatoires pour mieux examiner les effets du baytril dans la prévention de la maladie observée dans nos chimères ayant reçues la MO IL-7<sup>-/-</sup>.

## CHAPITRE 5 : Conclusion

L'IL-7 et son récepteur, IL-7R $\alpha$ , sont deux facteurs essentiels pour le développement des LT ainsi que pour la survie et le maintien des LT en périphérie.

Dans cette thèse, nous avons démontré deux impacts majeurs de la dérégulation de l'IL-7 tant au niveau de sa signalisation que dans sa production, dans le compartiment lymphocytaire T. Dans la lymphopénie observée chez les patients atteints de LMC et traités avec de l'imatinib, nous avons fourni des preuves *in vivo* d'un nouveau mécanisme par lequel l'imatinib pourrait affecter la signalisation de l'IL-7 et du TCR, ce qui altère par conséquent l'homéostasie des LT.

Dans ces travaux de thèse, nous démontrons pour la première fois dans la littérature, un rôle potentiel de l'IL-7 produite par les cellules hématopoïétiques, dans la prévention de l'auto-immunité dans un contexte de reconstitution immunitaire après greffe de MO. Nous avons clairement démontré que la déficience en IL-7 d'origine hématopoïétique dans un contexte Rag déficient, induit une maladie auto-immune létale LT CD4<sup>+</sup> dépendante. Dans ces travaux, nous n'avons pas une preuve directe de la signalisation de l'IL-7 fournie par les CD dans la stimulation/signalisation du TCR dans le thymus. Seulement nos résultats et les preuves accumulées provenant de diverses études, suggèrent que l'IL-7 produite par les CD pourraient constituer une source d'IL-7 pouvant influencer la mise en place de la tolérance centrale des LT CD4<sup>+</sup>. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour analyser lors des interactions CD/thymocytes, la possibilité que les voies activées en aval de la signalisation de l'IL-7R $\alpha$ , puissent, dans certaines circonstances, converger avec les voies induites par le TCR pour optimiser la sensibilité du TCR lors de sélection négative.



## Bibliographie

Abramson, J., and Anderson, G. (2017). Thymic Epithelial Cells. *Annual review of immunology* 35, 85-118.

Akkaya, B., Y. Oya, M. Akkaya, J. Al Souz, A. H. Holstein, O. Kamenyeva, J. Kabat, R. Matsumura, D. W. Dorward, D. D. Glass and E. M. Shevach (2019). "Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide-MHC class II from dendritic cells. *Nat Immunol* 20, 218-231.

Akimova, T., Beier, U.H., Wang, L., Levine, M.H., and Hancock, W.W. (2011). Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PloS one* 6, e24226.

Akiyama, T., Maeda, S., Yamane, S., Ogino, K., Kasai, M., Kajiura, F., Matsumoto, M., and Inoue, J.-i. (2005). Dependence of Self-Tolerance on TRAF6-Directed Development of Thymic Stroma. *Science* 308, 248.

Alberola-Ila, J., Hogquist, K.A., Swan, K.A., Bevan, M.J., and Perlmutter, R.M. (1996). Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med* 184, 9-18.

Alberola-Ila, J., Forbush, K.A., Seger, R., Krebs, E.G., and Perlmutter, R.M. (1995). Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* 373, 620-623.

Alves, N.L., Richard-Le Goff, O., Huntington, N.D., Sousa, A.P., Ribeiro, V.S., Bordack, A., Vives, F.L., Peduto, L., Chidgey, A., Cumano, A., *et al.* (2009). Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1512-1517.

An, X., Tiwari, A.K., Sun, Y., Ding, P.R., Ashby, C.R., Jr., and Chen, Z.S. (2010). BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk Res* 34, 1255-1268.

Anderson, A.C., Nicholson, L.B., Legge, K.L., Turchin, V., Zaghouani, H., and Kuchroo, V.K. (2000a). High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire. *J Exp Med* 191, 761-770.

Anderson, A.C., Robey, E.A., and Huang, Y.H. (2001). Notch signaling in lymphocyte development. *Current opinion in genetics & development* 11, 554-560.

Anderson, G., Lane, P.J., and Jenkinson, E.J. (2007). Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nat Rev Immunol* 7, 954-963.

Anderson, G., Moore, N.C., Owen, J.J., and Jenkinson, E.J. (1996). Cellular interactions in thymocyte development. *Annual review of immunology* 14, 73-99.

Anderson, G., Owen, J.J., Moore, N.C., and Jenkinson, E.J. (1994). Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes in vitro. *J Exp Med* 179, 2027-2031.

Anderson, M., Anderson, S.K., and Farr, A.G. (2000b). Thymic vasculature: organizer of the medullary epithelial compartment? *International immunology* 12, 1105-1110.

Anderson, M.S., and Su, M.A. (2016). AIRE expands: new roles in immune tolerance and beyond. *Nature reviews Immunology* 16, 247-258.

Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., *et al.* (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395-1401.

Apert, C., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P.M. (2018). IL-2 and IL-15 dependent thymic development of Foxp3-expressing regulatory T lymphocytes. *Protein & cell* 9, 322-332.

Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L., and von Boehmer, H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3, 756-763.

Apostolou, I., and von Boehmer, H. (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 199, 1401-1408.

Appel, S., Balabanov, S., Brummendorf, T.H., and Brossart, P. (2005). Effects of imatinib on normal hematopoiesis and immune activation. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23, 1082-1088.

Appel, S., Boehmler, A.M., Grunebach, F., Muller, M.R., Rupf, A., Weck, M.M., Hartmann, U., Reichardt, V.L., Kanz, L., Brummendorf, T.H., *et al.* (2004). Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34<sup>+</sup> peripheral blood progenitor cells. *Blood* 103, 538-544.

Ardavin, C., Wu, L., Li, C.L., and Shortman, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362, 761-763.

Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 184, 387-396.

Aschenbrenner, K., D'Cruz, L.M., Vollmann, E.H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L.K., Rolink, A., and Klein, L. (2007). Selection of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire<sup>+</sup> medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 8, 351-358.

Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* *190*, 995-1004.

Atibalentja, D.F., Byersdorfer, C.A., and Unanue, E.R. (2009). Thymus-blood protein interactions are highly effective in negative selection and regulatory T cell induction. *J Immunol* *183*, 7909-7918.

Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., and Michels, A.W. (2014). Type 1 diabetes. *Lancet (London, England)* *383*, 69-82.

Baba, T., Nakamoto, Y., and Mukaida, N. (2009). Crucial contribution of thymic Sirp alpha+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J Immunol* *183*, 3053-3063.

Baecher-Allan, C., Viglietta, V., and Hafler, D.A. (2004). Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Seminars in immunology* *16*, 89-98.

Barata, J.T., Durum, S.K., and Seddon, B. (2019). Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease. *Nature Immunology* *20*, 1584-1593.

Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* *27*, 20-21.

Benoist, C., and Mathis, D. (1989a). Positive and negative selection of the T cell repertoire in MHC class II transgenic mice. *Seminars in immunology* *1*, 117-124.

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

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* *441*, 235-238.

Bettelli, E., Korn, T., and Kuchroo, V.K. (2007). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Current opinion in immunology* *19*, 652-657.

Bevan, M.J. (1977). In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature* *269*, 417-418.

Bhandoola, A., von Boehmer, H., Petrie, H.T., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2007). Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity* 26, 678-689.

Boissel, N., Rousselot, P., Raffoux, E., Cayuela, J.M., Soulier, J., Mooney, N., Charron, D., Dombret, H., Toubert, A., and Rea, D. (2006). Imatinib mesylate minimally affects bcr-abl+ and normal monocyte-derived dendritic cells but strongly inhibits T cell expansion despite reciprocal dendritic cell-T cell activation. *Journal of leukocyte biology* 79, 747-756.

Bonasio, R., Scimone, M.L., Schaerli, P., Grabie, N., Lichtman, A.H., and von Andrian, U.H. (2006). Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol* 7, 1092-1100.

Bonifacio, M., Stagno, F., Scaffidi, L., Krampera, M., and Di Raimondo, F. (2019). Management of Chronic Myeloid Leukemia in Advanced Phase. *Frontiers in oncology* 9, 1132.

Boschetti, G., Nancey, S., Moussata, D., Cotte, E., Francois, Y., Flourie, B., and Kaiserlian, D. (2016). Enrichment of Circulating and Mucosal Cytotoxic CD8+ T Cells Is Associated with Postoperative Endoscopic Recurrence in Patients with Crohn's Disease. *Journal of Crohn's & colitis* 10, 338-345.

Bouillet, P., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Zhang, L.C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J.M., and Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415, 922-926.

Breed, E.R., Lee, S.T., and Hogquist, K.A. (2018). Directing T cell fate: How thymic antigen presenting cells coordinate thymocyte selection. *Seminars in cell & developmental biology* 84, 2-10.

Breed, E.R., Watanabe, M., and Hogquist, K.A. (2019). Measuring Thymic Clonal Deletion at the Population Level. *The Journal of Immunology* 202, 3226.

Brocker, T., Riedinger, M., and Karjalainen, K. (1997). Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 185, 541-550.

Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Guinter, T.I., Yamashita, Y., Sharrow, S.O., and Singer, A. (2000). Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* 13, 59-71.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepers, B., Clark, L.B., Yasayko, S.-A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics* 27, 68.

Buday, L., and Downward, J. (1993). Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73, 611-620.

Buhlmann, J.E., Elkin, S.K., and Sharpe, A.H. (2003). A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection. *J Immunol* 170, 5421-5428.

Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B., Moon, J.J., Chu, H.H., Lio, C.W., Vegoe, A.L., Hsieh, C.S., Jenkins, M.K., and Farrar, M.A. (2008). Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 28, 112-121.

Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007). IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 178, 280-290.

Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, L.A., Olson, D., Tizard, R., Cate, R., and Lo, D. (1995). Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 373, 531-536.

Burnet, F.M. (1976). A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA: a cancer journal for clinicians* 26, 119-121.

Calnan, B.J., Szychowski, S., Chan, F.K., Cado, D., and Winoto, A. (1995). A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* 3, 273-282.

Calzascia, T., Pellegrini, M., Lin, A., Garza, K.M., Elford, A.R., Shahinian, A., Ohashi, P.S., and Mak, T.W. (2008). CD4 T cells, lymphopenia, and IL-7 in a multistep pathway to autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2999-3004.

Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., and Ley, T.J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27, 635-646.

Cao, X., Shores, E.W., Hu-Li, J., Anver, M.R., Kelsall, B.L., Russell, S.M., Drago, J., Noguchi, M., Grinberg, A., Bloom, E.T., *et al.* (1995). Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 2, 223-238.

Caramalho, I., Nunes-Silva, V., Pires, A. R., Mota, C., Pinto, A. I., Nunes-Cabaço, H., Foxall, R. B., Sousa, A. E. (2015) Human regulatory T-cell development is dictated by interleukin-2 and -15 expressed in a non-overlapping pattern in the thymus. *J. Autoimmun.* 56, 98– 110.

Chabaud, M., Durand, J.M., Buchs, N., Fossiez, F., Page, G., Frappart, L., and Miossec, P. (1999). Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis and rheumatism* 42, 963-970.

Chai, S.K., Nichols, G.L., and Rothman, P. (1997). Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol* 159, 4720-4728.

Chen, J., A. Ganguly, A. D. Mucsi, J. Meng, J. Yan, P. Detampel, F. Munro, Z. Zhang, M. Wu, A. Hari, M. D. Stenner, W. Zheng, P. Kubes, T. Xia, M. W. Amrein, H. Qi and Y. Shi (2017). Strong adhesion by regulatory T cells induces dendritic cell cytoskeletal polarization and contact-dependent lethargy. *J Exp Med* 214, 327-338.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-1886.

Cho, H.J., Edmondson, S.G., Miller, A.D., Sellars, M., Alexander, S.T., Somersan, S., and Punt, J.A. (2003). Cutting edge: identification of the targets of clonal deletion in an unmanipulated thymus. *J Immunol* 170, 10-13.

Christianson, S.W., Shultz, L.D., and Leiter, E.H. (1993). Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes* 42, 44-55.

Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomini, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., *et al.* (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol* 11, 1093-1101.

Coombes, J.L., Robinson, N.J., Maloy, K.J., Uhlig, H.H., and Powrie, F. (2005). Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunological reviews* 204, 184-194.

Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Cárcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*, 204, 1757-1764.

Cortes, J.E., Gambacorti-Passerini, C., Deininger, M.W., Mauro, M.J., Chuah, C., Kim, D.W., Dyagil, I., Glushko, N., Milojkovic, D., le Coutre, P., *et al.* (2018). Bosutinib Versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results From the Randomized BFORE Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 36, 231-237.

Cortes, J.E., Kantarjian, H., Shah, N.P., Bixby, D., Mauro, M.J., Flinn, I., O'Hare, T., Hu, S., Narasimhan, N.I., Rivera, V.M., *et al.* (2012). Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England journal of medicine* 367, 2075-2088.

Cortes, J.E., Kim, D.W., Pinilla-Ibarz, J., le Coutre, P., Paquette, R., Chuah, C., Nicolini, F.E., Apperley, J.F., Houry, H.J., Talpaz, M., *et al.* (2013). A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England journal of medicine* 369, 1783-1796.

Cortes, J.E., Saglio, G., Kantarjian, H.M., Baccarani, M., Mayer, J., Boque, C., Shah, N.P., Chuah, C., Casanova, L., Bradley-Garelik, B., *et al.* (2016). Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naive Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34, 2333-2340.

Cortez, D., Kadlec, L., and Pendergast, A.M. (1995). Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Molecular and cellular biology* 15, 5531-5541.

Crawley, A.M., Vranjkovic, A., Faller, E., McGuinty, M., Busca, A., Burke, S.C., Cousineau, S., Kumar, A., Macpherson, P.A., and Angel, J.B. (2014). Jak/STAT and PI3K signaling pathways have both common and distinct roles in IL-7-mediated activities in human CD8<sup>+</sup> T cells. *Journal of leukocyte biology* 95, 117-127.

Crawley, J.B., Rawlinson, L., Lali, F.V., Page, T.H., Saklatvala, J., and Foxwell, B.M. (1997). T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation. *The Journal of biological chemistry* 272, 15023-15027.

Curotto de Lafaille, M.A., Lino, A.C., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J.J. (2004). CD25<sup>+</sup> T cells generate CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol* 173, 7259-7268.

Cwynarski, K., Laylor, R., Macchiarulo, E., Goldman, J., Lombardi, G., Melo, J.V., and Dazzi, F. (2004). Imatinib inhibits the activation and proliferation of normal T lymphocytes in vitro. *Leukemia* 18, 1332-1339.

D'Cruz, L.M., and Klein, L. (2005). Development and function of agonist-induced CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 6, 1152-1159.

d'Hennezel, E., Ben-Shoshan, M., Ochs, H.D., Torgerson, T.R., Russell, L.J., Lejtenyi, C., Noya, F.J., Jabado, N., Mazer, B., and Piccirillo, C.A. (2009). FOXP3 forkhead domain mutation and regulatory T cells in the IPEX syndrome. *The New England journal of medicine* 361, 1710-1713.

Dahan, S., Rabinowitz, K.M., Martin, A.P., Berin, M.C., Unkeless, J.C., and Mayer, L. (2011). Notch-1 signaling regulates intestinal epithelial barrier function, through interaction with CD4<sup>+</sup> T cells, in mice and humans. *Gastroenterology* 140, 550-559.

Danzl, N.M., Jeong, S., Choi, Y., and Alexandropoulos, K. (2014). Identification of novel thymic epithelial cell subsets whose differentiation is regulated by RANKL and Traf6. *PLoS one* 9, e86129.

Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402.

De Riva, A., Bourgeois, C., Kassiotis, G., and Stockinger, B. (2007). Noncognate interaction with MHC class II molecules is essential for maintenance of T cell metabolism to establish optimal memory CD4 T cell function. *J Immunol* 178, 5488-5495.

de Saint-Vis, B., Fugier-Vivier, I., Massacrier, C., Gaillard, C., Vanbervliet, B., Ait-Yahia, S., Banchereau, J., Liu, Y.-J., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). The Cytokine Profile Expressed by Human Dendritic Cells Is Dependent on Cell Subtype and Mode of Activation. *The Journal of Immunology* 160, 1666.

de Villartay, J.P., Fischer, A., and Durandy, A. (2003). The mechanisms of immune diversification and their disorders. *Nat Rev Immunol* 3, 962-972.

Derbinski, J., Pinto, S., Rosch, S., Hexel, K., and Kyewski, B. (2008). Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 657-662.

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2, 1032-1039.

Deshpande, P., Cavanagh, M.M., Le Saux, S., Singh, K., Weyand, C.M., and Goronzy, J.J. (2013). IL-7- and IL-15-mediated TCR sensitization enables T cell responses to self-antigens. *J Immunol* 190, 1416-1423.

DiSanto, J.P., Muller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A., and Rajewsky, K. (1995). Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 377-381.

Dolhain, R.J., van der Heiden, A.N., ter Haar, N.T., Breedveld, F.C., and Miltenburg, A.M. (1996). Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 39, 1961-1969.

Donskoy, E., and Goldschneider, I. (2003). Two developmentally distinct populations of dendritic cells inhabit the adult mouse thymus: demonstration by differential importation of hematogenous precursors under steady state conditions. *J Immunol* 170, 3514-3521.



Doria, A., Iaccarino, L., Ghirardello, A., Zampieri, S., Arienti, S., Sarzi-Puttini, P., Atzeni, F., Piccoli, A., and Todesco, S. (2006). Long-term prognosis and causes of death in systemic lupus erythematosus. *The American journal of medicine* *119*, 700-706.

Druker, B.J., Sawyers, C.L., Kantarjian, H., Resta, D.J., Reese, S.F., Ford, J.M., Capdeville, R., and Talpaz, M. (2001). Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *The New England journal of medicine* *344*, 1038-1042.

Dudley, E.C., Petrie, H.T., Shah, L.M., Owen, M.J., and Hayday, A.C. (1994). T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* *1*, 83-93.

Ebringer, A. (2010). Therapy: Gut-mediated autoimmune arthritis treated with antibiotics. *Nature reviews Rheumatology* *6*, 622-623.

Egawa, T., and Littman, D.R. (2008). ThPOK acts late in specification of the helper T cell lineage and suppresses Runx-mediated commitment to the cytotoxic T cell lineage. *Nat Immunol* *9*, 1131-1139.

Enouz, S., Carrie, L., Merkler, D., Bevan, M.J., and Zehn, D. (2012). Autoreactive T cells bypass negative selection and respond to self-antigen stimulation during infection. *J Exp Med* *209*, 1769-1779.

Ernst, B., Lee, D.S., Chang, J.M., Sprent, J., and Surh, C.D. (1999). The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* *11*, 173-181.

Ernst, B.B., Surh, C.D., and Sprent, J. (1996). Bone marrow-derived cells fail to induce positive selection in thymus reaggregation cultures. *J Exp Med* *183*, 1235-1240.

Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., and Kantarjian, H.M. (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* *341*, 164-172.

Fantini, M.C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P.R., and Neurath, M.F. (2004). Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* *172*, 5149-5153.

Farr, A.G., and Anderson, S.K. (1985). Epithelial heterogeneity in the murine thymus: fucose-specific lectins bind medullary epithelial cells. *J Immunol* *134*, 2971-2977.

Fialkow, P.J., Jacobson, R.J., and Papayannopoulou, T. (1977). Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *The American journal of medicine* *63*, 125-130.

Finnish-German, A.C. (1997). An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet* *17*, 399-403.

Fiorini, E., Ferrero, I., Merck, E., Favre, S., Pierres, M., Luther, S.A., and MacDonald, H.R. (2008). Cutting Edge: Thymic Crosstalk Regulates Delta-Like 4 Expression on Cortical Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* *181*, 8199.

Fischer, A.M., Katayama, C.D., Pages, G., Pouyssegur, J., and Hedrick, S.M. (2005). The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* *23*, 431-443.

Fontenot, J.D., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* *202*, 901-906.

Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* *4*, 330-336.

Foulis, A.K. (1987). C. L. Oakley lecture (1987). The pathogenesis of beta cell destruction in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *The Journal of pathology* *152*, 141-148.

Friese, M.A., and Fugger, L. (2009). Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Annals of neurology* *66*, 132-141.

Frommer, F., and Waisman, A. (2010). B cells participate in thymic negative selection of murine auto-reactive CD4+ T cells. *PloS one* *5*, e15372.

Fry, T.J., and Mackall, C.L. (2002). Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood* *99*, 3892-3904.

Fry, T.J., and Mackall, C.L. (2005). The Many Faces of IL-7: From Lymphopoiesis to Peripheral T Cell Maintenance. *The Journal of Immunology* *174*, 6571.

Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* *200*, 1039-1049.

Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2006). Central tolerance: good but imperfect. *Immunological reviews* *209*, 290-296.

Galton, D.A. (1953). Myleran in chronic myeloid leukaemia; results of treatment. *Lancet (London, England)* *264*, 208-213.

Gauthier, S.D., Leboeuf, D., Manuguerra-Gagné, R., Gaboury, L., and Guimond, M. (2015). Stromal-Derived Factor-1 $\alpha$  and Interleukin-7 Treatment Improves Homeostatic Proliferation of Naïve CD4(+) T Cells after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 21, 1721-1731.

Gauthier, S.D., Moutuou, M.M., Daudelin, F., Leboeuf, D., and Guimond, M. (2019). IL-7 Is the Limiting Homeostatic Factor that Constrains Homeostatic Proliferation of CD8(+) T Cells after Allogeneic Stem Cell Transplantation and Graft-versus-Host Disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 25, 648-655.

Geary, C.G. (2000). The story of chronic myeloid leukaemia. *British journal of haematology* 110, 2-11.

Gleeson, P.A., Toh, B.H., and van Driel, I.R. (1996). Organ-specific autoimmunity induced by lymphopenia. *Immunological reviews* 149, 97-125.

Godfrey, D.I., Kennedy, J., Mombaerts, P., Tonegawa, S., and Zlotnik, A. (1994). Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8- thymocyte differentiation. *J Immunol* 152, 4783-4792.

Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). 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, 4244-4252.

Godfrey, V.L., Wilkinson, J.E., and Russell, L.B. (1991). X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *The American journal of pathology* 138, 1379-1387.

Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2003). Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *The New England journal of medicine* 349, 1451-1464.

Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174, 1783-1786.

Gonzalez-Quintal, R., Lawson, B.R., Scatizzi, J.C., Craft, J., Kono, D.H., Baccala, R., and Theofilopoulos, A.N. (2011). Systemic autoimmunity and lymphoproliferation are associated with excess IL-7 and inhibited by IL-7R $\alpha$  blockade. *PloS one* 6, e27528.

Gotot, J., Dhana, E., Yagita, H., Kaiser, R., Ludwig-Portugall, I., and Kurts, C. (2018). Antigen-specific Helios(-), Neuropilin-1(-) Tregs induce apoptosis of autoreactive B cells via PD-L1. *Immunol Cell Biol* 96, 852-862.

Gray, D., Abramson, J., Benoist, C., and Mathis, D. (2007). Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *The Journal of experimental medicine* 204, 2521-2528.

Gray, D.H., Fletcher, A.L., Hammett, M., Seach, N., Ueno, T., Young, L.F., Barbuto, J., Boyd, R.L., and Chidgey, A.P. (2008). Unbiased analysis, enrichment and purification of thymic stromal cells. *Journal of immunological methods* 329, 56-66.

Gray, D.H., Seach, N., Ueno, T., Milton, M.K., Liston, A., Lew, A.M., Goodnow, C.C., and Boyd, R.L. (2006). Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* 108, 3777-3785.

Groux, H., Bigler, M., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1996). Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 184, 19-29.

Guimond, M., Fry, T.J., and Mackall, C.L. (2005). Cytokine signals in T-cell homeostasis. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)* 28, 289-294.

Guimond, M., Veenstra, R.G., Grindler, D.J., Zhang, H., Cui, Y., Murphy, R.D., Kim, S.Y., Na, R., Hennighausen, L., Kurtulus, S., *et al.* (2009). Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* 10, 149-157.

Hadeiba, H., and Butcher, E.C. (2013). Thymus-homing dendritic cells in central tolerance. *Eur J Immunol* 43, 1425-1429.

Hadeiba, H., Lahl, K., Edalati, A., Oderup, C., Habtezion, A., Pachynski, R., Nguyen, L., Ghodsi, A., Adler, S., and Butcher, E.C. (2012). Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity* 36, 438-450.

Hara, T., Shitara, S., Imai, K., Miyachi, H., Kitano, S., Yao, H., Tani-ichi, S., and Ikuta, K. (2012). Identification of IL-7-producing cells in primary and secondary lymphoid organs using IL-7-GFP knock-in mice. *J Immunol* 189, 1577-1584.

Haribhai, D., Lin, W., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Salzman, N.H., Carlson, M.R., Li, S.H., Simpson, P.M., Chatila, T.A., and Williams, C.B. (2009). A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *J Immunol* 182, 3461-3468.

Haribhai, D., Williams, J.B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E.G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S.H., Relland, L.M., *et al.* (2011). A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* 35, 109-122.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6, 1123-1132.

Haskins, K., and McDuffie, M. (1990). Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone. *Science* 249, 1433-1436.

He, B., Liu, Y., Hoang, T.K., Tian, X., Taylor, C.M., Luo, M., Tran, D.Q., Tatevian, N., and Rhoads, J.M. (2019). Antibiotic-modulated microbiome suppresses lethal inflammation and prolongs lifespan in Treg-deficient mice. *Microbiome* 7, 145-145.

Herbin, O., Bonito, A.J., Jeong, S., Weinstein, E.G., Rahman, A.H., Xiong, H., Merad, M., and Alexandropoulos, K. (2016). Medullary thymic epithelial cells and CD8alpha+ dendritic cells coordinately regulate central tolerance but CD8alpha+ cells are dispensable for thymic regulatory T cell production. *Journal of autoimmunity* 75, 141-149.

Herold, K.C., Vignali, D.A., Cooke, A., and Bluestone, J.A. (2013). Type 1 diabetes: translating mechanistic observations into effective clinical outcomes. *Nat Rev Immunol* 13, 243-256.

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., *et al.* (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science (New York, NY)* 322, 1097-1100.

Hinterberger, M., Aichinger, M., Prazeres da Costa, O., Voehringer, D., Hoffmann, R., and Klein, L. (2010). Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nat Immunol* 11, 512-519.

Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Klein, L. (2011). B7/CD28 in central tolerance: costimulation promotes maturation of regulatory T cell precursors and prevents their clonal deletion. *Front Immunol* 2, 30.

Hochhaus, A., Baccarani, M., Deininger, M., Apperley, J.F., Lipton, J.H., Goldberg, S.L., Corm, S., Shah, N.P., Cervantes, F., Silver, R.T., *et al.* (2008). Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* 22, 1200-1206.

Hochhaus, A., Kreil, S., Corbin, A.S., La Rosee, P., Muller, M.C., Lahaye, T., Hanfstein, B., Schoch, C., Cross, N.C., Berger, U., *et al.* (2002). Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 16, 2190-2196.

Hochhaus, A., Saglio, G., Hughes, T.P., Larson, R.A., Kim, D.W., Issaragrisil, S., le Coutre, P.D., Etienne, G., Dorlhiac-Llacer, P.E., Clark, R.E., *et al.* (2016). Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia* 30, 1044-1054.

Hoentjen, F., Harmsen, H.J., Braat, H., Torrice, C.D., Mann, B.A., Sartor, R.B., and Dieleman, L.A. (2003). Antibiotics with a selective aerobic or anaerobic spectrum have different therapeutic activities in various regions of the colon in interleukin 10 gene deficient mice. *Gut* 52, 1721-1727.

Hogquist, K.A., Baldwin, T.A., and Jameson, S.C. (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 5, 772-782.

Honey, K., and Rudensky, A.Y. (2003). Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3, 472-482.

Hong, C., Luckey, M.A., and Park, J.H. (2012). Intrathymic IL-7: the where, when, and why of IL-7 signaling during T cell development. *Seminars in immunology* 24, 151-158.

Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.

Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Kersey, J., Kolb, H.J., Rimm, A.A., Ringden, O., Rozman, C., Speck, B., *et al.* (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75, 555-562.

Hou, M.S., Huang, S.T., Tsai, M.H., Yen, C.C., Lai, Y.G., Liou, Y.H., Lin, C.K., and Liao, N.S. (2015). The interleukin-15 system suppresses T cell-mediated autoimmunity by regulating negative selection and nT(H)17 cell homeostasis in the thymus. *Journal of autoimmunity* 56, 118-129.

Hsieh, C.-S., Lee, H.-M., and Lio, C.-W.J. (2012). Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nature Reviews Immunology* 12, 157.

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.

Hu, Q.N., and Baldwin, T.A. (2015). Differential roles for Bim and Nur77 in thymocyte clonal deletion induced by ubiquitous self-antigen. *J Immunol* 194, 2643-2653.

Huang, C.T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., *et al.* (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21, 503-513.

Huang, W., Qi, Q., Hu, J., Huang, F., Laufer, T.M., and August, A. (2014). Dendritic cell-MHC class II and Itk regulate functional development of regulatory innate memory CD4<sup>+</sup> T cells in bone marrow transplantation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 192, 3435-3441.

Hubert, F.X., Kinkel, S.A., Davey, G.M., Phipson, B., Mueller, S.N., Liston, A., Proietto, A.I., Cannon, P.Z., Forehan, S., Smyth, G.K., *et al.* (2011). Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood* *118*, 2462-2472.

Huseby, E.S., Huseby, P.G., Shah, S., Smith, R., and Stadinski, B.D. (2012). Pathogenic CD8 T cells in multiple sclerosis and its experimental models. *Front Immunol* *3*, 64.

Ilaria, R.L., Jr., and Van Etten, R.A. (1996). P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *The Journal of biological chemistry* *271*, 31704-31710.

Irla, M., Hollander, G., and Reith, W. (2010). Control of central self-tolerance induction by autoreactive CD4<sup>+</sup> thymocytes. *Trends Immunol* *31*, 71-79.

Irla, M., Hugues, S., Gill, J., Nitta, T., Hikosaka, Y., Williams, I.R., Hubert, F.X., Scott, H.S., Takahama, Y., Hollander, G.A., *et al.* (2008). Autoantigen-specific interactions with CD4<sup>+</sup> thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity. *Immunity* *29*, 451-463.

Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* *162*, 5317-5326.

Ivanov, II, Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., *et al.* (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* *139*, 485-498.

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

Jabbour, E., and Kantarjian, H. (2018). Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American journal of hematology* *93*, 442-459.

Jabbour, E., Kantarjian, H.M., Saglio, G., Steegmann, J.L., Shah, N.P., Boque, C., Chuah, C., Pavlovsky, C., Mayer, J., Cortes, J., *et al.* (2014). Early response with dasatinib or imatinib in chronic myeloid leukemia: 3-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood* *123*, 494-500.

Jacobsen, M., Cepok, S., Quak, E., Happel, M., Gaber, R., Ziegler, A., Schock, S., Oertel, W.H., Sommer, N., and Hemmer, B. (2002). Oligoclonal expansion of memory CD8<sup>+</sup> T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain : a journal of neurology* *125*, 538-550.

Jager, A., and Kuchroo, V.K. (2010). Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scandinavian journal of immunology* 72, 173-184.

Jameson, S.C. (2002). Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2, 547-556.

Jiang, Q., Li, W.Q., Aiello, F.B., Mazzucchelli, R., Asefa, B., Khaled, A.R., and Durum, S.K. (2005). Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine & growth factor reviews* 16, 513-533.

Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Hohenbeck, A.E., Lerman, M.A., Najj, A., and Caton, A.J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2, 301-306.

Jorns, A., Gunther, A., Hedrich, H.J., Wedekind, D., Tiedge, M., and Lenzen, S. (2005). Immune cell infiltration, cytokine expression, and beta-cell apoptosis during the development of type 1 diabetes in the spontaneously diabetic LEW.1AR1/Ztm-iddm rat. *Diabetes* 54, 2041-2052.

Kabarowski, J.H., and Witte, O.N. (2000). Consequences of BCR-ABL expression within the hematopoietic stem cell in chronic myeloid leukemia. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 18, 399-408.

Kantarjian, H., O'Brien, S., Jabbour, E., Garcia-Manero, G., Quintas-Cardama, A., Shan, J., Rios, M.B., Ravandi, F., Faderl, S., Kadia, T., *et al.* (2012). Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood* 119, 1981-1987.

Kantarjian, H., Sawyers, C., Hochhaus, A., Guilhot, F., Schiffer, C., Gambacorti-Passerini, C., Niederwieser, D., Resta, D., Capdeville, R., Zoellner, U., *et al.* (2002). Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *The New England journal of medicine* 346, 645-652.

Kappler, J.W., Roehm, N., and Marrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49, 273-280.

Kawahata, K., Misaki, Y., Yamauchi, M., Tsunekawa, S., Setoguchi, K., Miyazaki, J., and Yamamoto, K. (2002). Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J Immunol* 168, 4399-4405.

Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., *et al.* (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 191, 771-780.



Kerdiles, Y.M., Beisner, D.R., Tinoco, R., Dejean, A.S., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Hedrick, S.M. (2009). Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nature immunology* *10*, 176-184.

Khajapeer, K.V., and Baskaran, R. (2015). Hsp90 Inhibitors for the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *Leukemia research and treatment* *2015*, 757694.

Khor, B., and Sleckman, B.P. (2002). Allelic exclusion at the TCRbeta locus. *Current opinion in immunology* *14*, 230-234.

Kieper, W.C., Tan, J.T., Bondi-Boyd, B., Gapin, L., Sprent, J., Ceredig, R., and Surh, C.D. (2002). Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med* *195*, 1533-1539.

Kieper, W.C., Troy, A., Burghardt, J.T., Ramsey, C., Lee, J.Y., Jiang, H.-Q., Dummer, W., Shen, H., Cebra, J.J., and Surh, C.D. (2005). Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. *J Immunol* *174*, 3158-3163.

King, C., Ilic, A., Koelsch, K., and Sarvetnick, N. (2004). Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* *117*, 265-277.

Kirberg, J., Berns, A., and von Boehmer, H. (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.

Kishimoto, H., and Sprent, J. (1999). Several different cell surface molecules control negative selection of medullary thymocytes. *J Exp Med* *190*, 65-73.

Kisielow, P., Bluthmann, H., Staerz, U.D., Steinmetz, M., and von Boehmer, H. (1988). Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* *333*, 742-746.

Klein, L., Hinterberger, M., von Rohrscheidt, J., and Aichinger, M. (2011). Autonomous versus dendritic cell-dependent contributions of medullary thymic epithelial cells to central tolerance. *Trends Immunol* *32*, 188-193.

Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* *9*, 833-844.

Klein, L., Klein, T., Ruther, U., and Kyewski, B. (1998). CD4 T cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *J Exp Med* *188*, 5-16.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* 14, 377-391.

Kleindienst, P., Chretien, I., Winkler, T., and Brocker, T. (2000). Functional comparison of thymic B cells and dendritic cells in vivo. *Blood* 95, 2610.

Klug, D.B., Carter, C., Gimenez-Conti, I.B., and Richie, E.R. (2002). Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. *J Immunol* 169, 2842-2845.

Knoechel, B., Lohr, J., Kahn, E., Bluestone, J.A., and Abbas, A.K. (2005). Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J Exp Med* 202, 1375-1386.

Koble, C., and Kyewski, B. (2009). The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J Exp Med* 206, 1505-1513.

Koch, U., Fiorini, E., Benedito, R., Besseyrias, V., Schuster-Gossler, K., Pierres, M., Manley, N.R., Duarte, A., MacDonald, H.R., and Radtke, F. (2008). Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *The Journal of Experimental Medicine* 205, 2515.

Koh, A.S., Kingston, R.E., Benoist, C., and Mathis, D. (2010). Global relevance of Aire binding to hypomethylated lysine-4 of histone-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 13016-13021.

Kojima, A., Tanaka-Kojima, Y., Sakakura, T., and Nishizuka, Y. (1976). Spontaneous development of autoimmune thyroiditis in neonatally thymectomized mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 34, 550-557.

Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177, 566-573.

Kroncke, R., Loppnow, H., Flad, H.D., and Gerdes, J. (1996). Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction. *Eur J Immunol* 26, 2541-2544.

Krupica, T., Jr., Fry, T.J., and Mackall, C.L. (2006). Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model. *Clin Immunol* 120, 121-128.

Kulkarni, A.B., Huh, C.G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M., and Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in

mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 770-774.

Kumar, P.G., Laloraya, M., Wang, C.Y., Ruan, Q.G., Davoodi-Semiromi, A., Kao, K.J., and She, J.X. (2001). The autoimmune regulator (AIRE) is a DNA-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 276, 41357-41364.

Kwon, O., Lee, S., Kim, J.H., Kim, H., and Lee, S.W. (2015). Altered Gut Microbiota Composition in Rag1-deficient Mice Contributes to Modulating Homeostasis of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Immune network* 15, 252-259.

Kyewski, B., and Klein, L. (2006). A central role for central tolerance. *Annual review of immunology* 24, 571-606.

Kyewski, B.A. (1987). Seeding of thymic microenvironments defined by distinct thymocyte-stromal cell interactions is developmentally controlled. *J Exp Med* 166, 520-538.

Labrecque, N., Whitfield, L.S., Obst, R., Waltzinger, C., Benoist, C., and Mathis, D. (2001). How much TCR does a T cell need? *Immunity* 15, 71-82.

Lai, S.Y., Molden, J., and Goldsmith, M.A. (1997). Shared gamma(c) subunit within the human interleukin-7 receptor complex. A molecular basis for the pathogenesis of X-linked severe combined immunodeficiency. *The Journal of clinical investigation* 99, 169-177.

Laky, K., Lefrançois, L., Lingenheld, E.G., Ishikawa, H., Lewis, J.M., Olson, S., Suzuki, K., Tigelaar, R.E., and Puddington, L. (2000). Enterocyte Expression of Interleukin 7 Induces Development of  $\gamma\delta$  T Cells and Peyer's Patches. *The Journal of Experimental Medicine* 191, 1569.

Larmonier, N., Janikashvili, N., LaCasse, C.J., Larmonier, C.B., Cantrell, J., Situ, E., Lundeen, T., Bonnotte, B., and Katsanis, E. (2008). Imatinib mesylate inhibits CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell activity and enhances active immunotherapy against BCR-ABL- tumors. *J Immunol* 181, 6955-6963.

Lau, L.L., Jamieson, B.D., Somasundaram, T., and Ahmed, R. (1994). Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* 369, 648-652.

Laufer, T.M., DeKoning, J., Markowitz, J.S., Lo, D., and Glimcher, L.H. (1996). Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 383, 81-85.

Laukens, D., Brinkman, B.M., Raes, J., De Vos, M., and Vandenabeele, P. (2016). Heterogeneity of the gut microbiome in mice: guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiol Rev* *40*, 117-132.

Lawson, B.R., Gonzalez-Quintial, R., Eleftheriadis, T., Farrar, M.A., Miller, S.D., Sauer, K., McGavern, D.B., Kono, D.H., Baccala, R., and Theofilopoulos, A.N. (2015). Interleukin-7 is required for CD4(+) T cell activation and autoimmune neuroinflammation. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* *161*, 260-269.

Le Borgne, M., Ladi, E., Dzhagalov, I., Herzmark, P., Liao, Y.F., Chakraborty, A.K., and Robey, E.A. (2009). The impact of negative selection on thymocyte migration in the medulla. *Nat Immunol* *10*, 823-830.

Le Champion, A., Gagnerault, M.-C., Auffray, C., Bécourt, C., Poitrasson-Rivière, M., Lallemand, E., Bienvenu, B., Martin, B., Lepault, F., and Lucas, B. (2009). Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development. *Blood* *114*, 1784-1793.

Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D., and Paul, W.E. (1990). Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* *172*, 921-929.

Leavy, O. (2008). Selection and tolerance involve autophagy. *Nature Reviews Immunology* *8*, 747.

Legros, L., Ebran, N., Stebe, E., Rousselot, P., Rea, D., Cassuto, J.P., Mahon, F.X., and Hueber, A.O. (2012). Imatinib sensitizes T-cell lymphocytes from chronic myeloid leukemia patients to FasL-induced cell death: a brief communication. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)* *35*, 154-158.

Leonard, W.J., Shores, E.W., and Love, P.E. (1995). Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunological reviews* *148*, 97-114.

Li, J., Park, J., Foss, D., and Goldschneider, I. (2009). Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J Exp Med* *206*, 607-622.

Li, J., Yan, Y., Meng, Z., Liu, S., Beck, P.L., Ghosh, S., Qian, J., and Gui, X. (2017). Microscopic Colitis Evolved Into Inflammatory Bowel Diseases Is Characterized by Increased Th1/Tc1 Cells in Colonic Mucosal Lamina Propria. *Digestive diseases and sciences* *62*, 2755-2767.

Li, R., and Page, D.M. (2001). Requirement for a complex array of costimulators in the negative selection of autoreactive thymocytes in vivo. *J Immunol* *166*, 6050-6056.

Li, S., Couvillon, A.D., Brasher, B.B., and Van Etten, R.A. (2001). Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *The EMBO journal* 20, 6793-6804.

Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., *et al.* (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 180, 5916-5926.

Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E., and Petrie, H.T. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 194, 127-134.

Link, A., Vogt, T.K., Favre, S., Britschgi, M.R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J.G., and Luther, S.A. (2007). Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol* 8, 1255-1265.

Lio, C.W., Dodson, L.F., Deppong, C.M., Hsieh, C.S., and Green, J.M. (2010). CD28 facilitates the generation of Foxp3(-) cytokine responsive regulatory T cell precursors. *J Immunol* 184, 6007-6013.

Lio, C.W., and Hsieh, C.S. (2008). A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28, 100-111.

Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L., and Goodnow, C.C. (2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 4, 350-354.

Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., *et al.* (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature medicine* 8, 500-508.

Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S., and Ma, A. (1998). IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9, 669-676.

Lopes, N., Serge, A., Ferrier, P., and Irla, M. (2015). Thymic Crosstalk Coordinates Medulla Organization and T-Cell Tolerance Induction. *Front Immunol* 6, 365.

Lovett-Racke, A.E., Yang, Y., and Racke, M.K. (2011). Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochimica et biophysica acta* 1812, 246-251.

Lu, M., Tayu, R., Ikawa, T., Masuda, K., Matsumoto, I., Mugishima, H., Kawamoto, H., and Katsura, Y. (2005). The earliest thymic progenitors in adults are restricted to T, NK, and dendritic

cell lineage and have a potential to form more diverse TCRbeta chains than fetal progenitors. *J Immunol* *175*, 5848-5856.

Luckey, M.A., Kimura, M.Y., Waickman, A.T., Feigenbaum, L., Singer, A., and Park, J.-H. (2014). The transcription factor ThPOK suppresses Runx3 and imposes CD4(+) lineage fate by inducing the SOCS suppressors of cytokine signaling. *Nature immunology* *15*, 638-645.

MacDonald, H.R., Hengartner, H., and Pedrazzini, T. (1988). Intrathymic deletion of self-reactive cells prevented by neonatal anti-CD4 antibody treatment. *Nature* *335*, 174-176.

MacIver, N.J., Michalek, R.D., and Rathmell, J.C. (2013). Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annual review of immunology* *31*, 259-283.

Mackall, C.L., Bare, C.V., Granger, L.A., Sharrow, S.O., Titus, J.A., and Gress, R.E. (1996). Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol* *156*, 4609-4616.

Mackall, C.L., Fleisher, T.A., Brown, M.R., Andrich, M.P., Chen, C.C., Feuerstein, I.M., Horowitz, M.E., Magrath, I.T., Shad, A.T., and Steinberg, S.M. (1995). Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *The New England journal of medicine* *332*, 143-149.

Mackall, C.L., Hakim, F.T., and Gress, R.E. (1997). Restoration of T-cell homeostasis after T-cell depletion. *Seminars in immunology* *9*, 339-346.

Malchow, S., Leventhal, D.S., Lee, V., Nishi, S., Socci, N.D., and Savage, P.A. (2016). Aire Enforces Immune Tolerance by Directing Autoreactive T Cells into the Regulatory T Cell Lineage. *Immunity* *44*, 1102-1113.

Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* *441*, 231-234.

Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M., and Rudensky, A.Y. (2005). TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* *201*, 1061-1067.

Marie, J.C., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2006). Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* *25*, 441-454.

Marrack, P., Kappler, J., and Kotzin, B.L. (2001). Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nature medicine* *7*, 899-905.

- Marrella, V., Poliani, P.L., Fontana, E., Casati, A., Maina, V., Cassani, B., Ficara, F., Cominelli, M., Schena, F., Paulis, M., *et al.* (2012). Anti-CD3 $\epsilon$  mAb improves thymic architecture and prevents autoimmune manifestations in a mouse model of Omenn syndrome: therapeutic implications. *Blood* *120*, 1005-1014.
- Marrella, V., Poliani, P.L., Notarangelo, L.D., Grassi, F., and Villa, A. (2014). Rag defects and thymic stroma: lessons from animal models. *Front Immunol* *5*, 259.
- Martin-Gayo, E., Sierra-Filardi, E., Corbi, A.L., and Toribio, M.L. (2010). Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* *115*, 5366-5375.
- Mathis, D., and Benoist, C. (2009). Aire. *Annual review of immunology* *27*, 287-312.
- Matsue, H., Bergstresser, P.R., and Takashima, A. (1993). Keratinocyte-derived IL-7 serves as a growth factor for dendritic epidermal T cells in mice. *The Journal of Immunology* *151*, 6012.
- Matzinger, P., and Guerder, S. (1989). Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* *338*, 74-76.
- Mazzucchelli, R., and Durum, S.K. (2007). Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nature Reviews Immunology* *7*, 144-154.
- Mazzucchelli, R.I., Warming, S., Lawrence, S.M., Ishii, M., Abshari, M., Washington, A.V., Feigenbaum, L., Warner, A.C., Sims, D.J., Li, W.Q., *et al.* (2009). Visualization and identification of IL-7 producing cells in reporter mice. *PloS one* *4*, e7637.
- Mbongue, J., Nicholas, D., Firek, A., and Langridge, W. (2014). The role of dendritic cells in tissue-specific autoimmunity. *J Immunol Res*, 2014, 857143.
- McCaughy, T.M., Baldwin, T.A., Wilken, M.S., and Hogquist, K.A. (2008). Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J Exp Med* *205*, 2575-2584.
- McLean, M.H., Dieguez, D., Jr., Miller, L.M., and Young, H.A. (2015). Does the microbiota play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases? *Gut* *64*, 332-341.
- Medina, B.D., Liu, M., Vitiello, G.A., Seifert, A.M., Zeng, S., Bowler, T., Zhang, J.Q., Cavnar, M.J., Loo, J.K., Param, N.J., *et al.* (2019). Oncogenic kinase inhibition limits Batf3-dependent dendritic cell development and antitumor immunity. *J Exp Med* *216*, 1359-1376.
- Mencarelli, A., Khameneh, H.J., Fric, J., Vacca, M., El Daker, S., Janela, B., Tang, J.P., Nabti, S., Balachander, A., Lim, T.S., *et al.* (2018). Calcineurin-mediated IL-2 production by CD11c(high)MHCII(+) myeloid cells is crucial for intestinal immune homeostasis. *Nature communications* *9*, 1102.

Merayo-Chalico, J., Rajme-Lopez, S., Barrera-Vargas, A., Alcocer-Varela, J., Diaz-Zamudio, M., and Gomez-Martin, D. (2016). Lymphopenia and autoimmunity: A double-edged sword. *Human immunology* 77, 921-929.

Merkenschlager, M., Graf, D., Lovatt, M., Bommhardt, U., Zamoyska, R., and Fisher, A.G. (1997). How many thymocytes audition for selection? *J Exp Med* 186, 1149-1158.

Michie, A.M., Carlyle, J.R., Schmitt, T.M., Ljutic, B., Cho, S.K., Fong, Q., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2000). Clonal characterization of a bipotent T cell and NK cell progenitor in the mouse fetal thymus. *J Immunol* 164, 1730-1733.

Michie, A.M., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2002). Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. *Seminars in immunology* 14, 311-323.

Miller, J. (2019). How the thymus shaped immunology and beyond. *Immunol Cell Biol* 97, 299-304.

Miller, J.F. (1961). Immunological function of the thymus. *Lancet (London, England)* 2, 748-749.

Miller, J.F. (2002). The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunological reviews* 185, 7-14.

Millet, V., Naquet, P., and Guinamard, R.R. (2008). Intercellular MHC transfer between thymic epithelial and dendritic cells. *Eur J Immunol* 38, 1257-1263.

Million, R.P., and Van Etten, R.A. (2000). The Grb2 binding site is required for the induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice by the Bcr/Abl tyrosine kinase. *Blood* 96, 664-670.

Mombaerts, P., Mizoguchi, E., Grusby, M.J., Glimcher, L.H., Bhan, A.K., and Tonegawa, S. (1993). Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 75, 274-282.

Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* 7, 145-173.

Moutuou, M.M., Pagé, G., Zaid, I., Lesage, S., and Guimond, M. (2018). Restoring T Cell Homeostasis After Allogeneic Stem Cell Transplantation; Principal Limitations and Future Challenges. *Frontiers in immunology* 9, 1237-1237.

Murali-Krishna, K., Lau, L.L., Sambhara, S., Lemonnier, F., Altman, J., and Ahmed, R. (1999). Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science (New York, NY)* 286, 1377-1381.



- Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., and Tanaka, K. (2007). Regulation of CD8<sup>+</sup> T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 316, 1349-1353.
- Nancey, S., Holvoet, S., Graber, I., Joubert, G., Philippe, D., Martin, S., Nicolas, J.F., Desreumaux, P., Flourie, B., and Kaiserlian, D. (2006). CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice. *Gastroenterology* 131, 485-496.
- Naquet, P., Naspetti, M., and Boyd, R. (1999). Development, organization and function of the thymic medulla in normal, immunodeficient or autoimmune mice. *Seminars in immunology* 11, 47-55.
- Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N., and Klein, L. (2008). Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* 455, 396-400.
- Nell, S., Suerbaum, S., and Josenhans, C. (2010). The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. *Nature reviews Microbiology* 8, 564-577.
- Nelson, E.A., Walker, S.R., Weisberg, E., Bar-Natan, M., Barrett, R., Gashin, L.B., Terrell, S., Klitgaard, J.L., Santo, L., Addorio, M.R., *et al.* (2011). The STAT5 inhibitor pimoziide decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors. *Blood* 117, 3421-3429.
- Nesic, D., and Vukmanovic, S. (1998). MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8<sup>+</sup> thymic emigrants. *J Immunol* 160, 3705-3712.
- Ng, W.F., Duggan, P.J., Ponchel, F., Matarese, G., Lombardi, G., Edwards, A.D., Isaacs, J.D., and Lechler, R.I. (2001). Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 98, 2736-2744.
- Nishizuka, Y., and Sakakura, T. (1969). Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166, 753-755.
- Nosaka, T., van Deursen, J.M., Tripp, R.A., Thierfelder, W.E., Witthuhn, B.A., McMickle, A.P., Doherty, P.C., Grosveld, G.C., and Ihle, J.N. (1995). Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science* 270, 800-802.
- Nowell, P.C. (1962). The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut* 8, 65-66.
- Ochoa-Reparaz, J., Mielcarz, D.W., Ditrio, L.E., Burroughs, A.R., Foureau, D.M., Haque-Begum, S., and Kasper, L.H. (2009). Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 183, 6041-6050.

Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517-1523.

Oh, J., and Shin, J.S. (2015). The Role of Dendritic Cells in Central Tolerance. *Immune network* 15, 111-120.

Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S.B., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., and Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* 206, 549-559.

Org, T., Chignola, F., Hetenyi, C., Gaetani, M., Rebane, A., Liiv, I., Maran, U., Mollica, L., Bottomley, M.J., Musco, G., *et al.* (2008). The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to activate gene expression. *EMBO reports* 9, 370-376.

Ortega, S.B., Kashi, V.P., Tyler, A.F., Cunnusamy, K., Mendoza, J.P., and Karandikar, N.J. (2013). The disease-ameliorating function of autoregulatory CD8 T cells is mediated by targeting of encephalitogenic CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 191, 117-126.

Osborne, L.C., Dhanji, S., Snow, J.W., Priatel, J.J., Ma, M.C., Miners, M.J., Teh, H.-S., Goldsmith, M.A., and Abraham, N. (2007). Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R alpha mutant mice. *The Journal of experimental medicine* 204, 619-631.

Ouyang, W., Kolls, J.K., and Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28, 454-467.

Owen, D.L., Mahmud, S.A., Vang, K.B., Kelly, R.M., Blazar, B.R., Smith, K.A., and Farrar, M.A. (2018). Identification of Cellular Sources of IL-2 Needed for Regulatory T Cell Development and Homeostasis. *J Immunol* 200, 3926-3933.

Palandri, F., Castagnetti, F., Testoni, N., Luatti, S., Marzocchi, G., Bassi, S., Breccia, M., Alimena, G., Pungolino, E., Rege-Cambrin, G., *et al.* (2008). Chronic myeloid leukemia in blast crisis treated with imatinib 600 mg: outcome of the patients alive after a 6-year follow-up. *Haematologica* 93, 1792-1796.

Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* 8, 1353-1362.

Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., *et al.* (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6, 1133-1141.

Park, S.Y., Saijo, K., Takahashi, T., Osawa, M., Arase, H., Hirayama, N., Miyake, K., Nakauchi, H., Shirasawa, T., and Saito, T. (1995). Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* 3, 771-782.

Passos, G.A., Speck-Hernandez, C.A., Assis, A.F., and Mendes-da-Cruz, D.A. (2018). Update on Aire and thymic negative selection. *Immunology* 153, 10-20.

Pavey, T., Hoyle, M., Ciani, O., Crathorne, L., Jones-Hughes, T., Cooper, C., Osipenko, L., Venkatachalam, M., Rudin, C., Ukoumunne, O., *et al.* (2012). Dasatinib, nilotinib and standard-dose imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukaemia: systematic reviews and economic analyses. *Health technology assessment (Winchester, England)* 16, iii-iv, 1-277.

Pavlovsky, C., Kantarjian, H., and Cortes, J.E. (2009). First-line therapy for chronic myeloid leukemia: Past, present, and future. *American journal of hematology* 84, 287-293.

Pedros, C., Duguet, F., Saoudi, A., & Chabod, M. (2016). Disrupted regulatory T cell homeostasis in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 22, 974-995.

Pellegrini, M., Calzascia, T., Elford, A.R., Shahinian, A., Lin, A.E., Dissanayake, D., Dhanji, S., Nguyen, L.T., Gronski, M.A., Morre, M., *et al.* (2009). Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies. *Nature medicine* 15, 528-536.

Penaranda, C., Kuswanto, W., Hofmann, J., Kenefeck, R., Narendran, P., Walker, L.S.K., Bluestone, J.A., Abbas, A.K., and Dooks, H. (2012). IL-7 receptor blockade reverses autoimmune diabetes by promoting inhibition of effector/memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 12668-12673.

Pendergast, A.M., Quilliam, L.A., Cripe, L.D., Bassing, C.H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K.M., Der, C.J., Schlessinger, J., *et al.* (1993). BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75, 175-185.

Perera, J., Meng, L., Meng, F., and Huang, H. (2013). Autoreactive thymic B cells are efficient antigen-presenting cells of cognate self-antigens for T cell negative selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 17011-17016.

Perera, J., Zheng, Z., Li, S., Gudjonson, H., Kalinina, O., Benichou, J.I.C., Block, K.E., Louzoun, Y., Yin, D., Chong, A.S., *et al.* (2016). Self-Antigen-Driven Thymic B Cell Class Switching Promotes T Cell Central Tolerance. *Cell reports* 17, 387-398.

Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B., *et al.* (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180, 1955-1960.

Peterson, J.D., and Haskins, K. (1996). Transfer of diabetes in the NOD-scid mouse by CD4 T-cell clones. Differential requirement for CD8 T-cells. *Diabetes* 45, 328-336.

Petrie, H.T., Pearse, M., Scollay, R., and Shortman, K. (1990). Development of immature thymocytes: initiation of CD3, CD4, and CD8 acquisition parallels down-regulation of the interleukin 2 receptor alpha chain. *Eur J Immunol* 20, 2813-2815.

Petrie, H.T., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2007). Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annual review of immunology* 25, 649-679.

Poulin, L.F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J.L., Keller, A.M., Joffre, O., Zelenay, S., Nye, E., *et al.* (2010). Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med* 207, 1261-1271.

Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L.B., and Coffman, R.L. (1994). Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* 1, 553-562.

Powrie, F., and Mason, D. (1990). OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J Exp Med* 172, 1701-1708.

Prockop, S.E., and Petrie, H.T. (2004). Regulation of Thymus Size by Competition for Stromal Niches among Early T Cell Progenitors. *The Journal of Immunology* 173, 1604.

Proietto, A.I., Lahoud, M.H., and Wu, L. (2008a). Distinct functional capacities of mouse thymic and splenic dendritic cell populations. *Immunol Cell Biol* 86, 700-708.

Proietto, A.I., van Dommelen, S., and Wu, L. (2009). The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes. *Immunol Cell Biol* 87, 39-45.

Proietto, A.I., van Dommelen, S., Zhou, P., Rizzitelli, A., D'Amico, A., Steptoe, R.J., Naik, S.H., Lahoud, M.H., Liu, Y., Zheng, P., *et al.* (2008b). Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 19869-19874.

Puel, A., Ziegler, S.F., Buckley, R.H., and Leonard, W.J. (1998). Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet* 20, 394-397.

Ramsdell, F. (2003). Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 19, 165-168.

Ramsey, C., Winqvist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kampe, O., Eskelin, P., Pelto-Huikko, M., and Peltonen, L. (2002). Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Human molecular genetics* *11*, 397-409.

Raposo, B.R., Rodrigues-Santos, P., Carvalheiro, H., Agua-Doce, A.M., Carvalho, L., Pereira da Silva, J.A., Graca, L., and Souto-Carneiro, M.M. (2010). Monoclonal anti-CD8 therapy induces disease amelioration in the K/BxN mouse model of spontaneous chronic polyarthritis. *Arthritis and rheumatism* *62*, 2953-2962.

Rath, H.C., Schultz, M., Freitag, R., Dieleman, L.A., Li, F., Linde, H.J., Scholmerich, J., and Sartor, R.B. (2001). Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infection and immunity* *69*, 2277-2285.

Reche, P.A., Soumelis, V., Gorman, D.M., Clifford, T., Liu, M., Travis, M., Zurawski, S.M., Johnston, J., Liu, Y.J., Spits, H., *et al.* (2001). Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol* *167*, 336-343.

Repass, J.F., Laurent, M.N., Carter, C., Reizis, B., Bedford, M.T., Cardenas, K., Narang, P., Coles, M., and Richie, E.R. (2009). IL7-hCD25 and IL7-Cre BAC transgenic mouse lines: new tools for analysis of IL-7 expressing cells. *Genesis (New York, NY : 2000)* *47*, 281-287.

Reynolds, J., Norgan, V.A., Bhambra, U., Smith, J., Cook, H.T., and Pusey, C.D. (2002). Anti-CD8 monoclonal antibody therapy is effective in the prevention and treatment of experimental autoimmune glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* *13*, 359-369.

Ribeiro, A.R., Rodrigues, P.M., Meireles, C., Di Santo, J.P., and Alves, N.L. (2013). Thymocyte selection regulates the homeostasis of IL-7-expressing thymic cortical epithelial cells in vivo. *J Immunol* *191*, 1200-1209.

Rooke, R., Waltzinger, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1997). Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity* *7*, 123-134.

Rowley, J.D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* *243*, 290-293.

Rubtsov, Y.P., and Rudensky, A.Y. (2007). TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat Rev Immunol* *7*, 443-453.

Sacha, T. (2014). Imatinib in chronic myeloid leukemia: an overview. *Mediterr J Hematol Infect Dis* *6*, e2014007-e2014007.

Saglio, G., Kim, D.W., Issaragrisil, S., le Coutre, P., Etienne, G., Lobo, C., Pasquini, R., Clark, R.E., Hochhaus, A., Hughes, T.P., *et al.* (2010). Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 362, 2251-2259.

Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H.J., and von Boehmer, H. (2009). Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science*. 1994. 266: 1208-1212. *J Immunol* 182, 5165-5169.

Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., and Masuda, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161, 72-87.

Sakaguchi, S., Powrie, F., and Ransohoff, R.M. (2012). Re-establishing immunological self-tolerance in autoimmune disease. *Nature medicine* 18, 54-58.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., and Takahashi, T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological reviews* 182, 18-32.

Sakaguchi, S., Takahashi, T., and Nishizuka, Y. (1982). Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med* 156, 1577-1586.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775-787.

Sanford, D., Kantarjian, H., Skinner, J., Jabbour, E., and Cortes, J. (2015). Phase II trial of ponatinib in patients with chronic myeloid leukemia resistant to one previous tyrosine kinase inhibitor. *Haematologica* 100, e494-495.

Sansom, S.N., Shikama-Dorn, N., Zhanybekova, S., Nusspaumer, G., Macaulay, I.C., Deadman, M.E., Heger, A., Ponting, C.P., and Hollander, G.A. (2014). Population and single-cell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. *Genome research* 24, 1918-1931.

Santos, F.P., Kantarjian, H., Quintas-Cardama, A., and Cortes, J. (2011). Evolution of therapies for chronic myelogenous leukemia. *Cancer journal (Sudbury, Mass)* 17, 465-476.

Sattler, M., Mohi, M.G., Pride, Y.B., Quinnan, L.R., Malouf, N.A., Podar, K., Gesbert, F., Iwasaki, H., Li, S., Van Etten, R.A., *et al.* (2002). Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* 1, 479-492.

Sattler, M., and Salgia, R. (1997). Activation of hematopoietic growth factor signal transduction pathways by the human oncogene BCR/ABL. *Cytokine & growth factor reviews* 8, 63-79.

Sattler, M., and Salgia, R. (1998). Role of the adapter protein CRKL in signal transduction of normal hematopoietic and BCR/ABL-transformed cells. *Leukemia* 12, 637-644.

Savage, D.G., and Antman, K.H. (2002). Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. *The New England journal of medicine* 346, 683-693.

Sawyers, C.L. (1999). Chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 340, 1330-1340.

Sawyers, C.L., Hochhaus, A., Feldman, E., Goldman, J.M., Miller, C.B., Ottmann, O.G., Schiffer, C.A., Talpaz, M., Guilhot, F., Deininger, M.W., *et al.* (2002). Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 99, 3530-3539.

Schatz, D.G., and Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol* 11, 251-263.

Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59, 1035-1048.

Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W.T., Clarkson, B., and Kuriyan, J. (2000). Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289, 1938-1942.

Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C., and Lefrançois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nature Immunology* 1, 426-432.

Schluns, K.S., and Lefrançois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nature Reviews Immunology* 3, 269-279.

Schmitt, T.M., Ciofani, M., Petrie, H.T., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2004). Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp Med* 200, 469-479.

Schmitt, T.M., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2002). Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17, 749-756.

Scholz, F., Badgley, B.D., Sadowsky, M.J., and Kaplan, D.H. (2014). Immune mediated shaping of microflora community composition depends on barrier site. *PloS one* 9, e84019.

Seddon, B., Tomlinson, P., and Zamoyska, R. (2003). Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* 4, 680-686.

Seddon, B., and Zamoyska, R. (2002a). TCR and IL-7 receptor signals can operate independently or synergize to promote lymphopenia-induced expansion of naive T cells. *J Immunol* 169, 3752-3759.

Seddon, B., and Zamoyska, R. (2002b). TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells. *J Immunol* 169, 2997-3005.

Seggewiss, R., Lore, K., Greiner, E., Magnusson, M.K., Price, D.A., Douek, D.C., Dunbar, C.E., and Wiestner, A. (2005). Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner. *Blood* 105, 2473-2479.

Shah, N.P., Tran, C., Lee, F.Y., Chen, P., Norris, D., and Sawyers, C.L. (2004). Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 305, 399-401.

Shalapour, S., Deiser, K., Sercan, O., Tuckermann, J., Minnich, K., Willmsky, G., Blankenstein, T., Hammerling, G.J., Arnold, B., and Schuler, T. (2010). Commensal microflora and interferon-gamma promote steady-state interleukin-7 production in vivo. *Eur J Immunol* 40, 2391-2400.

Sharma, R., Sung, S.S., Fu, S.M., and Ju, S.T. (2009). Regulation of multi-organ inflammation in the regulatory T cell-deficient scurfy mice. *Journal of biomedical science* 16, 20.

Shet, A.S., Jahagirdar, B.N., and Verfaillie, C.M. (2002). Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia* 16, 1402-1411.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., *et al.* (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867.

Shitara, S., Hara, T., Liang, B., Wagatsuma, K., Zuklys, S., Hollander, G.A., Nakase, H., Chiba, T., Tani-ichi, S., and Ikuta, K. (2013). IL-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCRgammadelta+ intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* 190, 6173-6179.

Shores, E.W., Van Ewijk, W., and Singer, A. (1991). Disorganization and restoration of thymic medullary epithelial cells in T cell receptor-negative scid mice: evidence that receptor-bearing lymphocytes influence maturation of the thymic microenvironment. *Eur J Immunol* 21, 1657-1661.



Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G.J., and Scollay, R. (1990). The generation and fate of thymocytes. *Seminars in immunology* 2, 3-12.

Shortman, K., Vremec, D., Corcoran, L.M., Georgopoulos, K., Lucas, K., and Wu, L. (1998). The linkage between T-cell and dendritic cell development in the mouse thymus. *Immunological reviews* 165, 39-46.

Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians* 65, 5-29.

Simonetta, F., Gestermann, N., Bloquet, S., and Bourgeois, C. (2014). Interleukin-7 optimizes FOXP3+CD4+ regulatory T cells reactivity to interleukin-2 by modulating CD25 expression. *PloS one* 9, e113314.

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

Singh, K., Hjort, M., Thorvaldson, L., and Sandler, S. (2015). Concomitant analysis of Helios and Neuropilin-1 as a marker to detect thymic derived regulatory T cells in naive mice. *Scientific reports* 5, 7767.

Skulina, C., Schmidt, S., Dornmair, K., Babbe, H., Roers, A., Rajewsky, K., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Goebels, N. (2004). Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2428-2433.

Sohn, S.J., Thompson, J., and Winoto, A. (2007). Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes. *Current opinion in immunology* 19, 510-515.

Sorg, R.V., McLellan, A.D., Hock, B.D., Fearnley, D.B., and Hart, D.N. (1998). Human dendritic cells express functional interleukin-7. *Immunobiology* 198, 514-526.

Sprent, J., and Webb, S.R. (1995). Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Current opinion in immunology* 7, 196-205.

Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology* 21, 139-176.

Steelman, L.S., Pohnert, S.C., Shelton, J.G., Franklin, R.A., Bertrand, F.E., and McCubrey, J.A. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18, 189-218.

Stein, B., and Smith, B.D. (2010). Treatment options for patients with chronic myeloid leukemia who are resistant to or unable to tolerate imatinib. *Clinical therapeutics* 32, 804-820.

Stritesky, G.L., Xing, Y., Erickson, J.R., Kalekar, L.A., Wang, X., Mueller, D.L., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2013). Murine thymic selection quantified using a unique method to capture deleted T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 4679-4684.

Strzępa, A., Majewska-Szczepanik, M., Lobo, F.M., Wen, L., and Szczepanik, M. (2017). Broad spectrum antibiotic enrofloxacin modulates contact sensitivity through gut microbiota in a murine model. *J Allergy Clin Immunol* 140, 121-133.e123.

Strzępa, A., Marcińska, K., Majewska-Szczepanik, M., and Szczepanik, M. (2019). Oral treatment with enrofloxacin creates anti-inflammatory environment that supports induction of tolerogenic dendritic cells. *International immunopharmacology* 77, 105966.

Su, D.M., Navarre, S., Oh, W.J., Condie, B.G., and Manley, N.R. (2003). A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat Immunol* 4, 1128-1135.

Surh, C.D., Ernst, B., and Sprent, J. (1992). Growth of epithelial cells in the thymic medulla is under the control of mature T cells. *J Exp Med* 176, 611-616.

Surh, C.D., and Sprent, J. (1994). T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372, 100-103.

Surh, C.D., and Sprent, J. (2005). Regulation of mature T cell homeostasis. *Seminars in immunology* 17, 183-191.

Surh, C.D., and Sprent, J. (2008). Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29, 848-862.

Suzuki, K., Nakajima, H., Saito, Y., Saito, T., Leonard, W.J., and Iwamoto, I. (2000). Janus kinase 3 (Jak3) is essential for common cytokine receptor gamma chain (gamma(c))-dependent signaling: comparative analysis of gamma(c), Jak3, and gamma(c) and Jak3 double-deficient mice. *International immunology* 12, 123-132.

Swainson, L., Kinet, S., Mongellaz, C., Sourisseau, M., Henriques, T., and Taylor, N. (2007). IL-7-induced proliferation of recent thymic emigrants requires activation of the PI3K pathway. *Blood* 109, 1034-1042.

Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.

Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 6, 152-162.

Tai, X., Van Laethem, F., Pobeziński, L., Guintert, T., Sharrow, S.O., Adams, A., Granger, L., Kruhlak, M., Lindsten, T., Thompson, C.B., *et al.* (2012). Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells. *Blood* 119, 5155-5163.

Taieb, J., Maruyama, K., Borg, C., Terme, M., and Zitvogel, L. (2004). Imatinib mesylate impairs Flt3L-mediated dendritic cell expansion and antitumor effects in vivo. *Blood* 103, 1966-1967; author reply 1967.

Takaba, H., Morishita, Y., Tomofuji, Y., Danks, L., Nitta, T., Komatsu, N., Kodama, T., and Takayanagi, H. (2015). Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell* 163, 975-987.

Takada, K., and Jameson, S.C. (2009a). Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol* 9, 823-832.

Takada, K., and Jameson, S.C. (2009b). Self-class I MHC molecules support survival of naive CD8 T cells, but depress their functional sensitivity through regulation of CD8 expression levels. *J Exp Med* 206, 2253-2269.

Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6, 127-135.

Takeda, S., Rodewald, H.R., Arakawa, H., Bluethmann, H., and Shimizu, T. (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.

Tan, J.T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K.I., and Surh, C.D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8732-8737.

Tan, J.T., Ernst, B., Kieper, W.C., LeRoy, E., Sprent, J., and Surh, C.D. (2002). Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J Exp Med* 195, 1523-1532.

Tanchot, C., Lemonnier, F.A., Pérarnau, B., Freitas, A.A., and Rocha, B. (1997). Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science (New York, NY)* 276, 2057-2062.

Teshima, T., Reddy, P., Liu, C., Williams, D., Cooke, K.R., and Ferrara, J.L. (2003). Impaired thymic negative selection causes autoimmune graft-versus-host disease. *Blood* *102*, 429-435.

Theofilopoulos, A.N., Kono, D.H., and Baccala, R. (2017). The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol* *18*, 716-724.

Thoene-Reineke, C., Fischer, A., Friese, C., Briesemeister, D., Gobel, U.B., Kammertoens, T., Bereswill, S., and Heimesaat, M.M. (2014). Composition of intestinal microbiota in immune-deficient mice kept in three different housing conditions. *PloS one* *9*, e113406.

Thompson, P.K., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2011). On becoming a T cell, a convergence of factors kick it up a Notch along the way. *Seminars in immunology* *23*, 350-359.

Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., and Shevach, E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol* *184*, 3433-3441.

Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* *188*, 287-296.

Tokarski, J.S., Newitt, J.A., Chang, C.Y., Cheng, J.D., Wittekind, M., Kiefer, S.E., Kish, K., Lee, F.Y., Borzilleri, R., Lombardo, L.J., *et al.* (2006). The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer research* *66*, 5790-5797.

Tough, D.F., and Sprent, J. (1994). Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med* *179*, 1127-1135.

Traugott, U., and Lebon, P. (1988). Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Annals of neurology* *24*, 243-251.

Trela, E., Glowacki, S., and Błasiak, J. (2014). Therapy of Chronic Myeloid Leukemia: Twilight of the Imatinib Era? *ISRN Oncology* *2014*, 596483.

Uhlig, H.H., Coombes, J., Mottet, C., Izcue, A., Thompson, C., Fanger, A., Tannapfel, A., Fontenot, J.D., Ramsdell, F., and Powrie, F. (2006). Characterization of Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and IL-10-secreting CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells during cure of colitis. *J Immunol* *177*, 5852-5860.

van Santen, H.M., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med* *200*, 1221-1230.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.

Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology* 8, 523-532.

Villa, A., Sobacchi, C., Notarangelo, L.D., Bozzi, F., Abinun, M., Abrahamsen, T.G., Arkwright, P.D., Baniyash, M., Brooks, E.G., Conley, M.E., *et al.* (2001). V(D)J recombination defects in lymphocytes due to RAG mutations: severe immunodeficiency with a spectrum of clinical presentations. *Blood* 97, 81-88.

Viret, C., Lamare, C., Guiraud, M., Fazilleau, N., Bour, A., Malissen, B., Carrier, A., and Guerder, S. (2011). Thymus-specific serine protease contributes to the diversification of the functional endogenous CD4 T cell receptor repertoire. *J Exp Med* 208, 3-11.

Vogt, T.K., Link, A., Perrin, J., Finke, D., and Luther, S.A. (2009). Novel function for interleukin-7 in dendritic cell development. *Blood* 113, 3961-3968.

von Boehmer, H., Aifantis, I., Azogui, O., Feinberg, J., Saint-Ruf, C., Zober, C., Garcia, C., and Buer, J. (1998). Crucial function of the pre-T-cell receptor (TCR) in TCR beta selection, TCR beta allelic exclusion and alpha beta versus gamma delta lineage commitment. *Immunological reviews* 165, 111-119.

von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M., and Murray, R. (1997). The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 7, 147-154.

von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L.A., McNeil, T., Burdach, S.E., and Murray, R. (1995). Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181, 1519-1526.

Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164, 2978-2986.

Watanabe, M., Ueno, Y., Yajima, T., Iwao, Y., Tsuchiya, M., Ishikawa, H., Aiso, S., Hibi, T., and Ishii, H. (1995). Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *The Journal of clinical investigation* 95, 2945-2953.

Watanabe, Y., Mazda, O., Aiba, Y., Iwai, K., Gyotoku, J., Ideyama, S., Miyazaki, J., and Katsura, Y. (1992). A murine thymic stromal cell line which may support the differentiation of CD4-8-thymocytes into CD4+8- alpha beta T cell receptor positive T cells. *Cellular immunology* 142, 385-397.

Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., *et al.* (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med* 209, 1723-1742, s1721.

Weist, B.M., Kurd, N., Boussier, J., Chan, S.W., and Robey, E.A. (2015). Thymic regulatory T cell niche size is dictated by limiting IL-2 from antigen-bearing dendritic cells and feedback competition. *Nat Immunol* 16, 635-641.

Werlen, G., Hausmann, B., Naeher, D., and Palmer, E. (2003). Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science* 299, 1859-1863.

Westermann, J., Aicher, A., Qin, Z., Cayeux, Z., Daemen, K., Blankenstein, T., Dorken, B., and Pezzutto, A. (1998). Retroviral interleukin-7 gene transfer into human dendritic cells enhances T cell activation. *Gene therapy* 5, 264-271.

Willcox, A., Richardson, S.J., Bone, A.J., Foulis, A.K., and Morgan, N.G. (2009). Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clinical and experimental immunology* 155, 173-181.

Williams, J.A., Zhang, J., Jeon, H., Nitta, T., Ohigashi, I., Klug, D., Kruhlak, M.J., Choudhury, B., Sharrow, S.O., Granger, L., *et al.* (2014). Thymic medullary epithelium and thymocyte self-tolerance require cooperation between CD28-CD80/86 and CD40-CD40L costimulatory pathways. *J Immunol* 192, 630-640.

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science* 322, 271-275.

Witthuhn, B.A., Silvennoinen, O., Miura, O., Lai, K.S., Cwik, C., Liu, E.T., and Ihle, J.N. (1994). Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature* 370, 153-157.

Wofford, J.A., Wieman, H.L., Jacobs, S.R., Zhao, Y., and Rathmell, J.C. (2008). IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood* 111, 2101-2111.

Wong, C.K., Ho, C.Y., Li, E.K., and Lam, C.W. (2000). Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 9, 589-593.

Wootla, B., Eriguchi, M., and Rodriguez, M. (2012). Is multiple sclerosis an autoimmune disease? *Autoimmune diseases* 2012, 969657-969657.

Wuest, T. Y., Willette-Brown, J., Durum, S. K., Hurwitz, A. A. (2008) The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* 84, 973– 980.

Wu, L., and Shortman, K. (2005). Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Seminars in immunology* 17, 304-312.

Xiao, S., H. Jin, T. Korn, S. M. Liu, M. Oukka, B. Lim and V. K. Kuchroo (2008). Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J Immunol* 181, 2277-2284.

Xing, Y., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2013). Thymoproteasome subunit- $\beta$ 5T generates peptide-MHC complexes specialized for positive selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 6979-6984.

Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., *et al.* (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med* 209, 1713-1722, s1711-1719.

Yamano, T., Steinert, M., and Klein, L. (2015). Thymic B Cells and Central T Cell Tolerance. *Front Immunol* 6, 376.

Yan, J., and Mamula, M.J. (2002). Autoreactive T cells revealed in the normal repertoire: escape from negative selection and peripheral tolerance. *J Immunol* 168, 3188-3194.

Yang, G.X., Lian, Z.X., Kikuchi, K., Moritoki, Y., Ansari, A.A., Liu, Y.J., Ikehara, S., and Gershwin, M.E. (2005). Plasmacytoid dendritic cells of different origins have distinct characteristics and function: studies of lymphoid progenitors versus myeloid progenitors. *J Immunol* 175, 7281-7287.

Yang, J., Murphy, T.L., Ouyang, W., and Murphy, K.M. (1999). Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Eur J Immunol* 29, 548-555.

Yao, Z., Cui, Y., Watford, W.T., Bream, J.H., Yamaoka, K., Hissong, B.D., Li, D., Durum, S.K., Jiang, Q., Bhandoola, A., *et al.* (2006). Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1000-1005.

Yarilin, A.A., and Belyakov, I.M. (2004). Cytokines in the thymus: production and biological effects. *Current medicinal chemistry* 11, 447-464.

Yasuda, K., Takeuchi, Y., and Hirota, K. (2019). The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Seminars in immunopathology* 41, 283-297.

Ye, D., Wolff, N., Li, L., Zhang, S., and Ilaria, R.L., Jr. (2006). STAT5 signaling is required for the efficient induction and maintenance of CML in mice. *Blood* 107, 4917-4925.

Yi, J.S., Guidon, A., Sparks, S., Osborne, R., Juel, V.C., Massey, J.M., Sanders, D.B., Weinhold, K.J., and Guphill, J.T. (2014). Characterization of CD4 and CD8 T cell responses in MuSK myasthenia gravis. *Journal of autoimmunity* 52, 130-138.

Yu, Q., Erman, B., Bhandoola, A., Sharrow, S.O., and Singer, A. (2003). In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 197, 475-487.

Yura, M., Takahashi, I., Serada, M., Koshio, T., Nakagami, K., Yuki, Y., and Kiyono, H. (2001). Role of MOG-stimulated Th1 type "light up" (GFP<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of autoimmunity* 17, 17-25.

Zamisch, M., Moore-Scott, B., Su, D.M., Lucas, P.J., Manley, N., and Richie, E.R. (2005). Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells. *J Immunol* 174, 60-67.

Zhang, H., Sparks, J.B., Karyala, S.V., Settlage, R., and Luo, X.M. (2015). Host adaptive immunity alters gut microbiota. *The ISME journal* 9, 770-781.

Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D.F., and Sprent, J. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8<sup>+</sup> T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8, 591-599.

Zhao, B., Chang, L., Fu, H., Sun, G., and Yang, W. (2018). The Role of Autoimmune Regulator (AIRE) in Peripheral Tolerance. *J Immunol Res* 2018, 3930750-3930750.

Zheng, S. G., Wang, J., Wang, P., Gray, J. D., & Horwitz, D. A. (2007). IL-2 is essential for TGF- $\beta$  to convert naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells to CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol*, 178, 2018-2027.

Zhou, L., Chong, M.M., and Littman, D.R. (2009). Plasticity of CD4<sup>+</sup> T cell lineage differentiation. *Immunity* 30, 646-655.

Zinkernagel, R.M., Callahan, G.N., Althage, A., Cooper, S., Klein, P.A., and Klein, J. (1978). On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition? *J Exp Med* 147, 882-896.

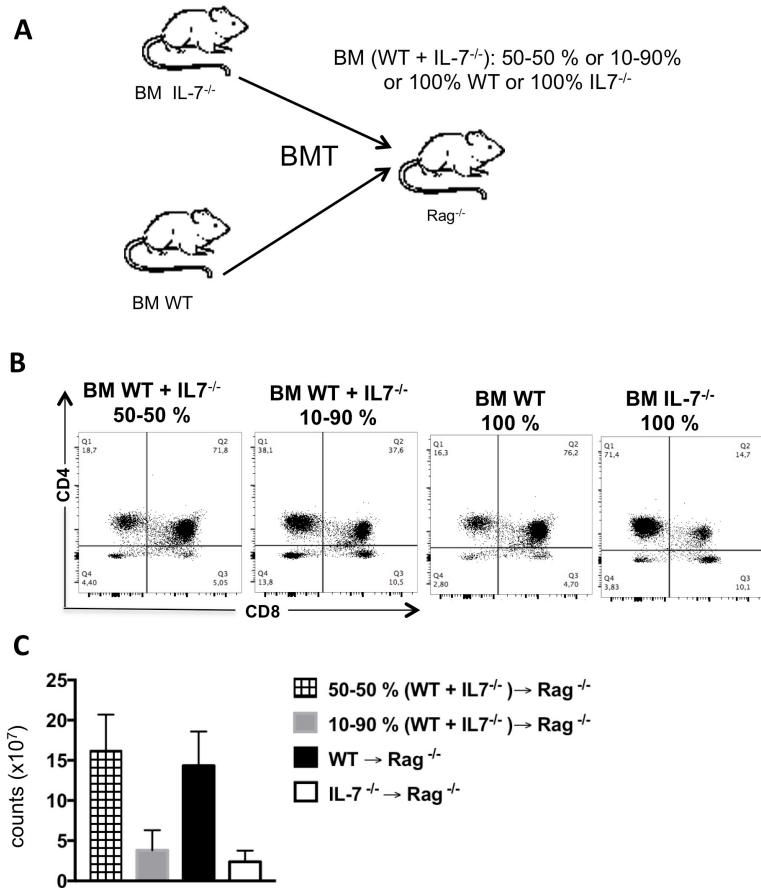
Zou, W., and Restifo, N.P. (2010). TH17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 10, 248-256.



Zubkova, I., Mostowski, H., and Zaitseva, M. (2005). Up-regulation of IL-7, stromal-derived factor-1 alpha, thymus-expressed chemokine, and secondary lymphoid tissue chemokine gene expression in the stromal cells in response to thymocyte depletion: implication for thymus reconstitution. *J Immunol* 175, 2321-2330.

Zúñiga-Pflücker, J.C. (2004). T-cell development made simple. *Nature Reviews Immunology* 4, 67-72.

# Annexes



**Figure 1 annexe : Reconstitution thymique suivie d'une atrophie sévère du thymus chez les chimères [WT 10% +IL-7 - / - 90%→ Rag - / -] et [IL-7 - / - 100%→ Rag - / -]**

(A) Dot plot montrant l'expression des CD4 + et CD8 + sur les thymocytes de différents chimères au jour 35 post-SCT. (B) Histogramme montrant le nombre de thymocytes. Les données sont représentatives d'1 expérience indépendante, N = 2 souris par groupes.

**Publications annexes**

**En**

**Première auteure**

## **Article 1**

# **Restoring T Cell Homeostasis After Allogeneic Stem Cell Transplantation; Principal Limitations and Future**

## **Challenges *Frontiers in Immunology 2018***

Moutuaata M. Moutuou, Gabriel Pagé, Intesar Zaid, Sylvie Lesage and  
Martin Guimond



# Restoring T Cell Homeostasis After Allogeneic Stem Cell Transplantation; Principal Limitations and Future Challenges

Moutuaata M. Moutuou<sup>1,2</sup>, Gabriel Pagé<sup>2</sup>, Intesar Zaid<sup>1,2</sup>, Sylvie Lesage<sup>1,2</sup> and Martin Guimond<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Division d'Hématologie-Oncologie, Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, QC, Canada, <sup>2</sup>Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Hans-Jochem Kolb,  
Kolb Consulting UG,  
Germany

### Reviewed by:

Benedetto Bruno,  
Università degli Studi di  
Torino, Italy  
Evelyn Ulrich,  
Goethe-Universität Frankfurt  
am Main, Germany

### \*Correspondence:

Martin Guimond  
martin.guimond@umontreal.ca

### Specialty section:

This article was submitted to  
Alloimmunity  
and Transplantation,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 02 March 2018

Accepted: 17 May 2018

Published: 18 June 2018

### Citation:

Moutuou MM, Pagé G, Zaid I,  
Lesage S and Guimond M (2018)  
Restoring T Cell Homeostasis After  
Allogeneic Stem Cell Transplantation;  
Principal Limitations and  
Future Challenges.  
Front. Immunol. 9:1237.  
doi: 10.3389/fimmu.2018.01237

For several leukemia patients, allogeneic stem cell transplantation (allogeneic-SCT) is the unique therapeutic modality that could potentially cure their disease. Despite significant progress made in clinical management of allogeneic-SCT, acute graft-versus-host disease (aGVHD) and infectious complications remain the second and third cause of death after disease recurrence. Clinical options to restore immunocompetence after allogeneic-SCT are very limited as studies have raised awareness about the safety with regards to graft-versus-host disease (GVHD). Preclinical works are now focusing on strategies to improve thymic functions and to restore the peripheral niche that have been damaged by alloreactive T cells. In this mini review, we will provide a brief overview about the adverse effects of GVHD on the thymus and the peripheral niche and the resulting negative outcome on peripheral T cell homeostasis. Finally, we will discuss the potential relevance of coordinating our studies on thymic rejuvenation and improvement of the peripheral lymphoid niche to achieve optimal T cell regeneration in GVHD patients.

**Keywords:** interleukin-7, dendritic cells, lymphopenia, lymphocytes, stem cell transplantation, GVHD, IL-7, SDF-1 $\alpha$

## KEY POINTS

- GVHD effect on the thymus.
- GVHD effect on the peripheral niche.
- Addressing the dysfunction of the thymus and the peripheral niche to improve T cell regeneration in GVHD patients.

## INTRODUCTION

Allogeneic-SCT was developed to treat leukemia and lymphoma as well as congenital or acquired hematologic conditions. Despite important side effects, allogeneic-SCT remains the only curative treatment for several patients with high risk refractory hematologic cancers. Acute graft-versus-host disease (aGVHD) is a serious complication of allogeneic-SCT that occurs when donor lymphocytes react to normal host-tissues. Paradoxically, alloreactive T cells can improve survival by eliminating residual leukemia cells that survive SCT; a reaction known as graft-versus-leukemia effect (1). Following SCT, donor hematopoietic stem cells home to the bone marrow (BM) and differentiate into white cells, megakaryocytes and erythrocytes. While the recovery of innate

immune cells is relatively fast, regeneration of lymphocytes is slower and can be further delayed by aGVHD (2, 3). For several years, it was believed that the failure to recover T cells post-SCT was essentially attributed to thymic dysfunction. Today, it is well known that the size of the lymphocyte pool is controlled by the thymus but also by the peripheral niche that provides resources for T cells to survive in the periphery. Recent functional studies have demonstrated a significant reduction in the bioavailability of peripheral T cell resources in graft-versus-host disease (GVHD) hosts, which contributes to the more important immunosuppression in allogeneic-SCT compared with autologous-SCT. As a result, lymphopenia is typically more severe in GVHD patients and clinical options to accelerate lymphocyte reconstitution are virtually inexistent because of the risk to aggravate aGVHD (4, 5). In this mini-review, we will address how aGVHD affects thymopoiesis and the peripheral niche, and we will propose potential strategies to improve immune reconstitution after allogeneic-SCT.

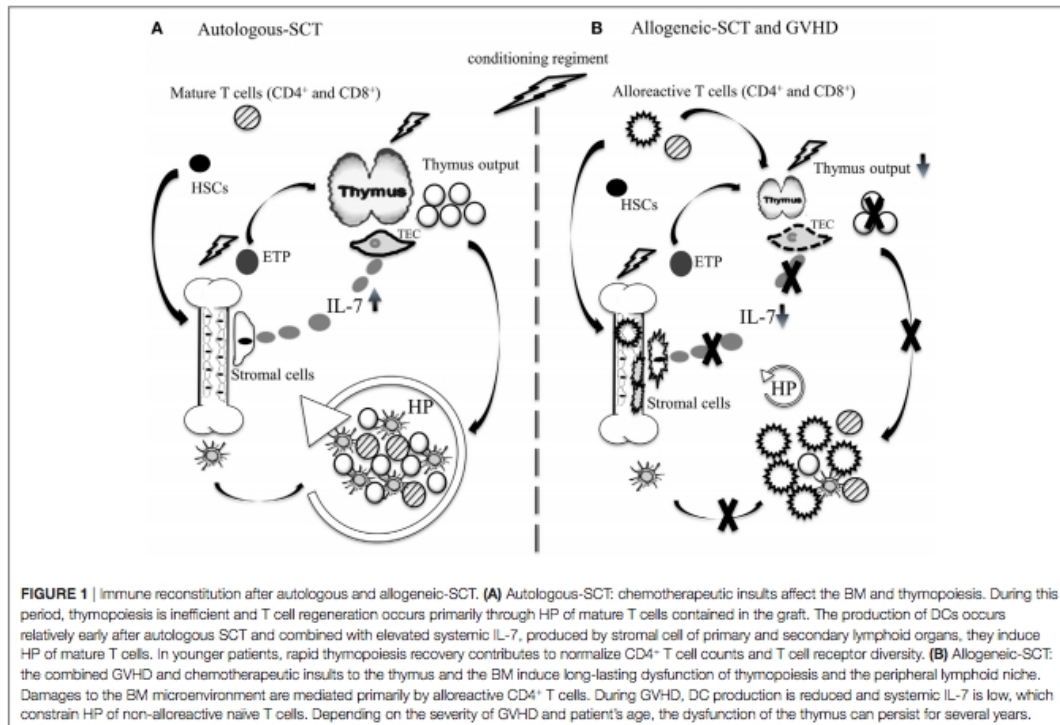
## IMMUNE RECONSTITUTION IN A NON-GVHD SETTING

Lymphocyte regeneration can occur through thymopoiesis and/or *via* homeostatic proliferation (HP) of mature lymphocytes (2). In younger patients, thymic regeneration typically occurs

during the first-year post-transplantation and is normally followed by rapid normalization of T cell counts (2). In adults, age-related thymic involution combined with therapy-induced cytotoxic insults result in prolonged thymic dysfunction. During this period, T cell regeneration occurs primarily through HP of mature lymphocytes contained in the graft (Figure 1A). In addition to interleukin-7 (IL-7), T cell receptor (TCR) stimulation by major histocompatibility complexes (MHCs) class I or II is necessary for HP of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> lymphocytes, respectively (6). While HP is sufficient for restoring CD8 counts, it is normally insufficient for CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and the full recovery of the CD4 subset can take several months or years to occur and depends largely on thymic recovery (2). B cell recovery takes between 3 and 6 months to occur (7, 8), whereas DC recovery after autologous-SCT is normally fast. Given that DCs are important for NK cell homeostasis, they likely influenced NK regeneration which also occurs within few weeks post-SCT (9, 10) (Table 1).

## IMMUNE RECONSTITUTION AFTER ALLOGENEIC-SCT AND GVHD

The immunosuppression that occurs after allogeneic-SCT is typically more important than the level of immunosuppression normally seen after autologous-SCT. Patients undergoing





allogeneic-SCT experience a phase of profound lymphopenia that can last several months or years (18, 19). Depending on the severity of the aGVHD, the regeneration of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes can be further delayed. The current models put forth to explain how aGVHD affects T cell reconstitution relates to two primary factors: GVHD-mediated damage to the thymic microenvironment essential for T cell production (20); and the dysfunction of the peripheral niche essential for the survival and HP of naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the periphery (Figure 1B) (21–23). These animal studies have provided a new model to explain the profound immunosuppression typically seen in GVHD patients.

In contrast, the effect of chronic GVHD (cGVHD) on T cell regeneration is not as well understood. cGVHD occurs normally after aGVHD and during this period, T cell regeneration is already compromised. While aGVHD is mediated by mature lymphocytes contained in the graft, the origin of cGVHD appears related to leakage and release of donor-derived autoreactive lymphocytes by the thymus (Figure 2). As a result, clinical manifestations are different from aGVHD with cGVHD symptoms resembling those in patients with systemic autoimmune diseases (24).

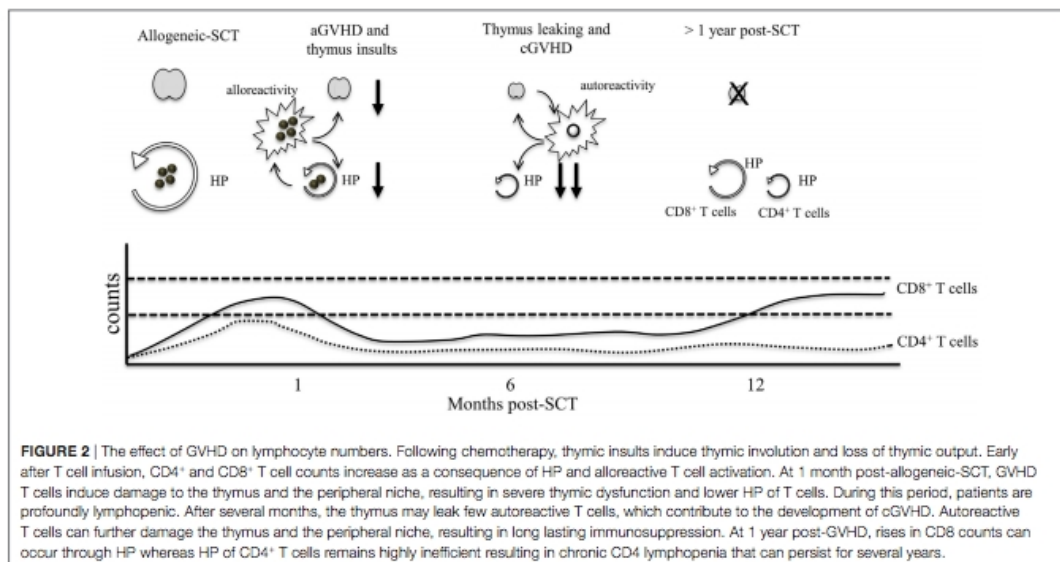
Immunosuppressive therapies use to control GVHD can affect lymphocyte reconstitution. Cyclosporine A and methotrexate alter B cell differentiation and thymocytes and peripheral T cell survival by interfering with TCR signaling (7, 25, 26). Novel drugs used to control refractory cGVHD are tyrosine kinase inhibitors, which can interfere with TCR or IL-7 signaling to reduce lymphocyte activation with potential detrimental effects on T cell survival (27–29). Thus, in addition to chemotherapeutic and GVHD insults that affect lymphoid organs, the prophylaxis used to control GVHD can further constrain lymphocyte regeneration after allogeneic-SCT.

## GVHD EFFECTS ON THE THYMUS

The rich microenvironment of the thymus in MHC-I and II expression by thymic epithelial cells (TECs) and antigen-presenting cells render the thymus a significant target for alloreactive lymphocytes (30). While studies have demonstrated that the thymic recovery that occurs after autologous-SCT is associated with rapid normalization of the T cell repertoire (2), thymic rebound that occurs after allogeneic-SCT is often insufficient for restoring T cell counts and diversity, even in children (31, 32). Such differences in TCR diversity following autologous and allogeneic-SCT suggest that some elements of the thymus undergo significant damages by alloreactivity. Indeed, thymic-dependent immune reconstitution of T lymphocytes is severely impaired after allogeneic-SCT and further compromised by aGVHD (20, 33). The contribution of cGVHD T cells to thymic insults remains largely unknown since thymus atrophy is normally severe during this period. However, thymus infiltration by autoreactive T cells can occur in mice with systemic

**TABLE 1** | Time line of immune reconstitution of immune cells after autologous and allogeneic-SCT (7, 11–17).

Cells subsets	Autologous-SCT	Allogeneic-SCT (years)
CD4 <sup>+</sup> lymphocytes	>1 year	>2
CD8 <sup>+</sup> lymphocytes	1–3 months	1–2
NK cells	1–2 months	1–2
Dendritic cells	1–2 months	1–2
B lymphocytes	3–6 months	>2





autoimmune diseases, suggesting a potential contribution of cGVHD T cells to thymic damage (34).

Evaluation of thymopoiesis can be measured by T-cell receptor excision circles (TREC) that are generated from the rearrangement of the V and J segments at the TCR $\alpha$  locus and thus correlate with thymic output of naïve T cells (35, 36). Depending of the robustness of the thymic output before transplantation, clinical outcomes and incidence of GVHD may vary (37). During GVHD, TREC levels are normally low and correlate with low levels of recent thymic emigrants (RTEs) detected in the blood (36, 38–41). Other factors such as age, preparative regimen, source of stem cells could also affect thymopoiesis (42, 43).

Normal thymopoiesis proceeds in a thymic microenvironment composed of a cortex and a medulla separated by the cortico–medullary junction. TECs are the major component of the thymus stroma that guide thymocyte development. Cortical thymic epithelial cells (cTECs) and medullary thymic epithelial cells (mTECs) have distinct functions and play a critical role during positive and negative selection of thymocytes to produce conventional T cells and non-conventional FOXP3<sup>+</sup> regulatory CD4<sup>+</sup> T cells (44–48). Following allogeneic-SCT, aGVHD induces loss of the delimitation between the cortex and the medulla (49, 50). Alloreactive lymphocytes can eliminate cTECs and mTECs, which explains the reduction of the number of mTECs expressing the transcription factor AIRE “autoimmune regulator” during GVHD (51–53). Loss of TECs is associated with diminished IL-7 production, which contributes to thymocyte death and loss of thymic output during aGVHD (54). While GVHD insults to cTECs can impair positive selection, GVHD alteration to mTECs is more insidious and could impair the negative selection of autoreactive thymocytes and contribute to cGVHD (55, 56). Furthermore, several DC subsets collaborate with mTECs to induce negative selection of self-reactive thymocytes and during GVHD, they are eliminated by alloreactive T cells, which lead to the development of cGVHD (57–60). Thus, although thymic recovery is an essential step toward normalization of T cell counts, the production of self-reactive T cells during/after aGVHD could negatively impact the benefit of thymic dependent T cell regeneration. Effective thymic recovery in a GVHD setting will need to include means to ensure adequate positive and negative selection of thymocytes to preclude the generation of potentially autoreactive lymphocytes that could exacerbate the pathology.

## GVHD EFFECTS ON THE PERIPHERAL NICHE

Several studies have demonstrated that GVHD induces significant damage to the peripheral niche that controls T cell homeostasis (21–23). During lymphopenia, IL-7 accumulates due to a reduced consumption by the limited number of T cells (61). In addition, T cells have increased accessibility to MHC-expressing DCs and the increase in both IL-7 and MHC accessibility promotes T lymphocyte HP (61). During GVHD, however, the lymphopenic environment is strikingly different and survival and HP of T cells are impaired (23, 62–64). For one, alloreactivity induces damages to stromal cells of primary and secondary

lymphoid organs, the primary source of IL-7 (22, 65–67). In addition, DC regeneration is decreased in GVHD (23). CD4<sup>+</sup> T cell HP depends on MHC-II presentation by DCs, such that this effect alone could explain the lack of CD4 regeneration. However, it does not necessarily explain lack of CD8<sup>+</sup> T cell HP, as MHC-I is ubiquitously expressed, and CD8 HP is probably not exclusively dependent on MHC-I expressed by DCs. Additional studies are needed to identify elements of the peripheral niche that limit CD8 recovery in GVHD hosts.

Several studies have demonstrated that DC numbers are reduced during GVHD and depletion/inactivation of recipient DCs before allogeneic-SCT can reduce GVHD (63, 68–71). The mechanism preventing DC regeneration during GVHD is not fully understood (23, 64, 72). However, two potential mechanisms have been proposed to explain diminished DC counts in GVHD hosts: the elimination of DCs by alloreactive lymphocytes and the disruption of the BM microenvironment that constrains DC production. Indeed, T cells can eliminate DCs after priming (73–75) and following allogeneic-SCT, recipient and donor-derived DCs can be eliminated by alloreactive lymphocytes (23). However, the long-lasting DC depletion that occurs during GVHD is unlikely only due to the allo-immune response against mature DCs since the elimination of alloreactive lymphocytes post-GVHD does not restore DC counts.

Damage to the BM microenvironment can induce myelosuppression after allogeneic-SCT. BM stromal cells provide growth factors such as GM-CSF, M-CSF, and Flt3-L, which are essential for HSC differentiation into mature cells. However, little is known about how these factors are affected by GVHD in the BM. While serum analysis can provide some insight about variation of these factors, the evaluation of BM biopsy is probably more accurate since several of these factors are also produced by immune cells (76). For example, Flt3-L levels in the BM differ from those seen in the blood of GVHD mice (23). The retention/egress of BM cells is also important for the differentiation of DCs. Stromal derived factor-1 alpha (SDF-1 $\alpha$ ) regulates integrin expression on HSCs and during GVHD, SDF-1 $\alpha$  is diminished (23). Low SDF-1 $\alpha$  levels inside the BM likely explain the accumulation of poorly differentiated DC precursors found in the blood during GVHD (64). The low SDF-1 $\alpha$  levels in the BM are in line with the low documented B cell levels in GVHD (77). Thus, access to BM specimens is essential to define the factors that limit DC regeneration necessary for maintaining both T and B cell homeostasis.

## RESTORING THYMOPOIESIS

Thymus rejuvenation represents the best option to restore T cell repertoire diversity in transplanted patients. Today, the adoptive transfer of T cell precursors and the transplantation of thymic tissues are two interesting options to achieve this goal. The administration of T cell precursors has demonstrated its efficacy at correcting intrinsic defects to common lymphoid progenitors (CLPs) to improve thymopoiesis. However, these studies were performed in a non-GVHD setting and although CLPs are decreased during GVHD (23), it is unclear whether the administration of T cell precursors could improve thymopoiesis

if the thymic epithelium has been damaged by alloreactive lymphocytes. Nonetheless, interaction between T cell precursors and TECs may help TECs to recover post-GVHD (78, 79). The administration of keratinocyte growth factor (KGF) protects the thymic epithelium from GVHD insults in mice (80). In humans, however, KGF (Palifermin) has been tested for CD4<sup>+</sup> T cell recovery in HIV patients but the benefits were quite modest (81). Thymic restoration is currently under investigation using embryonic stem cells and promising preclinical studies in rodents have demonstrated that the expansion of cTECs and mTECs, lead to increased numbers of functional T cells in the periphery (82).

Another approach to restore thymopoiesis is the use of postnatal allogeneic cultured thymus tissue, an approach that improved thymic output in patients with DiGeorge syndrome (83, 84). These patients are profoundly immunocompromised, which allow thymus engraftment without significant graft-rejection. Although such strategy has not been tested in allogeneic-SCT patients, it was investigated in HIV patients (85). However, high rate of thymus rejection was observed. Immunosuppression appears essential for successful thymic engraftment and T cell depletion prior to thymus transplant could lower the rate of graft rejection in GVHD patients. However, it is not clear whether lower numbers of CLPs observed after aGVHD could affect thymic output. Interestingly, IL-21 can improve thymopoiesis by expanding BM Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup> lymphoid progenitors after allogeneic-SCT (86). Thus, combining thymus transplantation with either IL-21 therapy or T cell precursor therapy could yield better thymic recovery following allogeneic-SCT.

## RESTORING THE PERIPHERAL NICHE

Approaches to improve HP of mature lymphocytes after allogeneic-SCT have demonstrated that the benefit on T cell regeneration is frequently offset by excessive GVHD (4, 23, 87). IL-7 therapy has been shown to expand T cells with a predominant effect on naïve CD8<sup>+</sup> cells (88). When administered early post-SCT, IL-7 could expand GVHD precursors and worsen aGVHD (4). At later time points, alloreactive T cells are activated and express lower IL-7R $\alpha$  levels, which could explain why GVHD severity is less affected by IL-7 therapy (23, 89). Similarly, IL-15 can improve lymphocyte reconstitution after T cell depleted allogeneic-SCT (90), but it can also worsen GVHD (5, 91). DCs are the most potent cell type to initiate T cell activation and forcing their recovery following allogeneic-SCT can present significant risks. For instance, Flt3-L treatment can expand most DC subsets in mice and humans (92) and when administered after allogeneic-SCT, it worsens GVHD (23). In contrast, the expansion of DCs by SDF-1 $\alpha$  therapy is largely restricted to the DC1 subset and resulted in a decrease in GVHD severity (23). Host DC1 have been shown to protect against aGVHD (93, 94). DC1 cells have an intrinsic ability to cross present antigens on MHC-I molecules and they are poor activators of CD4<sup>+</sup> T cells (95, 96), a property that is likely important for preventing unwanted T cell activation during homeostatic stimulation of naïve lymphocytes. However, there are several different subsets of DC with distinct functions, and it is not clear which subset specifically controls CD4 homeostasis, if any (97). Thus, depending of the cocktail

of cytokines used to improve T and DC regeneration, caution is needed as the risk to aggravate GVHD may surpass the benefit on T cell regeneration.

Mesenchymal stem cells (MSCs) can be administered in patients to diminish GVHD (98, 99). MSCs have immunosuppressive properties on T cells and on innate immune cells (100–102). MSCs produce a vast array of cytokines and growth factors known to affect hematopoiesis (103–107). While IL-7 production by MSCs may help to improve T cell survival, the secretion of other factors like SDF-1 $\alpha$  could promote DC regeneration (108). The infusion of HLA mismatch MSCs was first reported to reduce alloreactivity in patients with steroid-refractory aGVHD (109). However, studies that follow showed a benefit highly variable and often transient with response rate higher in patients with mild GVHD (Grade-II) (110–112). MSC therapy can effectively induce complete response in 72% of patients (Grade II) with partial response for patients with higher grade GVHD (99, 113). Importantly, the use of MSCs generated from pooled BM mononuclear cells obtained from multiple allogeneic donors showed surprising efficacy in patients with grade III-IV refractory GVHD (114, 115). Thus, the use of multiple donors to generate MSCs could perhaps reduce the variability inherent to individual donor. The development of effective strategies to lower GVHD severity is clearly an important milestone in our attempt to restore T cell homeostasis. Such a reduction could diminish GVHD insults to the thymus and the peripheral niche, facilitating our future immune interventions to accelerate lymphocyte reconstitution in patients.

## RESTORING T CELL HOMEOSTASIS AFTER GVHD

In most clinical settings of human lymphopenia, the dysfunction of the thymus represents the primary limiting factor for T cell regeneration. However, the dysfunction of the peripheral niche is now well documented and added to the dysfunction of the thymus and together they contribute to the very poor immune reconstitution that typically occurs in GVHD patients. In a setting where the peripheral niche remains dysfunctional, it is not clear whether restoring thymopoiesis would be sufficient to increase peripheral T cell counts. DCs and IL-7 provide critical survival signals to RTEs for their expansion in the periphery. Depending of the robustness of the thymic output, T cell immune reconstitution may vary considerably when the peripheral niche is dysfunctional. The absence of peripheral DCs could result into greater competition between T cells for access to MHC class I–II, which could affect the number and the diversity of the T cell repertoire. Under these conditions, the repertoire may be skewed toward lymphocytes with the highest levels of self-reactivity. In addition, the absence of peripheral DCs could impede self-tolerance imposed by thymopoiesis since the peripheral DCs pick up peripheral self-antigens, migrate to the thymus and induce negative selection of developing self-reactive thymocytes (116, 117). The failure to present self-antigens through MHC-II has been shown to induce severe autoimmunity in mice transplanted with MHC-II<sup>-/-</sup> BM cells (118). As a result, the feasibility and



the safety of restoring thymopoiesis in GVHD patients remain largely unknown. Animal models used to study T cell homeostasis have not yet addressed the capacity of the thymus to restore T cell counts in the absence of a functional peripheral niche. The use of thymic transplantation in GVHD hosts could provide significant insights about the potential benefits and limitations of restoring thymopoiesis in GVHD patients.

## CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Despite significant progress in our understanding of the biology of T cell depletion, therapies aimed at accelerating T cell regeneration remain limited and are still in clinical development (119, 120). The effect of GVHD on T cell homeostasis is multiple and addressing the dysfunction of the thymus or the peripheral niche alone may yield disappointing results in patients undergoing allogeneic-SCT. Under these circumstances, the coordinate use of IL-7, SDF-1 $\alpha$ , T cell precursors, embryonic stem cells, tissues engineering to recreate an artificial thymus and thymus transplantation could provide superior benefits with regards

to T cell regeneration in GVHD patients. In parallel, we need to address the recovery of other immune cell subsets such as B- and/or NK cells, which also provide immunocompetence to transplanted patients. Collaboration between clinicians and scientists will be instrumental to the successful development of new animal models of thymic rejuvenation in GVHD hosts to address the dysfunction of peripheral niche in order to guide our future immune interventions to accelerate and restore the T cell compartment in humans.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed intellectually to the writing of this work.

## FUNDING

This work was supported by grants from the Cancer Research Society of Canada (grants no. 16255 and no. 22669 to MG and no. 21006 to SL) and in part by the Fondation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montreal, QC, CAN.

## REFERENCES

- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* (1990) 75(3):555–62.
- Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med* (1995) 332(3):143–9. doi:10.1056/NEJM199501193320303
- Fry TJ, Mackall CL. Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: challenges for the future. *Bone Marrow Transplant* (2005) 35(Suppl 1):S53–7. doi:10.1038/sj.bmt.1704848
- Sinha ML, Fry TJ, Fowler DH, Miller G, Mackall CL. Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. *Blood* (2002) 100(7):2642–9. doi:10.1182/blood-2002-04-1082
- Blaser BW, Roychowdhury S, Kim DJ, Schwid NR, Bhatt D, Yuan W, et al. Donor-derived IL-15 is critical for acute allogeneic graft-versus-host disease. *Blood* (2005) 105(2):894–901. doi:10.1182/blood-2004-05-1687
- Guimond M, Fry TJ, Mackall CL. Cytokine signals in T-cell homeostasis. *J Immunother* (2005) 28(4):289–94. doi:10.1097/01.cji.0000165356.03924.e7
- Storek J, Wells D, Dawson MA, Storer B, Maloney DG. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* (2001) 98(2):489–91. doi:10.1182/blood.V98.2.489
- Simonelli C, Zanussi S, Pratesi C, Rupolo M, Talamini R, Caffau C, et al. Immune recovery after autologous stem cell transplantation is not different for HIV-infected versus HIV-uninfected patients with relapsed or refractory lymphoma. *Clin Infect Dis* (2010) 50(12):1672–9. doi:10.1086/652866
- Guimond M, Freud AG, Mao HC, Yu J, Blaser BW, Leong JW, et al. In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis. *J Immunol* (2010) 184(6):2769–75. doi:10.4049/jimmunol.0900685
- Dean R, Masci P, Pohlman B, Andresen S, Serafino S, Sobecks R, et al. Dendritic cells in autologous hematopoietic stem cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: graft content and post transplant recovery predict survival. *Bone Marrow Transplant* (2005) 36(12):1049–52. doi:10.1038/sj.bmt.1705183
- Storek J, Witherspoon RP, Storb R. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant* (1995) 16(3):413–25.
- Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* (1997) 89(10):3700–7.
- Steingrimsdottir H, Gruber A, Bjorkholm M, Svensson A, Hansson M. Immune reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in relation to underlying disease, type of high-dose therapy and infectious complications. *Haematologica* (2000) 85(8):832–8.
- Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* (2001) 97(11):3380–9. doi:10.1182/blood.V97.11.3380
- Williams KM, Gress RE. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* (2008) 21(3):579–96. doi:10.1016/j.beha.2008.06.003
- Storek J, Geddes M, Khan F, Huard B, Helg C, Chalandon Y, et al. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol* (2008) 30(4):425–37. doi:10.1007/s00281-008-0132-5
- de Koning C, Plantinga M, Besseling P, Boelens JJ, Nierkens S. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant* (2016) 22(2):195–206. doi:10.1016/j.bbmt.2015.08.028
- Denham S, Attridge SR, Barfoot RK. The effect of limited courses of cyclosporine on survival and immunocompetence of allogeneic bone marrow chimeras. *Transplantation* (1985) 40(5):477–82. doi:10.1097/00007890-198511000-00002
- Einsle H, Ehninger G, Steidle M, Fischer I, Bihler S, Gerneth F, et al. Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *Blood* (1993) 82(5):1672–8.
- Muller-Hermelink HK, Sale GE, Borisch B, Storb R. Pathology of the thymus after allogeneic bone marrow transplantation in man. A histologic immunohistochemical study of 36 patients. *Am J Pathol* (1987) 129(2):242–56.
- Dulude G, Roy DC, Perreault C. The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J Exp Med* (1999) 189(8):1329–42. doi:10.1084/jem.189.8.1329
- Shono Y, Ueha S, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y, et al. Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* (2010) 115(26):5401–11. doi:10.1182/blood-2009-11-253559
- Gauthier SD, Leboeuf D, Manuguerra-Gagne R, Gaboury L, Guimond M. Stromal-derived factor-1 $\alpha$  and interleukin-7 treatment improves homeostatic proliferation of naive CD4(+) T cells after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* (2015) 21(10):1721–31. doi:10.1016/j.bbmt.2015.06.019

24. Martin PJ. Biology of chronic graft-versus-host disease: implications for a future therapeutic approach. *Keio J Med* (2008) 57(4):177–83. doi:10.2302/kjm.57.177
25. Hannam-Harris AC, Taylor DS, Nowell PC. Cyclosporin A directly inhibits human B-cell proliferation by more than a single mechanism. *J Leukoc Biol* (1985) 38(2):231–9. doi:10.1002/jlb.38.2.231
26. Gratama JW, Wursch AM, Nissen C, Gratwohl A, D'Amaro J, de Gast GC, et al. Influence of graft-versus-host disease prophylaxis on early T-lymphocyte regeneration following allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* (1986) 62(2):355–65.
27. Chen GL, Arai S, Flowers ME, Otani JM, Qiu J, Cheng EC, et al. A phase I study of imatinib for corticosteroid-dependent/refractory chronic graft-versus-host disease: response does not correlate with anti-PDGFRα antibodies. *Blood* (2011) 118(15):4070–8. doi:10.1182/blood-2011-03-341693
28. Legros L, Ebran N, Stebe E, Rousselot P, Rea D, Cassuto JP, et al. Imatinib sensitizes T-cell lymphocytes from chronic myeloid leukemia patients to FasL-induced cell death: a brief communication. *J Immunother* (2012) 35(2):154–8. doi:10.1097/CJI.0b013e318243f238
29. Thiant S, Moutouou MM, Laflamme P, Sidi Boumedine R, Leboeuf DM, Busque L, et al. Imatinib mesylate inhibits STAT5 phosphorylation in response to IL-7 and promotes T cell lymphopenia in chronic myelogenous leukemia patients. *Blood Cancer J* (2017) 7(4):e551. doi:10.1038/bcj.2017.29
30. Fukushi N, Arase H, Wang B, Ogasawara K, Gotohda T, Good RA, et al. Thymus: a direct target tissue in graft-versus-host reaction after allogeneic bone marrow transplantation that results in abrogation of induction of self-tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990) 87(16):6301–5. doi:10.1073/pnas.87.16.6301
31. Olkinuora H, Talvensaari K, Kaartinen T, Siitonen S, Saarinen-Pihkala U, Partanen J, et al. T cell regeneration in pediatric allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2007) 39(3):149–56. doi:10.1038/sj.bmt.1705557
32. Merindol N, Champagne MA, Duval M, Soudeyns H. CD8(+) T-cell reconstitution in recipients of umbilical cord blood transplantation and characteristics associated with leukemic relapse. *Blood* (2011) 118(16):4480–8. doi:10.1182/blood-2011-04-349241
33. Lum LG. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* (1987) 69(2):369–80.
34. Ashman RF, Singh N, Lenert PS. Abnormal thymic maturation and lymphoproliferation in MRL-Fas (lpr/lpr) mice can be partially reversed by synthetic oligonucleotides: implications for systemic lupus erythematosus and autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Lupus* (2017) 26(7):734–45. doi:10.1177/0961203316676381
35. Douek DC, Betts MR, Hill BJ, Little SJ, Lempicki R, Metcalf JA, et al. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J Immunol* (2001) 167(11):6663–8. doi:10.4049/jimmunol.167.11.6663
36. Douek DC, Koup RA, McFarland RD, Sullivan JL, Luzuriaga K. Effect of HIV on thymic function before and after antiretroviral therapy in children. *J Infect Dis* (2000) 181(4):1479–82. doi:10.1086/315398
37. Saglio F, Cena S, Berger M, Quarello P, Boccasavia V, Ferrando F, et al. Association between thymic function and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcome: results of a pediatric study. *Biol Blood Marrow Transplant* (2015) 21(6):1099–105. doi:10.1016/j.bbmt.2015.02.010
38. Hazenberg MD, Otto SA, de Pauw ES, Roelofs H, Fibbe WE, Hamann D, et al. T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events. *Blood* (2002) 99(9):3449–53. doi:10.1182/blood.V99.9.3449
39. Krenger W, Schmidlin H, Cavadini G, Hollander GA. On the relevance of TCR rearrangement circles as molecular markers for thymic output during experimental graft-versus-host disease. *J Immunol* (2004) 172(12):7359–67. doi:10.4049/jimmunol.172.12.7359
40. Liu C, He M, Rooney B, Kepler TB, Chao NJ. Longitudinal analysis of T-cell receptor variable beta chain repertoire in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* (2006) 12(3):335–45. doi:10.1016/j.bbmt.2005.09.019
41. Przybylski GK, Kreuzer KA, Siegert W, Schmidt CA. No recovery of T-cell receptor excision circles (TRECs) after non-myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is correlated with the onset of GVHD. *J Appl Genet* (2007) 48(4):397–404. doi:10.1007/BF03195239
42. Hakim FT, Cepeda R, Kaimei S, Mackall CL, McAtee N, Zujewski J, et al. Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. *Blood* (1997) 90(9):3789–98.
43. Hakim FT, Memon SA, Cepeda R, Jones EC, Chow CK, Kasten-Sportes C, et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest* (2005) 115(4):930–9. doi:10.1172/JCI200522492
44. Anderson G, Owen JJ, Moore NC, Jenkinson EJ. Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro. *J Exp Med* (1994) 179(6):2027–31. doi:10.1084/jem.179.6.2027
45. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* (1994) 372(6501):100–3. doi:10.1038/372100a0
46. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* (2003) 4(4):350–4. doi:10.1038/n906
47. Nakagawa Y, Ohigashi I, Nitta T, Sakata M, Tanaka K, Murata S, et al. Thymic nurse cells provide microenvironment for secondary T cell receptor alpha rearrangement in cortical thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109(50):20572–7. doi:10.1073/pnas.1213069109
48. Daley SR, Hu DY, Goodnow CC. Helios marks strongly autoreactive CD4+ T cells in two major waves of thymic deletion distinguished by induction of PD-1 or NF-kappaB. *J Exp Med* (2013) 210(2):269–85. doi:10.1084/jem.20121458
49. Seemayer TA, Lapp WS, Bolande RP. Thymic epithelial injury in graft-versus-host reactions following adrenalectomy. *Am J Pathol* (1978) 93(2):325–38.
50. Ghayur T, Seemayer TA, Xenocostas A, Lapp WS. Complete sequential regeneration of graft-vs.-host-induced severely dysplastic thymuses. Implications for the pathogenesis of chronic graft-vs.-host disease. *Am J Pathol* (1988) 133(1):39–46.
51. Gardner JM, Fletcher AL, Anderson MS, Turley SJ. Aire in the thymus and beyond. *Curr Opin Immunol* (2009) 21(6):582–9. doi:10.1016/j.coi.2009.08.007
52. Dertschnig S, Hauri-Hohl MM, Vollmer M, Hollander GA, Krenger W. Impaired thymic expression of tissue-restricted antigens licenses the de novo generation of autoreactive CD4+ T cells in acute GVHD. *Blood* (2015) 125(17):2720–3. doi:10.1182/blood-2014-08-597245
53. Hassan MN, Waller EK. GVHD clears the Aire in thymic selection. *Blood* (2015) 125(17):2593–5. doi:10.1182/blood-2015-03-630871
54. Hauri-Hohl MM, Keller MP, Gill J, Hafen K, Pachlatko E, Boulay T, et al. Donor T-cell alloreactivity against host thymic epithelium limits T-cell development after bone marrow transplantation. *Blood* (2007) 109(9):4080–8. doi:10.1182/blood-2006-07-034157
55. Desbarats J, Lapp WS. Thymic selection and thymic major histocompatibility complex class II expression are abnormal in mice undergoing graft-versus-host reactions. *J Exp Med* (1993) 178(3):805–14. doi:10.1084/jem.178.3.805
56. Wu T, Young JS, Johnston H, Ni X, Deng R, Racine J, et al. Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* (2013) 191(1):488–99. doi:10.4049/jimmunol.1300657
57. Hollander GA, Widmer B, Burakoff SJ. Loss of normal thymic repertoire selection and persistence of autoreactive T cells in graft vs host disease. *J Immunol* (1994) 152(4):1609–17.
58. van den Brink MR, Moore E, Ferrara JL, Burakoff SJ. Graft-versus-host-disease-associated thymic damage results in the appearance of T cell clones with anti-host reactivity. *Transplantation* (2000) 69(3):446–9. doi:10.1097/00007890-200002150-00026
59. Zhang Y, Hexner E, Frank D, Emerson SG. CD4+ T cells generated de novo from donor hemopoietic stem cells mediate the evolution from acute to chronic graft-versus-host disease. *J Immunol* (2007) 179(5):3305–14. doi:10.4049/jimmunol.179.5.3305
60. Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S, Takeuchi K, Harada M, Tanimoto M, et al. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* (2007) 109(4):1756–64. doi:10.1182/blood-2006-08-042853

95. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* (2000) 192(12):1685–96. doi:10.1084/jem.192.12.1685
96. Kronin V, Fitzmaurice CJ, Caminschi I, Shortman K, Jackson DC, Brown LE. Differential effect of CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in the stimulation of secondary CD4(+) T cells. *Int Immunol* (2001) 13(4):465–73. doi:10.1093/intimm/13.4.465
97. Audiger C, Rahman MJ, Yun TJ, Tarbell KV, Lesage S. The importance of dendritic cells in maintaining immune tolerance. *J Immunol* (2017) 198(6):2223–31. doi:10.4049/jimmunol.1601629
98. Kurtzberg J, Prockop S, Teira P, Bittencourt H, Lewis V, Chan KW, et al. Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (remestemcel-L, Prochymal) as a rescue agent for severe refractory acute graft-versus-host disease in pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant* (2014) 20(2):229–35. doi:10.1016/j.bbmt.2013.11.001
99. Introna M, Rambaldi A. Mesenchymal stromal cells for prevention and treatment of graft-versus-host disease: successes and hurdles. *Curr Opin Organ Transplant* (2015) 20(1):72–8. doi:10.1097/MOT.0000000000000158
100. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* (2006) 107(4):1484–90. doi:10.1182/blood-2005-07-2775
101. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* (2009) 15(1):42–9. doi:10.1038/nm.1905
102. Bouchlaka MN, Moffitt AB, Kim J, Kink JA, Bloom DD, Love C, et al. Human mesenchymal stem cell-educated macrophages are a distinct high IL-6-producing subset that confer protection in graft-versus-host-disease and radiation injury models. *Biol Blood Marrow Transplant* (2017) 23(6):897–905. doi:10.1016/j.bbmt.2017.02.018
103. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* (1996) 166(3):585–92. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199603)166:3<585::AID-JCP13>3.0.CO;2-6
104. Van Overstraeten-Schlogel N, Beguin Y, Gothot A. Role of stromal-derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells. *Eur J Haematol* (2006) 76(6):488–93. doi:10.1111/j.1600-0609.2006.00633.x
105. Wagner W, Saffrich R, Ho AD. The stromal activity of mesenchymal stromal cells. *Transfus Med Hemother* (2008) 35(3):185–93. doi:10.1159/000128956
106. Li T, Wu Y. Paracrine molecules of mesenchymal stem cells for hematopoietic stem cell niche. *Bone Marrow Res* (2011) 2011:353878. doi:10.1155/2011/353878
107. Zhao K, Liu Q. The clinical application of mesenchymal stromal cells in hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol* (2016) 9(1):46. doi:10.1186/s13045-016-0276-z
108. Fujii S, Miura Y, Fujishiro A, Shindo T, Shimazu Y, Hirai H, et al. Graft-versus-host disease amelioration by human bone marrow mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles is associated with peripheral preservation of naive T cell populations. *Stem Cells* (2018) 36(3):434–45. doi:10.1002/stem.2759
109. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* (2004) 363(9419):1439–41. doi:10.1016/S0140-6736(04)16104-7
110. Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, Roelofs H, Zecca M, Avanzini MA, et al. Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2011) 46(2):200–7. doi:10.1038/bmt.2010.87
111. Chen X, Wang C, Yin J, Xu J, Wei J, Zhang Y. Efficacy of mesenchymal stem cell therapy for steroid-refractory acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* (2015) 10(8):e0136991. doi:10.1371/journal.pone.0136991
112. Dotoli GM, De Santis GC, Orellana MD, de Lima Prata K, Caruso SR, Fernandes TR, et al. Mesenchymal stromal cell infusion to treat steroid-refractory acute GVHD III/IV after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2017) 52(6):859–62. doi:10.1038/bmt.2017.35
113. Introna M, Lucchini G, Dander E, Galimberti S, Rovelli A, Balduzzi A, et al. Treatment of graft versus host disease with mesenchymal stromal cells: a phase I study on 40 adult and pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant* (2014) 20(3):375–81. doi:10.1016/j.bbmt.2013.11.033
114. Kuci Z, Bonig H, Kreyenberg H, Bunos M, Jauch A, Janssen JW, et al. Mesenchymal stromal cells from pooled mononuclear cells of multiple bone marrow donors as rescue therapy in pediatric severe steroid-refractory graft-versus-host disease: a multicenter survey. *Haematologica* (2016) 101(8):985–94. doi:10.3324/haematol.2015.140368
115. Bader P, Kuci Z, Bakhtiar S, Basu O, Bug G, Dennis M, et al. Effective treatment of steroid and therapy-refractory acute graft-versus-host disease with a novel mesenchymal stromal cell product (MSC-FFM). *Bone Marrow Transplant* (2018). doi:10.1038/s41409-018-0102-z
116. Goldschneider I, Cone RE. A central role for peripheral dendritic cells in the induction of acquired thymic tolerance. *Trends Immunol* (2003) 24(2):77–81. doi:10.1016/S1471-4906(02)00038-8
117. Li J, Park J, Foss D, Goldschneider I. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J Exp Med* (2009) 206(3):607–22. doi:10.1084/jem.20082232
118. Teshima T, Reddy P, Liu C, Williams D, Cooke KR, Ferrara JL. Impaired thymic negative selection causes autoimmune graft-versus-host disease. *Blood* (2003) 102(2):429–35. doi:10.1182/blood-2003-01-0266
119. Rosenberg SA, Sportes C, Ahmadzadeh M, Fry TJ, Ngo LT, Schwarz SL, et al. IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. *J Immunother* (2006) 29(3):313–9. doi:10.1097/01.cji.0000210386.55951.e2
120. Sportes C, Hakim FT, Memon SA, Zhang H, Chua KS, Brown MR, et al. Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets. *J Exp Med* (2008) 205(7):1701–14. doi:10.1084/jem.20071681

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare no commercial or financial relationships that could constitute a conflict of interest.

Copyright © 2018 Moutuou, Pagé, Zaid, Lesage and Guimond. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Article 2

### **Studying Peripheral T Cell Homeostasis in Mice: A Concise Technical Review. Methods in Molecular Biology 2020**

Moutuaata M. Moutuou, Simon-David Gauthier, Nicolas Chen

Dominique Leboeuf and Martin Guimond



## Studying Peripheral T Cell Homeostasis in Mice: A Concise Technical Review

T-Cell Receptor Signaling pp 267-283 | Cite as

- Moutuaata M. Moutuou (2)
- Simon-David Gauthier (2)
- Nicolas Chen (3)
- Dominique Leboeuf (4)
- Martin Guimond (1) (2) Email author (martin.guimond@umontreal.ca)

1. Division Immunologie-Oncologie, Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, , Montréal, Canada
2. Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, , Montréal, Canada
3. Département de Biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal, , Montréal, Canada
4. Skolkovo Institute of Science and Technology, , Moscow, Russia

Protocol

First Online: 14 January 2020

- 1 Mentions
- 812 Downloads

Part of the [Methods in Molecular Biology](#) book series (MIMB, volume 2111)

### Abstract

For several years, it was believed that the thymus was entirely responsible for maintaining T cell homeostasis. Today, it is well-known that homeostatic peripheral mechanisms are essential in order to maintain T cell numbers and diversity constant in the periphery. Naïve and memory T cells require continual access to self-peptide MHC class I and II molecules and/or cytokines to survive in the periphery. Under normal conditions, homeostatic resources are low, and lymphocytes undergo very slow proliferation and survive. Following T cell depletion, the bioavailability of homeostatic resources is significantly increased, and T cell proliferation is dramatically augmented. The development of lymphopenic mouse models has helped our current understanding of factors involved in the regulation of peripheral T cell homeostasis. In this minireview, we will give a brief overview about basic techniques used to study peripheral T cell homeostasis in mice.